



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA ALOPREGNANOLONA EN
LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS
DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ALEJANDRO CERÓN VILLALVA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Ignacio Camacho Arroyo
VOCAL: Profesor: Oscar Armando Pérez Méndez
SECRETARIO: Profesor: Carolina Guzmán Arriaga
1er. SUPLENTE: Profesor: Ignacio González Sánchez
2° SUPLENTE: Profesor: José Vergara de la Fuente

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): M. EN C. ANA GABRIELA PIÑA MEDINA

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ALEJANDRO CERÓN VILLALVA

(nombre (s) y firma (s))

Esta tesis se realizó en la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la autoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el financiamiento de CONACyT al proyecto número 250866.

A las M. en C. Ana Gabriela Piña Medina y Carmen Janin Zamora Sánchez de la Facultad de Química, UNAM por su apoyo técnico y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Oscar Armando Pérez Méndez y Dra. Carolina Guzmán Arriaga, por su interés al revisar y comentar esta tesis.

Índice	Páginas
1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	3
3. Introducción.....	4
4. Antecedentes.....	6
4.1. Tumores cerebrales.....	6
4.1.1. Glioblastomas.....	7
4.2. Migración Celular.....	9
4.3. Invasión Celular.....	11
4.4. Alopregnanolona (3 α -THP).....	13
4.4.1. Generalidades.....	13
4.4.2. Síntesis de la 3 α -THP.....	14
4.4.3. Mecanismos de acción de la 3 α -THP.....	16
4.5. Efectos de la 3 α -THP en líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos.....	18
5. Planteamiento del problema.....	20
6. Hipótesis.....	20
7. Objetivos.....	20
7.1. Objetivo General.....	20
7.2. Objetivo Particular.....	20
8. Metodología.....	21
8.1. Cultivo celular.....	21
8.2. Tratamientos hormonales.....	21
8.3. Ensayo de migración	21
8.4. Ensayo de invasión.....	22
8.5. Análisis estadístico.....	23
9. Resultados.....	24
10. Discusión.....	28
11. Conclusión.....	31
12. Referencias.....	32

1. Abreviaturas

3 α -HSD	3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 α -THP	Alopregnanolona/ 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-ona
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5 α -DHP	5 α -dihidroprogesterona
5 α -R	5 α -reductasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AKT	Proteína cinasa B
ANOVA	Análisis de la varianza
Ara-C	Arabinosilcitosina
ATCC	American Type Culture Collection
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CDC42	Homólogo 42 de la proteína de control de la división celular.
CREB1	Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP 1
CYP11A1 o P450 _{scc}	Citocromo P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAP	Uniones comunicantes
GBM	Glioblastomas
Gi	Proteínas G inhibitorias
Gs	Proteínas G estimuladoras
HIF	Factor inducido por hipoxia
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de matriz
mRP	Receptores membranales de progesterona
OMS	Organización Mundial de la Salud
P ¹⁶ INK4a	Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina
P ₄	Progesterona
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta.
PFA	Paraformaldehído

PI3K		Fosfoinositol 3-cinasas
PKA		Proteína cinasa A
PTEN		Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PXR		Receptor de pregnano X
ROCK1/2		Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1/2
RP		Receptor de progesterona
SEM		Error estándar de la media
SFB		Suero fetal bovino
Slug		Proteína de dedos de zinc SNAI2
SNC		Sistema nervioso central
SNP		Sistema nervioso periférico
TEM		Transición epitelio-mesenquimal
TGFβ1		Factor de crecimiento transformante beta-1
TP53		Supresor tumoral p53
VEGF		Factor de crecimiento endotelial vascular

2. Resumen

La alopregnanolona (3α -THP) es un metabolito de la progesterona (P_4) resultante de la reducción de esta hormona mediante la acción de las enzimas 5α -reductasa y la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. En diversos estudios se ha observado que tanto la P_4 como la 3α -THP inducen la progresión y el crecimiento de los glioblastomas (GBM) que son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en seres humanos. A lo largo de los años se ha estudiado ampliamente el papel que tiene la P_4 en procesos de proliferación, viabilidad celular, migración e invasión en diferentes líneas celulares como resultado de la unión de esta hormona con sus receptores membranales y nucleares. Sin embargo, el efecto que ejerce la 3α -THP en células derivadas de GBM, es un campo de estudio que empezó a surgir recientemente. Por lo anterior, el objetivo de esta tesis fue conocer el efecto de la 3α -THP en la migración e invasión de células derivadas de GBM humanos.

Para ello, en este estudio se utilizaron tratamientos con P_4 y 3α -THP en células derivadas de glioblastomas humanos (líneas celulares U87 y U251) y se observó que ambos tratamientos aumentaban en la misma magnitud la capacidad migratoria en ambas líneas celulares al compararlas con el tratamiento con vehículo. Posteriormente se utilizaron los mismos tratamientos en ensayos de invasión celular y se encontró un efecto positivo generado por ambos tratamientos en la capacidad invasiva de ambas líneas celulares en comparación con el tratamiento con vehículo.

Los datos obtenidos en este trabajo indican que la 3α -THP, al inducir un aumento en la motilidad y en la capacidad invasiva de las líneas celulares U87 y U251, favorece el comportamiento agresivo que caracteriza a los GBM.

3. Introducción

Los tumores más frecuentes y letales del sistema nervioso central (SNC) son los gliomas y entre ellos los astrocitomas, llamados así por las características que comparten con los astrocitos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a los astrocitomas de acuerdo a su grado de malignidad en una escala del I al IV, siendo los de grado IV o Glioblastomas (GBM) los más agresivos [1]. Los GBM se caracterizan por presentar una proliferación celular descontrolada, resistencia a la apoptosis, alta vascularización y un comportamiento altamente invasivo. El pronóstico de vida es pobre: de 13-16 meses aproximadamente a partir del diagnóstico [2, 3], con una mala respuesta a diversos tratamientos, a pesar del avance en las terapias moleculares [4].

La agresividad de los GBM se debe en gran medida a su capacidad de migración e invasión hacia el tejido adyacente, pues dificulta la remoción total del tumor por cirugía. Para que ocurra un proceso de migración se requiere la activación de diferentes vías de señalización intracelulares que favorecen la modificación del tamaño y la rigidez del citoesqueleto de actina. Este proceso se lleva a cabo de manera ordenada, iniciando con la modificación en la estructura celular en el frente de la célula, permitiendo el contacto con la matriz extracelular (MEC) en sitios determinados, posteriormente se realiza el reclutamiento de proteasas a estos sitios, éstas realizan una proteólisis focalizada, posteriormente la célula se contrae permitiendo su movimiento a lo largo de la MEC, finalmente la célula se separa del lugar al que se adhirió originalmente [5].

Las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo de los GBM, entre ellas, la progesterona (P_4) ha sido de las más estudiadas y se ha reportado que incrementa la proliferación celular, migración e infiltración de dichos tumores [6]. Por otra parte, se conoce que algunos metabolitos de la P_4 también tienen efecto en el SNC. La 3α -THP, metabolito producto de la reducción de la P_4 , es muy importante para el funcionamiento y desarrollo adecuado del SNC y del Sistema Nervioso Periférico (SNP); también regula procesos de comunicación, proliferación y diferenciación de distintos tipos de células mediante diferentes

mecanismos; entre los que se encuentran la modulación alostérica del receptor GABA_A y la unión a receptores membranales de P₄ (mRPs) [4].

Se sabe que la 3 α -THP tiene efectos sobre la proliferación de células derivadas de un GBM humanos y que regula genes importantes para la progresión de dichos tumores [7]. Sin embargo, se desconoce si este metabolito tiene efectos sobre la migración e invasión de células derivadas de GBM humanos.

4. Antecedentes

4.1. Tumores Cerebrales.

El término cáncer se aplica a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por tener trastornos en el crecimiento, muerte y diferenciación de las células que conduce a la formación de masas tumorales capaces de diseminarse, estos trastornos son desencadenados por un proceso de varias etapas denominado carcinogénesis, para que ello suceda debe existir cierto daño genético o epigenético a la célula y/o problemas en los mecanismos de reparación del material genético.

Los tumores principales del SNC forman un grupo heterogéneo de tumores sólidos, que pueden surgir en diferentes áreas del cerebro, tienen diferente capacidad invasiva y confieren diferente pronóstico de vida al paciente. [8] Los gliomas son aquellos tumores desarrollados a partir de células gliales y abarcan a los astrocitomas, oligodendrogliomas y ependiomas, en conjunto los gliomas representan un 35.7% de todos los tumores primarios en adultos. [8, 9]

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales derivados de astrocitos o células madre cancerosas. De entre los gliomas, son los astrocitomas los que se encuentran con mayor frecuencia y son clasificados, según la Organización Mundial de la Salud, en 4 grados (I-IV) con base en sus características histológicas y su grado de malignidad. [8]

Los astrocitomas de grado I o pilocíticos se caracterizan por tener un crecimiento lento y un comportamiento poco invasivo, es común encontrarlos en poblaciones de edades entre 0-19 años. Es muy poco probable que puedan adquirir capacidades agresivas con el paso de los años, y en ocasiones se han visto cambios regresivos, por lo anterior se considera que este tipo de astrocitoma es el menos agresivo de todos, sin embargo, se sugiere su remoción a edad temprana, pues se ha visto que la tasa de sobrevivencia a este proceso quirúrgico es más baja en poblaciones mayores a 60 años. [8, 10]

Los astrocitomas tipo II o difusos son aquellos que crecen lentamente pero tienen un alto grado de diferenciación, existe en ellos la presencia de núcleos celulares atípicos, sus capacidades invasivas se ven aumentadas en comparación con los astrocitomas pilocíticos, además presentan la capacidad de progresar a tumores de grado III y posteriormente a grado IV. Se ha reportado que tumores de este tipo presentan mutaciones en los genes del supresor tumoral p53 (TP53) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGFR), ambos genes son necesarios en la regulación de procesos celulares como apoptosis, arresto del ciclo celular y crecimiento celular, al presentar mutaciones los procesos celulares normales son desregulados favoreciendo el fenotipo de células cancerosas. [8, 11,12]

Los astrocitomas tipo III o anaplásicos engloban a aquellos astrocitomas malignos que presentan un aumento en su actividad proliferativa así como en el número de células, estas células contienen núcleos atípicos. Este tipo de tumores puede ser generado de uno ya existente o puede generarse *de novo* y cuentan con la tendencia de progresar rápidamente a glioblastoma. [8]

4.1.1. Glioblastomas

Los glioblastomas o astrocitomas de grado IV representan al 14.9% de todos los tumores del SNC y un 47.1% de todos los tumores primarios malignos del cerebro. La aparición de este tipo de tumores aumenta con la edad, siendo el rango de edad con mayor incidencia el comprendido entre los 60-75 años. De manera interesante el sexo es un factor que también modifica la aparición de los glioblastomas, ya que se ha observado que su incidencia es mayor en hombres, con una proporción (3:2) en comparación con las mujeres. [9]

Se ha clasificado a los glioblastomas como primarios o secundarios en función a su surgimiento, es decir a si son generados *de novo* o si provienen de un astrocitoma de menor grado, respectivamente. La forma de surgimiento le confiere a los glioblastomas de cada tipo diferente comportamiento, se ha observado que aquellos pacientes con glioblastomas primarios tienen una historia clínica mucho más corta que aquellos con glioblastomas secundarios. [13]

En los glioblastomas se han reportado diferentes mutaciones que impactan en procesos de invasión, ciclo celular y apoptosis. Dentro de los cuales se encuentran la amplificación o sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) el cual participa en la división celular. Por otro lado, también se han visto mutaciones en la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y P53 los cuales en condiciones normales actúan como supresores tumorales. Además se han encontrado deleciones en el gen del inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina (p16^{INK4a}) que afectan la transición de fase G1 a fase S. [8, 11,13]

Asimismo, se ha detectado la presencia de anomalías cromosómicas en glioblastomas, la pérdida de heterocigocidad del cromosoma 10 es la más frecuente de estas anomalías, ocurriendo en un 60-80% de los casos de glioblastoma. [14] Se han detectado otras aberraciones cromosómicas, aunque en menor frecuencia de aparición, entre ellas se encuentran: la pérdida de heterocigocidad de la región 1p (12-15% de los casos), la pérdida de heterocigocidad de la región 19q (20-15%) y la deleción de la región de la región 22q (20-30%) [8]

Los glioblastomas se caracterizan por invadir rápidamente tejidos cercanos, en este proceso las células cancerosas pueden propagarse hacia otras estructuras en el cerebro y pueden llegar a formar glioblastomas multifocales. Además, las células invasivas no se encuentran dentro del límite visible de la masa tumoral, es por eso que no son removidas en su totalidad durante el procedimiento de resección quirúrgica del tumor. Lo anterior podría relacionarse con la característica de resurgimiento de estos tumores. Los glioblastomas, a pesar de su rápido crecimiento infiltrativo, por lo general no invaden el espacio subaracnoideo [8], lugar por donde pasan las principales arterias que mantienen la irrigación del encéfalo [16], por lo tanto rara vez logran hacer metástasis hacia otros órganos del cuerpo.

Por lo anterior la sobrevivencia de pacientes con glioblastoma es muy pobre. En estudios poblacionales en Suiza y Canadá se ha detectado que el tiempo medio

de vida para los pacientes diagnosticados con glioblastoma es de 5 meses y se ha observado que solo un 3.3% de los pacientes diagnosticados sobrevive un periodo de 2 años después de ser diagnosticado. [8, 17] En la mayoría de estudios poblacionales se ha observado que la edad es un factor importante para la sobrevivencia del paciente, aquellos pacientes diagnosticados a temprana edad (menores de 65 años) tienen un mayor tiempo de sobrevivencia promedio. [18] Así mismo, se han observado relaciones entre algunas de las alteraciones genéticas y la sobrevivencia del paciente, la presencia de mutaciones en TP53 tienden a favorecer la prognosis del paciente. Por otro lado la pérdida de heterocigocidad del cromosoma 10 se ha relacionado con baja sobrevida. [19]

Estos bajos niveles de sobrevivencia son consecuencia de la alta resistencia de los glioblastomas a las terapias actuales, resistencia fundamentada en diferentes factores entre los que se encuentran: la incapacidad de los fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica impidiendo su llegada al tumor, la inestabilidad genómica de los glioblastomas generando diferentes poblaciones de clonas celulares resistentes a diversas terapias, la presencia de células troncales que pudieran tener mecanismos de resistencia diferentes a la mayoría de las demás células tumorales, y las propiedades invasivas del tumor, permitiéndole afectar diferentes secciones del encéfalo. [8] Para que las células tumorales invadan tejidos cercanos, éstas deben poder moverse y migrar a través de la MEC, este proceso requiere de la activación de diferentes vías de señalización intracelulares que favorecen la modificación de la organización del citoesqueleto de actina. [5]

4.2. Migración Celular

El movimiento celular es una característica esencial que todos los tipos de células comparten, esta capacidad está involucrada en diferentes etapas de procesos de desarrollo embrionario, respuesta inmune, inflamación y metástasis. [20]. De manera normal los procesos de movimiento celular tienen una regulación muy estricta, en cáncer los mecanismos de control regulatorios se ven afectados favoreciendo el fenotipo móvil celular. [21]

Para que inicie el movimiento, la célula debe ser capaz de modificar su forma y la rigidez de su membrana, es decir la célula atraviesa una transformación que ha sido denominada como transición epitelial-mesenquimal (TEM), cambiando sus características de células epiteliales diferenciadas, como la adhesión célula-célula o la polaridad celular, por un fenotipo mesenquimal, este fenotipo le confiere atributos que favorecen sus capacidades migratorias e invasivas. Es importante destacar que esta transición se puede revertir mediante un proceso denominado transición mesenquimal-epitelial (TME), cualidad que explica la formación de nuevos tumores en otros órganos después de la metástasis. [22]

Se ha clasificado a la transición epitelial-mesenquimal en tres subtipos, denominando como “Tipo 3” al proceso asociado con células neoplásicas y progresión del cáncer. Entre las señales que regulan la TEM en células cancerosa se encuentran miembros de las familias de: el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), los factores inducidos por hipoxia (HIF), entre otros. [23]. Como consecuencia, múltiples vías de señalización se ven involucradas como la vía de las MAP cinasas (MAPK) y la vía PI3K/AKT, entre otras. Estas señalizaciones mediadas por receptores desencadenan la activación de moléculas y factores de transcripción reguladores como SNAIL1, SNAIL2, Slug, ZEB1/ZEB2 y Twist1/Twist2. [24]

De manera normal los astrocitos son células que expresan moléculas de adhesión (CAMs) y presentan uniones comunicantes (GAP) y estrechas, permitiéndoles interactuar con células y moléculas a su alrededor, al inicio de la TEM estas uniones son destruidas por la degradación de las proteínas y moléculas de adhesión así como la baja expresión de algunas moléculas como Claudina y Ocludina. Además, la cadherina epitelial (E-Cadherina) es degradada, evitando su unión con β -catenina favoreciendo la desestabilización de las uniones célula a célula. A medida que avanza la TEM la transcripción de proteínas de unión es reprimida. [25]

Es en este momento que la célula debe cambiar a un fenotipo que permita la elongación celular y un movimiento direccionado, para ello se debe reorganizar el citoesqueleto de actina favoreciendo la formación de proyecciones membranales como lamelipodia y filipodia. Estos procesos son regulados por GTPasas de la familia RHO (RHOA, RAC1 y CDC42). [26]. Durante la TEM se genera la catenina citoplasmática p120 debido a niveles bajos de E-Cadherina, esta reprime la función reguladora de RHOA en las uniones célula a célula, favoreciendo la destrucción de estas uniones. Además, esta catenina activa a RAC1 y a CDC42 favoreciendo su función formadora de proyecciones membranales y de movimiento celular. [27]

La activación de la vía MAPK, por efecto de factores de crecimiento o por mutaciones en genes codificantes para RAS o RAF también favorecen TEM activando la expresión de SNAIL1 y SNAIL2, los cuales inducen la activación de GTPasas de la familia RHO favoreciendo el proceso de migración [28], esto podría efectuarse mediante las proteína ROCK1 y ROCK2, cuya inhibición, al usar el compuesto Y-27632, inhibidor específico para ROCK1/2, ha demostrado una disminución en la capacidad migratoria de células LN-18 derivadas de GBM. [29]

Todos estos sucesos de reestructuración de citoesqueleto y de los complejos de polaridad celular traen como resultado el cambio en la forma celular, la elongación de la célula y la formación de proyecciones membranales necesarias para un movimiento celular direccionado.

4.3. Invasión Celular

Un proceso asociado a la agresividad de los GBM es su capacidad de invadir a otros tejidos cercanos, cabe aclarar que no debe confundirse a este suceso con su habilidad de migración, aunque se debe notar que ambas se acompañan. Para que el proceso de invasión se lleve a cabo la célula debe formar estructuras ricas en actina, llamadas invadopodia, estas sobresalen de la membrana celular y están en contacto directo con la MEC. Estas estructuras intervienen en el proceso de invasión celular en lo que pueden ser caracterizadas como 4 etapas: 1) acumulación de actina en el punto de unión entre la célula y la

MEC, 2) formación de invadopodia maduras, 3) incremento en los niveles de actina y metaloproteinasas de matriz (MMP) y 4) degradación de la MEC. Entre los elementos más importantes para que este proceso se lleve a cabo se debe destacar a las integrinas pues le confieren sus propiedades adherentes a las invadopodia. [50]

En diversos estudios se hace notar la relación estrecha entre la formación de las invadopodia y la TEM se debe a que comparten proteínas y vías de señalización que conducen a la pérdida o disminución de la expresión de moléculas de adherencia celular. [51] Entre estas vías están la activación del SRC por su interacción con diferentes factores de crecimiento para inducir la formación de invadopodia y la TEM. [52]

Otro elemento importante en el proceso de invasión celular es el EGFR, receptor cuyo material genético se encuentra mutado en más del cincuenta por ciento de los pacientes con GBM [53] y al cual se le ha atribuido el poder desencadenar las señales necesarias para la formación de las invadopodia, su maduración y la degradación de la MEC, esto lo logra mediante la activación de moléculas como son SRC, ERK1/2, ROCK y RhoG entre otras. [54,55]

Para que se lleve a cabo la degradación de la MEC se requiere que las células produzcan, liberen y activen una gran variedad de enzimas que favorecerán la migración y la diseminación tumoral. Estas enzimas con actividad de proteasas son secretadas en condiciones tumorales por células sanas adyacentes al tumor o por las mismas células tumorales, en ambos casos se necesita de la estimulación de la célula por la presencia de citocinas y/o factores de crecimiento. [56]

Es importante mencionar que la degradación de MEC es un proceso que ocurre de manera regulada bajo condiciones fisiológicas normales, permitiendo un recambio continuo de sus componentes (colágena de tipo IV, glucoproteínas y proteoglucanos). Sin embargo, en tejidos tumorales la actividad proteolítica se encuentra aumentada en comparación con un tejido normal. [57]

Se ha clasificado a las proteasas de MEC en 4 subfamilias de la siguiente manera:

1. Serina proteasas
2. Aspartilo proteasas
3. Cisteína proteasas
4. Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP)

La última subfamilia es de gran importancia para el proceso de invasión, sobretodo en GBM, pues se ha encontrado una relación positiva entre la capacidad invasiva de las células tumorales y una alta expresión de las MMPs. [6]

Las MMPs son enzimas sintetizadas como zimógenos que se activan, a pH neutro o ligeramente alcalino, a partir de la ruptura enzimática del enlace azufre-zinc. Estas enzimas desempeñan su función en procesos de remodelación tisular entre los que se encuentran el crecimiento embrionario, la cicatrización, la ovulación y el crecimiento y reabsorción ósea. La expresión anormal o desregulada de estas enzimas se relaciona con procesos patológicos como la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la invasión tumoral y la metástasis. [58] A la fecha se han identificado 15 tipos de MMPs, sin embargo, en GBM se da mayor importancia a la MMP2 y la MMP9. [59]

Diversas investigaciones han demostrado que existen varios factores que participan en el mantenimiento y progresión de los GBMs confiriéndoles un fenotipo migratorio e invasivo, entre estos factores las hormonas juegan un papel importante, [6,7,41,49] sin embargo, se sabe muy poco sobre la acción de los metabolitos de estas hormonas en la progresión de un GBM.

4.4. Alopregnanolona (3 α -THP)

4.4.1. Generalidades

La alopregnanolona (3 α -THP) es un metabolito de la progesterona (P₄) que se sintetiza en tejido esteroideogénicos: ovario, testículo y glándulas adrenales. [30] Al inicio de la década de 1980, se descubrió que en el cerebro se puede realizar la síntesis de *novoo* de esteroides [31], este suceso sumado a la confirmación de la

presencia de enzimas esteroideogénicas en neuronas y en células gliales [32] demuestran la importancia de los esteroides en el cerebro.

Estudios recientes demuestran que la 3α -THP tiene funciones importantes en el cerebro en condiciones fisiológicas, entre las que se encuentran la regulación del estrés, la regulación del desarrollo de células gliales y neuronas, procesos de mielinización y procesos de memoria, [33, 34, 35, 36] y en condiciones patológicas tiene un efecto protector durante eventos neurodegenerativos como son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, lesiones cerebrales, isquemias cerebrales, entre otras. [37, 38, 39, 40]

Para que la P_4 y la 3α -THP lleven a cabo sus funciones reguladoras o protectoras deben desencadenar diferentes eventos celulares al unirse a 4 diferentes estructuras celulares entre las que se encuentran: 1) Receptores intracelulares específicos, 2) Receptores de membrana, 3) Sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores y 4) Canales iónicos. [7, 41] En el caso específico de la 3α -THP se han identificado 3 mecanismos principales por los cuales ejerce su acción en el SNC. Estos mecanismos son: a) La regulación alostérica de los receptores GABA_A en neuronas maduras y en células neurales progenitoras, b) La unión a receptores membranales de progesterona (mRP) en células gliales y c) La unión con el receptor de Pregnano X (PXR) en diferentes áreas del SNC [7]; mecanismos que se desarrollaran en un apartado posterior.

El uso de la P_4 y de la 3α -THP o de sus derivados como un auxiliar en los tratamientos de diversas patologías en el SNC aún se encuentra en discusión debido a su corta vida media y las diversas acciones que estos compuestos ejercen en el organismo. [42]

4.4.2. Síntesis de la 3α -THP

La 3α -THP, cuyo nombre químico es 5α -Pregnan- 3α -ol-20-ona, es un compuesto derivado del colesterol cuya estructura se compone de 21 átomos de carbono y tiene un peso molecular de 318.49 g/mol. (Fig. 1)

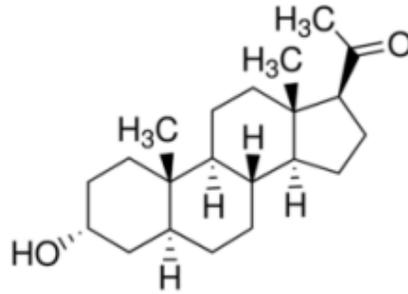


Fig. 1 Estructura Química de la 3 α -THP

La síntesis de la 3 α -THP, así como de su precursor (P₄) está altamente compartimentalizada. El paso inicial para la biosíntesis de la P₄ es la translocación del colesterol citoplásmico hacia el interior de la membrana mitocondrial, este proceso es regulado por la proteína translocadora (TSPO) de 18 kDa. En el interior de la membrana, el colesterol es convertido en pregnenolona por acción del citocromo P450 (P450_{scc} o CYP11A1). [43] Posteriormente la pregnenolona es exportada por difusión al citoplasma y, por efecto de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), es metabolizada a P₄. (Fig. 2)

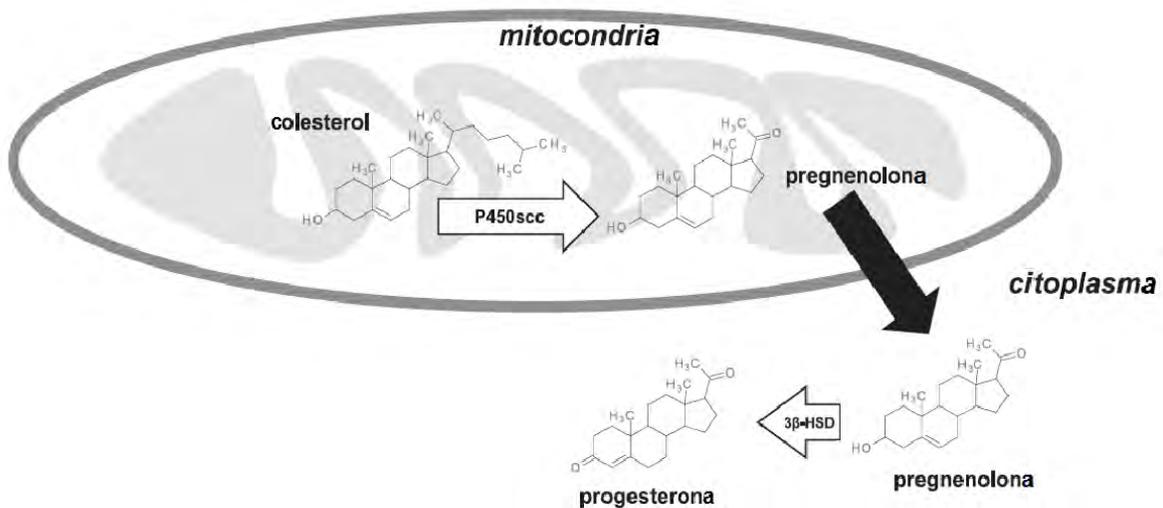


Fig. 2 Biosíntesis de Progesterona (P₄). La enzima P450 (P450_{scc} o CYP11A1) se localiza en la membrana interior de la mitocondria y convierte al colesterol en pregnenolona. En el citoplasma (difusión marcada con flecha rellena) la pregnenolona es metabolizada a P₄, por efecto de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). [Modificado de 43]

La P_4 sintetizada sirve como precursor principal para los neuroesteroides 5α y 3α reducidos activos. [44] En el SNC las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos cuentan con las enzimas necesarias para metabolizar a la P_4 . Se puede separar a la conversión de P_4 en 3α -THP en 2 sucesos principales (Fig.3). 1) La reducción irreversible de P_4 , por medio de la enzima 5α -reductasa (5α -R), a 5α -dihidroprogesterona (5α -DHP), esta reacción es reguladora y limitante del metabolismo de P_4 a 3α -THP. 2) Posteriormente la 5α -DHP se reduce debido a la acción de la enzima 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HSD) a 3α -THP. [36, 43]

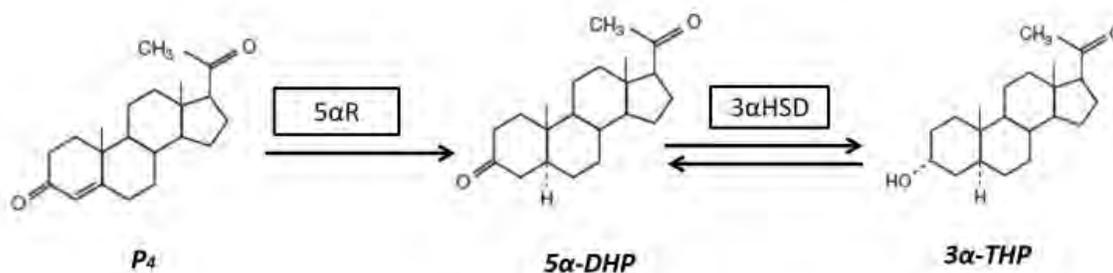


Fig. 3 Síntesis de la 3α -THP. La enzima 5α -reductasa (5α -R) cataliza la conversión de P_4 a 5α -dihidroprogesterona (5α -DHP), así mismo la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HSD) convierte a la 5α -DHP en 3α -THP. [Modificado de 36]

4.4.3. Mecanismos de acción de la 3α -THP

Como ya se ha mencionado la 3α -THP es un metabolito al que se le han comprobado varias funciones en el SNC y en el SNP. Se han identificado diversos mecanismos por los cuales la 3α -THP lleva a cabo sus funciones, en cuanto a su efecto neuroprotector se ha estudiado la participación de dos mecanismos probables, la modulación alostérica del receptor $GABA_A$ en neuronas maduras o la unión a los receptores membranales a P_4 (mRPs) en células gliales. [7] Además se ha reportado la interacción que tiene la 3α -THP con el receptor de pregnano X (PXR), interacción que, aunque aún no se entiende del todo, se ha visto participa en la regulación de la plasticidad neural y en el comportamiento. [45]

La 3 α -THP al igual que la P₄ puede ejercer su efecto en la membrana plasmática mediante su unión a los mRPs, receptores acoplados a proteínas G, actuando como agonista y activando segundos mensajeros para así controlar procesos de muerte celular, movimiento, desarrollo embrionario y neuroprotección. Se han identificado cinco subtipos de este receptor: mRP α , mRP β , mRP γ , mRP δ y mRP ϵ . Los mRP α , mRP β y mRP γ se encuentran acoplados a proteínas del tipo G inhibitoras (Gi), por otro lado los mRP δ y mRP ϵ están acoplados a proteínas del tipo G estimuladoras (Gs). En diversos estudios se ha reportado que este tipo de receptores se encuentra altamente expresado en el SNC y se ha observado que cada subtipo está distribuido en diferentes zonas del cerebro, haciendo notar que los subtipos mRP β y mRP δ son aquellos que tienen una mayor expresión. [46]. Es importante destacar que la afinidad de la 3 α -THP hacia los mRPs es diferente dependiendo del subtipo, así mismo, se observa una menor afinidad por parte del metabolito en comparación con la afinidad de la P₄. (Tabla 1) [46]

mRP	Progesterona		Alopregnanolona	
	IC ₅₀	RAU	IC ₅₀	RAU
mPR α	26.3 \pm 5.9	100	404 \pm 73	6.51
mPR β	29.2 \pm 4.5	100	559 \pm 89	5.22
mPR δ	50.8 \pm 17.3	100	151 \pm 47	33.64
mPR ϵ	101.6 \pm 20.1	100	2561 \pm 505	4.00

IC₅₀ es la concentración del competidor (nM) que causa el desplazamiento al 50 % de [³H]-P₄. Cada valor representa la media de al menos 3 ensayos de competencia de unión independientes. RAU es la afinidad de unión relativa comparada con el valor de progesterona en porcentaje. [Modificado de 46]

Al contrario de sus precursores la 3 α -THP no se une al receptor intracelular a progesterona (RP), sin embargo, se ha observado que puede ejercer su efecto en el SNC al ser un modulador positivo del receptor GABA_A. Para ello la 3 α -THP

reconoce 2 sitios de unión en el receptor y prolonga el tiempo de apertura de los canales de iones cloruro de este, favoreciendo así la transmisión de señales inhibitorias en el SNC. [47]

La 3 α -THP induce la proliferación en células progenitoras neurales mediante el receptor GABA_A pues al permitir el eflujo de iones cloruro de la célula ocurre la despolarización de la membrana y se activan canales de iones calcio. Este suceso incrementa la cantidad de iones calcio intracelular activando una cinasa dependiente de calcio que fosforila y activa el factor de transcripción CREB1. Es mediante este factor de transcripción que ocurre la regulación a la alta de genes requeridos para la transición de fases en el ciclo celular, además, algunos genes represores de la división celular se presentan regulados a la baja, esto promueve la mitosis celular explicando el efecto positivo de la 3 α -THP en la proliferación celular, proceso que en cáncer se encuentra altamente desregulado. [48]

4.5. Efectos de la 3 α -THP en líneas celulares derivadas de Glioblastomas humanos

Un GBM, al igual que muchos otros tumores, es una estructura heterogénea, es decir está compuesto de células de diferente fenotipo y genotipo producto de la inestabilidad genética que caracteriza a los tejidos cancerosos. Es debido a estas diferencias, aparentemente mínimas, que se realizan investigaciones *in vitro* para conocer el comportamiento que tendrá un tipo de célula ante cierto estímulo.

En el caso de la 3 α -THP se han realizado estudios en nuestro laboratorio referentes a su efecto en células U87 enfocados en la expresión de algunos genes cuyos productos son componentes del citoesqueleto, factores de transcripción, y proteínas encargadas de mantener la estabilidad del ADN, así como ensayos bioinformáticos para identificar elementos reguladores de los mismos; se encontró que la 3 α -THP promueve la expresión de genes involucrados en la replicación del ADN y en la reorganización del citoesqueleto. Entre estos genes se destaca la expresión de ROCK1 y ROCK2, elementos involucrados en la invasión y la

migración celular, interesantemente, los estudios bioinformáticos identifican sitios de unión a factores de transcripción como PXR y CREB1 en los promotores de los genes de ROCK1 y ROCK2. [49]

En otros estudios se ha comprobado que tanto la P₄ como la 3 α -THP contribuyen en el crecimiento de los GBM, en específico de células de la línea U87 pues favorecen la viabilidad celular y promueven la proliferación mediante genes involucrados en la progresión del cáncer, específicamente el Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1), EGFR, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y Ciclina D1. [7]

5. Planteamiento del Problema

Se ha observado que la 3α -THP incrementa el número de células y la proliferación de células derivadas de glioblastomas, además promueve el crecimiento de los glioblastomas mediante la expresión de genes involucrados en la progresión del cáncer. Sin embargo, se desconoce el efecto de este metabolito de P_4 en la migración e invasión de células derivadas de GBM humano.

6. Hipótesis

Si el tratamiento con 3α -THP incrementa la capacidad de movimiento de las células U87 y U251, entonces favorecerá la migración e invasión de las mismas.

7. Objetivos

7.1. Objetivo General

Conocer el efecto de la 3α -THP en la migración e invasión de las células U87 y U251 derivadas de GBM humanos.

7.2. Objetivos Particulares

- Comparar el efecto de la P_4 y de la 3α -THP en la migración e invasión de células derivadas de GBM humanos.
- Determinar si el efecto de la 3α -THP depende del tipo celular analizado.

8. Metodología

8.1. Cultivo Celular

Se realizó el cultivo de células U87 y U251, ambas líneas celulares provenientes de GBM obtenidas de la ATCC, en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato (1 mM), glutamina (2 mM) y aminoácidos no esenciales (0.1 mM). Las células se mantuvieron en condiciones de 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

8.2. Tratamientos hormonales.

Para observar el efecto de la 3 α -THP en la migración de las líneas celulares U87 y U251 se utilizaron los siguientes tratamientos:

- Vehículo (0.01% DMSO)
- P₄ (10 nM)
- 3 α -THP (10 nM)

Se utilizó el tratamiento con P₄ como un control positivo, pues se ha reportado anteriormente que a la concentración usada (10 nM) induce la migración en células derivadas de GBM humano. [7] En cuanto a la 3 α -THP, en otros estudios se ha reportado que la concentración de 10 nM tiene efectos en la proliferación y la expresión de diversos genes en células derivadas de GBM. [7]

8.3. Ensayo de migración.

Para determinar los efectos de la 3 α -THP y la P₄ sobre el proceso de migración celular se utilizó el ensayo de "Scratch" o "cierre de herida". En cajas de Petri de 6 pozos se sembraron 350,000 células por pozo utilizando medio DMEM suplementado como se describió anteriormente y se incubaron hasta obtener una confluencia celular de aproximadamente 70%. Posteriormente, 24 horas antes de los tratamientos el medio se reemplazó por medio DMEM sin rojo de fenol y suplementado con SFB libre de hormonas. A continuación se utilizó una punta de pipeta de 200 μ L para generar una herida o "Scratch" en la monocapa de células. Las células que fueron desprendidas se retiraron con PBS y de nuevo a las células

restantes se les puso medio DMEM sin rojo de fenol. Se agregó arabinosilcitosina (Ara-C) (10 μ M) para inhibir la síntesis de ADN y después de 1 hora de incubación se añadieron los tratamientos. A partir de este momento se tomaron fotos en el área del “Scratch” a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X.

8.4. Ensayo de invasión.

Para determinar los efectos de la 3α -THP y la P_4 sobre la capacidad invasiva de las células se utilizó una cámara de cultivo llamada inserto, en la parte inferior de la cámara se localiza una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μ m que permite el paso de las células para su estudio. En dicho inserto se colocó una matriz (Matrigel) que asemeja las condiciones de la MEC y sobre ella se siembran las células. El inserto es colocado dentro de un pozo de una caja de cultivo generando dos compartimentos. Las células deben invadir la matriz y llegar al fondo del inserto segundo compartimento el cual contiene medio DMEM suplementado con SFB al 10% cuya función es la de quimioatrayente celular.

Para este ensayo, las células U87 y U251 se cultivaron utilizando medio DMEM suplementado como se describió anteriormente hasta obtener una confluencia de 80%. Se les reemplazó el medio por DMEM sin rojo fenol y adicionado con SFB al 10% libre de hormonas 24 horas antes del ensayo. En ese tiempo se colocó el Matrigel (Sigma-Aldrich, USA) en el inserto haciendo una dilución con medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB a una concentración final de 2 mg/mL. Se colocaron los insertos (Corning, USA) en cajas de cultivo de 24 pozos y se incubaron por 3h 37 °C para permitir la gelificación del Matrigel. Posteriormente, por cada inserto se sembraron 30,000 células suspendidas en 150 μ L de medio DMEM sin rojo de fenol y sin SFB, se les adicionó Ara-C (10 μ M) y los tratamientos correspondientes antes indicados. En el compartimento inferior al inserto se colocaron 600 μ L de medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas y se incubaron las células a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente se retiraron el medio y el Matrigel del inserto y se realizó un lavado con PBS. Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA, 4%) por 20 minutos y

se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 15 minutos y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS por 10 minutos cada uno. Los insertos se dejaron secar y se observaron 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, aquellas que atravesaron el Matrigel, se contaron las células de 2 campos tomados al azar por cada inserto.

8.5. Análisis estadístico.

Por cada ensayo de migración se tomaron 4 campos aleatorios en la zona de "Scratch", se tomaron fotos a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas en el área y se cuantificaron las células que migraron en esta zona. Se realizó el análisis de los datos de migración mediante el programa Graph Pad Prism 5 utilizando un ANOVA de 2 vías seguida de una prueba de Bonferroni para efectuar la comparación de los estímulos con el vehículo.

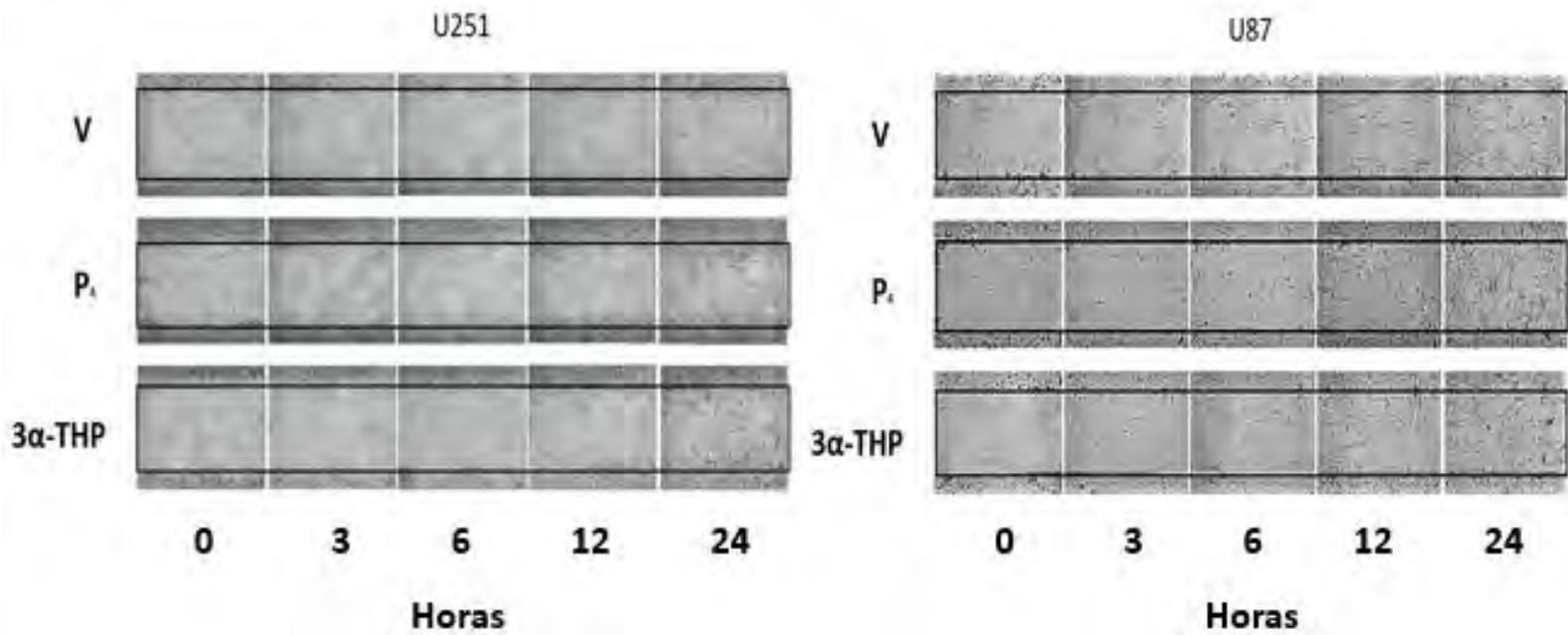
Para cada ensayo de invasión se cuantificó el número total de células invasoras, es decir aquellas que atravesaron el Matrigel y lograron llegar al fondo del inserto. Se realizó el análisis de los datos de este ensayo utilizando un ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Bonferroni.

9. Resultados

Inicialmente se evaluó el efecto de la P_4 y la 3α -THP sobre la migración de células de las líneas U251 y U87 utilizando el ensayo de "Scratch". En ambos casos se observó que tanto la P_4 como la 3α -THP aumentan significativamente la cantidad de células que migran a la herida a partir de las 12 horas en comparación con el tratamiento con vehículo. Además se observa que este incremento es similar al tratar las células con P_4 o con su metabolito (Fig. 4).

Posteriormente se evaluó el efecto de la 3α -THP y la P_4 en la capacidad invasiva de las células U251 y U87 utilizando el ensayo de invasión en Transwell. En ambas líneas celulares se observa un aumento significativo en la cantidad de células capaces de invadir la MEC en comparación con el vehículo a las 24 horas de haber sido tratadas. Cabe destacar que se observa una mayor cantidad de células con capacidad invasiva al realizar los ensayos con células de línea U251 en comparación con la línea celular U87.

A)



B)

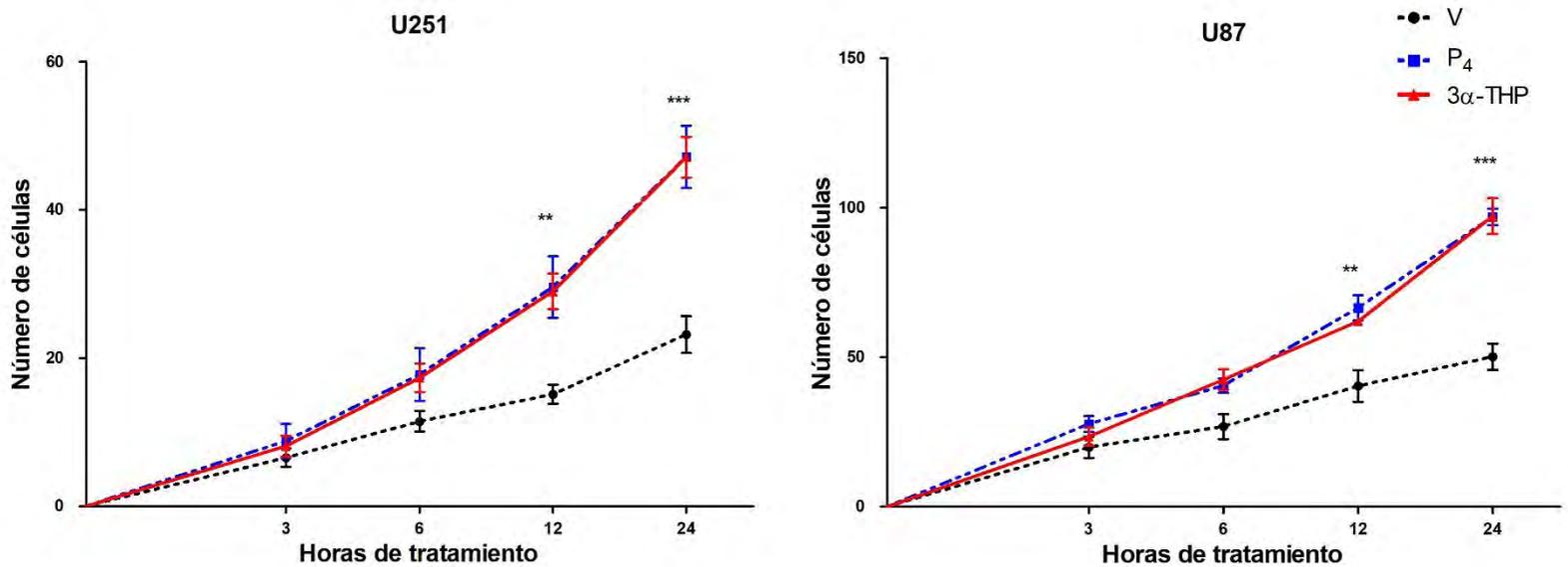


Fig. 4 Efecto de la alopregnanolona (3α-THP) en la migración de células derivadas de GBM. A) Fotografías representativas del ensayo de “herida” tomadas a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas a partir del tratamiento con vehículo (0.01% DMSO), P₄ (10 nM) y 3α-THP (10 nM; B) . Se realizó el análisis de los datos utilizando un ANOVA de 2 vías seguida de una prueba Bonferroni. El gráfico representa el número de células que migran a la herida. (**) P < 0.01 vs el vehículo (V). (***) P < 0.001 vs vehículo. Los resultados de la gráfica representan la media ± SEM. n = 3

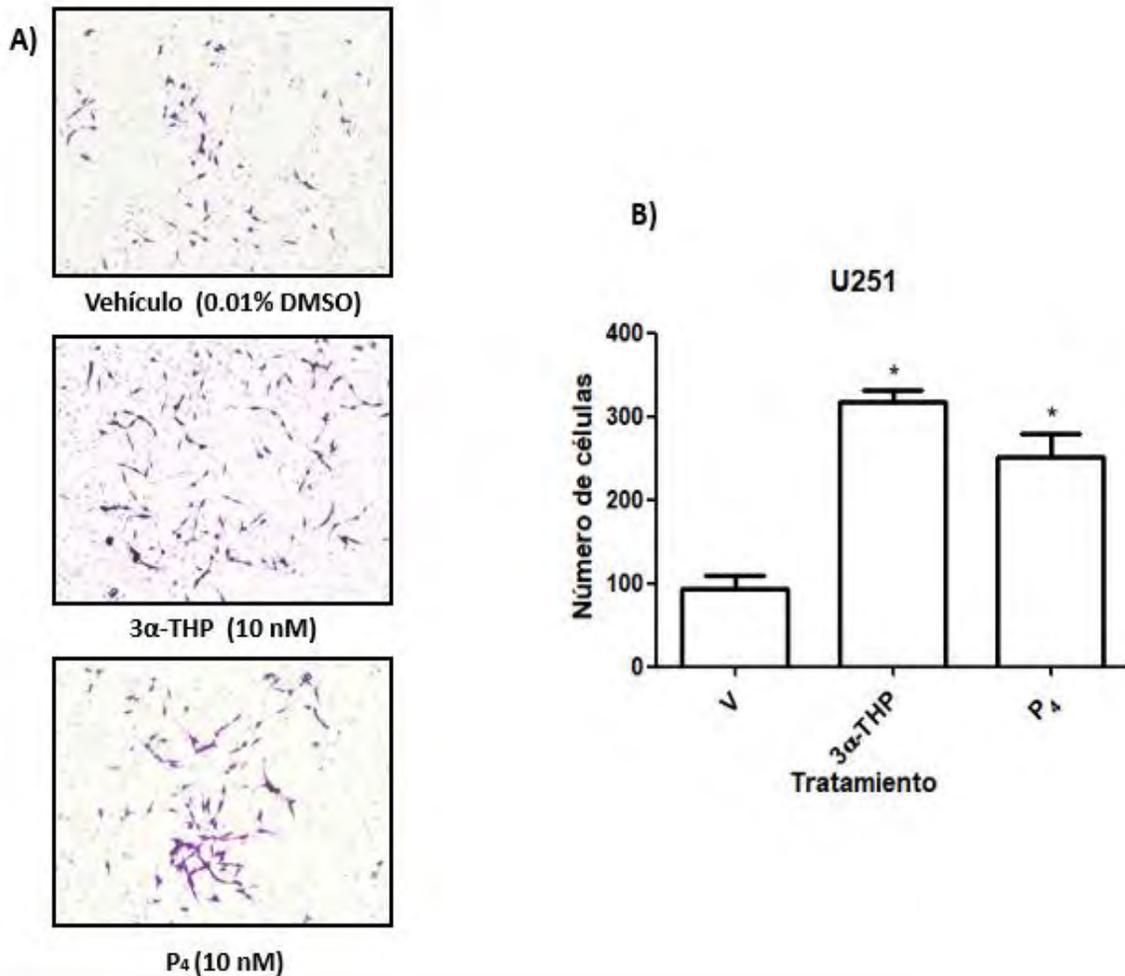


Fig. 5 Efecto de la alopregnanolona (3 α -THP) en la invasión de células U251. A) Fotografías representativas del ensayo de invasión de transwell tomadas a las 24 horas a partir del tratamiento con vehículo (0.01% DMSO), P₄ (10 nM) y 3 α -THP (10 nM); B) Conteo del número de células que invadieron el gel de MEC, gráficas obtenidas de 3 experimentos independientes. Se realizó el análisis de los datos utilizando un ANOVA de 1 vía seguida de una prueba Bonferroni. Los resultados de la gráfica representan la media \pm SEM. (*) $P < 0.01$ con respecto al vehículo.

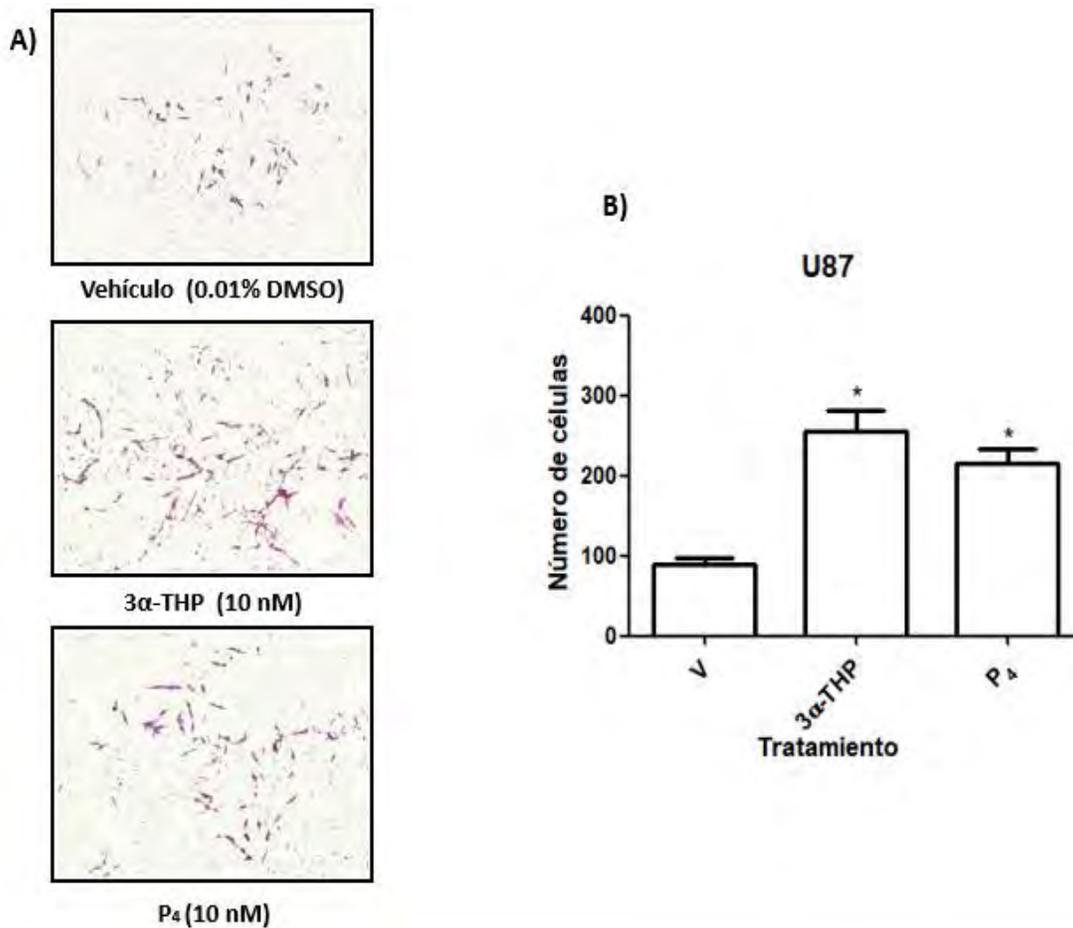


Fig. 6 Efecto de la alopregnanolona (3 α -THP) en la invasión de células U87. A) Fotografías representativas del ensayo de invasión de transwell tomadas a las 24 horas a partir del tratamiento con vehículo (0.01% DMSO), P₄ (10 nM) y 3 α -THP (10 nM); B) Conteo del número de células que invadieron el gel de MEC, gráficas obtenidas de 3 experimentos independientes. Se realizó el análisis de los datos utilizando un ANOVA de 1 vía seguida de una prueba Bonferroni. Los resultados de la gráfica representan la media \pm SEM. (*) P < 0.01 vs vehículo.

10. Discusión

El término migración celular se refiere a un proceso común que efectúan las células para trasladarse de un lugar a otro en respuesta a diferentes situaciones. En condiciones fisiológicas normales algunas de estas situaciones pueden ser la necesidad de obtener alimento, la presencia de factores quimioatrayentes que le informen a la célula que su presencia es requerida en otro sitio para efectuar una acción determinada, o su movilización para conformar nuevos tejidos, entre otras. En condiciones patológicas, la migración celular puede verse comprometida al ser inducida por señales de migración anormales perjudicando la homeostasis del tejido y la salud del individuo, tal es el caso en enfermedades causadas por alteraciones inmunológicas o por metástasis. [60]

La invasión celular implica el avance a través de las barreras de los tejidos, acción para la cual procesos como la adhesión celular y la degradación de MEC, así como su regulación, es muy importante. Cabe resaltar la estrecha relación que existen entre los procesos de migración e invasión celular de tal manera que esta última necesita de la existencia de la primera para llevarse a cabo, situación que de manera contraria no es necesaria. [51]

Como ya se ha mencionado, los GBM, así como otros tipos de tumores, presentan una gran capacidad infiltrativa a los tejidos circundantes, proceso en el cual están involucrados la migración y la invasión celular. Esta cualidad les hace más resistentes a las terapias existentes entre las que se encuentran la remoción quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. [61] Por lo anterior en este trabajo nos interesó conocer el efecto que la 3α -THP y la P_4 ejerce en estos dos procesos importantes para la progresión del tumor.

Se puede observar en la Fig. 4 que tanto la 3α -THP como su precursor, la P_4 , inducen la capacidad de migración en células derivadas de GBM. Además, el efecto generado por ambos estímulos se lleva a cabo con una magnitud y

tendencia similar, esto nos indica que probablemente existe un mecanismo de acción en común que favorece la TEM de la célula confiriéndole un fenotipo móvil. Cabe destacar que el aumento en el número de células se debe únicamente a la inducción del fenotipo móvil y no a un proceso de proliferación pues para evitar este suceso se utilizó en los ensayos el compuesto denominado como Ara-C el cual es un inhibidor en la síntesis de ADN. Este compuesto al ser similar al nucleósido citidina puede ser internalizado a la célula por un transportador de nucleósidos, una vez en el citoplasma puede ser fosforilado e incorporado al ADN, esta incorporación actúa inhibiendo la acción de las ADN polimerasas α , β y δ interfiriendo con la elongación en la replicación y la reparación de las cadenas de material genético. [62]

Como ya se mencionó, la infiltración de las células de un GBM no solo depende de la capacidad motil de la célula, es un proceso más complejo que involucra la acción de proteínas, como las MMPs, que degraden la MEC. Es por eso que se decidió evaluar la capacidad invasiva de las células mediante el ensayo de invasión de Transwell. En las Figs. 5 y 6 se muestra el efecto positivo que la 3α -THP y la P_4 ejercen sobre la capacidad invasiva de ambas líneas celulares derivadas de glioblastoma.

Es importante hacer notar que la P_4 ejerce sus efectos mediante dos tipos de vías principales. 1) La vía clásica en la que la P_4 interactúa con su receptor (RP) en el núcleo o citoplasma de la célula e induce un cambio en la expresión de genes [63] 2) La vía no clásica en la que la P_4 actúa como agonista de los mRPs, receptores acoplados a proteínas G que activan segundos mensajeros para llevar a cabo su función mediante la activación de diferentes vías de señalización. Interesantemente la 3α -THP es incapaz de interactuar con el RP [46], descartando así que este receptor sea el responsable directo de sus efectos.

Se sabe que la 3α -THP y la P_4 son capaces de unirse a los mRPs para generar sus acciones, aunado a esto, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio con células de las líneas celulares U87 y U251 utilizando al compuesto Org OD 02-0, agonista específico de los mRPs [64] han demostrado la participación de estos receptores en el aumento de la capacidad migratoria e invasiva de estas células derivadas de GBM, confirmando así la importancia de los mRPs en la progresión de los GBM.

Dada la alta afinidad de la 3α -THP por el mRP δ , es probable que la activación de este subtipo de receptor sea el responsable de los efectos observados en los ensayos de invasión y migración [46, 68] El mRP δ se encuentra acoplado a proteínas Gs y activa a la enzima adenilato ciclasa aumentando la concentración de AMP cíclico (cAMP) intracelular, éste activa a la proteína cinasa A (PKA) que a su vez fosforila y activa a CREB, factor de transcripción cuya acción reguladora en genes involucrados en procesos de migración e invasión, como ROCK 1 y 2, ha sido demostrada mediante el análisis bioinformático de identificación del sitio de unión de factores de transcripción realizado en nuestro laboratorio. [49]

Por otro lado, se ha observado en células gliales provenientes de ratas que el estímulo con 3α -THP (1 nM) favorece la activación de Src y FAK mediante el receptor GABA-A [65]. Por si sola Src es capaz de promover la expresión de MMP9 mediante las vías de señalización de ERK y PI3K [66]. De manera similar, el complejo FAK-Src favorece la regulación a la alta y la activación de MMP 2 y MMP 9 mediante la activación de la vía paxilina/Rac/JNK. [67] Estos eventos nos ayudan a explicar el aumento de la invasión de ambas líneas celulares en las Figs. 5 y 6 con el tratamiento de 3α -THP, pues el efecto generado por este tratamiento podría no limitarse a la activación única de los mRPs, complementándose con la participación de GABA-A, receptor que con el tratamiento de P_4 es incapaz de ejercer un efecto. [68]

Con base en nuestros resultados, se sugiere que la regulación de los procesos de migración e invasión por parte la P_4 y la 3α -THP se efectúa por mecanismos diferentes en función de los receptores a los que cada esteroide activa, por lo que estudios de silenciamiento de estos receptores (mRP δ y GABA $_{-A}$) podrían ser efectuados para entender mejor el efecto de la hormona y su metabolito.

11. Conclusión

La 3α -THP y la P_4 inducen un aumento en la motilidad y en la capacidad invasiva de las líneas celulares U87 y U251, favoreciendo el comportamiento agresivo que caracteriza a los GBM.

12. Referencias

[1] F.B. Furnari, T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, W.K. Cavenee, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes & Development* 21 (2007) 2683–2710.

[2] Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery* 95. (2001) 190–198

[3] Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clinical Oncology* 20. (2002) 1375– 1382.

[4] Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110. (2013) 4009–14

[5] P. Friedl, E.B. Brocker, The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix, *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 (2000) 41–64.

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

[7] C.J. Zamora-Sánchez, V. Hansberg-Pastor, I. Salido-Guadarrama, M. Rodríguez-Dorantes, I. Camacho-Arroyo, Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells, *Steroids* 119. (2017) 36-42

[8] D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, International Agency for Research on Cancer (2007)

[9] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, T. Vecchione-Koval et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014, *Neuro-Oncology* 19. (2017) v1-v88

[10] D.R. Johnson, P.D. Brown, E. Galanis, J.E. Hammack, Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, *Journal of Neuro-Oncology* 108 (2012) 187-193

[11] E. Gillet, A. Alentorn, B. Doukouré, E. Mundwiller, et al. TP53 and p53 status and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 118 (2014) 131-139

[12] J. Zhang, T. Chen, Q. Mao, J. Lin et al. PDGFR- β -activated ACK1-AKT Signaling Promotes Glioma Tumorigenesis. *International Journal of Cancer* 136 (2015) 1769-1780

[13] H. Ohgaki, P. Kleihues, Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 170 (2007) 1445-1453

[14] B.K. Rasheed, R.E. McLendon, H.S. Friedman, et al. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10 (1995) 2243-2246

[15] D. Fults, C. Pedone, Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* 7 (1993) 173-177

[16] D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, W.C. Hall, et al. *Neurociencia. Editorial Médica Panamericana*, 2008, 3a edición. España, 850-855

[17] H. Ohgaki, P., Kleihues, Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 64 (2005) 479-489

[18] G. Mariniello, C. Peca, M.B. De Caro, A. Giamundo, R. Donzelli, F. Maiuri, Glioblastoma in the elderly: the impact of advanced age on treatment and survival. *Journal of Neurological Surgery: Central European Neurosurgery* 75 (2014) 276-281

[19] H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Research* 64. (2004) 6892-6899.

[20] C.R. Justus. N. Leffler, M. Ruiz-Echeverria, L.V. Yang. In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments* 88. (2014)

[21] C.H. Graham, I. Connelly, J.R. MacDougall, et al. Resistance of Malignant Trophoblast Cells to both the Anti-proliferative and Anti-invasive Effects of Transforming Growth Factor- β . *Experimental Cell Research* 214. (1994) 93-99.

[22] L. Li, W. Li. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics and differentiation. *Pharmacology & Therapeutics* 150. (2015) 33-46.

[23] S. Lindsey, S.S. Langhans. Crosstalk of oncogenic signaling pathways during epithelial-mesenchymal transition. *Frontiers in oncology* 4. (2014) eCollection.

[24] J. Yang, R.A. Weinger. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell* 14. (2008) 818-829

[25] S. Lamouille, J. Xau, R. Derynck. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular cell biology* 15. (2014) 178-196.

[26] M. Yilmaz, G. Chiriofori. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* 28. (2009) 15-33.

[27] P.Z. Anastasiadis, A.B. Reynolds. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Current Opinion in Cell Biology* 13. (2001) 604-610.

[28] E. Makrodouli, et al. BRAF and RAS oncogenes regulates Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Molecular Cancer* 10 (2011)

- [29] V.M. Zohrabian, et al. Rho/ROCK and MAPK Signaling Pathways Are Involved in Glioblastoma Cell Migration and Proliferation. *Anticancer Research* 29 (2009) 119-123
- [30] M. Ficher, E. Steinberger. In vitro progesterone metabolism by rat testicular tissue at different stages of development. *European Journal of Endocrinology* 68 (1971) 285-292
- [31] R.C. Melcangi, G.C. Panzica. Allopregnanolone: State of the art. *Progress in Neurobiology* 113 (2014) 1-5
- [32] G. Pelletier. Steroidogenic Enzymes in the Brain: Morphological Aspects. *Progress in Brain Research* 181 (2010) 193-207
- [33] C. Glachino, M. Galbiati, A. Fasolo, P. Peretto, R. Melcangi. Neurogenesis in the Subependymal Layer of the Adult Rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1007 (2003) 335-339
- [34] L.M. García-Segura, S. Luqín, A. Párducz, F. Naftolin. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10 (1994) 59-69
- [35] J.R. Chan, P.M. Rodríguez-Waitkus, B.K. Ng, P. Liang, M. Glaser. Progesterone Synthesized by Schwann Cells during Myelin Formation Regulates Neuronal Gene Expression. *Molecular Biology of the Cell* 11 (2000) 2283-2295
- [36] M. Shumacher, R. Hussain, N. Gago, J.P. Oudinet, C. Mattern, A.M. Ghomari. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in neuroscience* 6 (2012)
- [37] M. Bourque, D.E. Dluzen, T. Di Paolo. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30 (2009) 142-157

[38] R.D. Brinton. Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology* 9 (2013) 241-250

[39] L. Garay, M. C. Gonzalez, M. Meyer, et al. Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research* 1283 (2009) 177-185

[40] D. G. Stein. Progesterone in the treatment of acute traumatic brain injury: a clinical perspective and update. *Neuroscience* 191 (2011) 101-106

[41] G. González-Agüero, A. A. Gutiérrez, D. González-Espinosa, J.D. Solano, R. Morales, A. González-Arenas, E. Cabrera-Muñoz, I. Camacho-Arroyo. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32 (2007) 129-135.

[42] M. Hovakimyan, F. Maass, J. Petersen, C. Holzmann, M. Witt, et al. Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann–Pick Type C1 mice. *Neuroscience* 252 (2013) 201-211.

[43] C. Schüle, C. Northdurfter, R. Rupprecht. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in Neurobiology* 113 (2014) 79-87

[44] S. Doodipala. Neurosteroids and their role in sex-specific epilepsies. *Neurobiology of disease* 72PB (2014) 198–209.

[45] C. A. Frye, C. J. Koonce, A. A. Walf. Involvement of pregnane xenobiotic receptor in mating-induced allopregnanolone formation in the midbrain and hippocampus and brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus among female rats. *Psychopharmacology* 231 (2014) 3375-3390

[46] Y. Pang, J. Dong, P. Thomas. Characterization, Neurosteroid Binding and Brain Distribution of Human Membrane Progesterone Receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ Involvement in Neurosteroid Inhibition of Apoptosis. *Endocrinology* 154 (2013) 283-295

- [47] A. M. Hosie, M. E. Wilkins, et al, Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444 (2006) 486-489
- [48] R. D. Brinton, Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nature reviews Endocrinology* 9 (2013) 241-250
- [49] C.J. Zamora-Sánchez, A. Del Moral-Morales, A. M. Hernández-Vega, V. Hansberg-Pastor, I. Salido-Guadarrama, M. Rodríguez-Dorantes, I. Camacho-Arroyo, Allopregnanolone Alters the Gene Expression Profile of Human Glioblastoma Cells. *International journal of molecular sciences* 19 (2018)
- [50] A.M. Weaver, Invadopodia: Specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis* 23 (2006) 97-105
- [51] M. Yilmaz, G. Christofori, EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis review* 28 (2009) 15-33
- [52] C.L., et al, Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodias dynamics and breast cancer cell invasion. *Journal of Cellular Biology* 180 (2008) 957-971
- [53] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Natures* 455 (2008) 1061-1068
- [54] C.C. Mader, M. Oser, et al. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodias and breast cancer cell invasion. *Cancer Research* 71 (2011) 1730-1741
- [55] Z. Lu, G. Jiang, et al. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasión and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and Cellular Biology* 21 (2001) 4016-4031

[56] E. I. Roa, H. M. Villaseca, J. C. Araya, et al. Moléculas de adhesión celular y cáncer. *Revista Chilena de cirugía* 53 (2001) 504-510.

[57] I. Iser, M. Perreira, G. Lenz, et al. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in Glioblastoma: An update systematic review and in silico investigation. *Medicinal Research Reviews* 37 (2017) 271-313

[58] C. Hagemann, J. Anacker, G. Vince, et al. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World Journal of Clinical Oncology* 3 (2012) 67-79.

[59] C. Wang, X. Tong, X. Jiang, et al. Effect of matrix metalloproteinase-mediated matrix degradation on glioblastoma cell behavior in 3D PEG. Based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105 (2016) 770-778.

[60] R. Horowitz, D. Webb, Cell migration. *Current Biology* 13 (2003) R756-R759

[61] C. Alifieris, D.T. Trafalis, Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics* 152 (2015) 63-82

[62] S.S. Cohen, The mechanisms of lethal action of arabinosyl cytosine (araC) and arabinosyl adenine (araA) *Cancer* 40. (1977) 509-518

[63] I. Camacho-Arroyo, O.T.Hernandez-Hernandez, E. Cabrera-Munoz. Role of Progesterone in Human Astrocytomas Growth. *Currents Topics in Medicinal Chemistry* 11 (2011) 1663-1667.

[64] G.E. Dressin, et al. Membrane Progesterone Receptors (mPRs) Mediate Progestin Induced Antimorbidity in Breast Cancer Cells and Are Expressed in Human Breast Tumors. *Hormones & Cancer* 3 (2012) 101-112

[65] S. Melfi, et al. Src and phospho-FAK kinases are activated by allopregnanolone promoting Schwann cell motility, morphology and myelination *Journal of Neurochemistry* 141 (2017) 165-178

[66] M. Guarino. Src signaling in cancer invasion. *Journal of Cellular Physiology* 223 (2010) 14-26

[67] S. Van Slambrouck, A. R. Jenkins, A. E. Romero, W. F. Steelant. Reorganization of the integrin alpha2 subunit controls cell adhesion and cancer cell invasion in prostate cancer. *International Journal of Oncology* 34 (2009) 17-26

[68] R. Guennoun, F. Labombarda, M.C. Gonzalez Deniselle. Et al. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 146 (2015) 48-61