



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DIRECCIÓN NACIONAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

**PAPEL DE LA PROGESTERONA EN LA
PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS
TUMORALES
DE
ASTROCITOMAS HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)

P R E S E N T A:

M. en C. Gabriela González Agüero

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Facultad de Medicina



MEXICO, DF

2008





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.

Este proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Este proyecto recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), No. 43224, así como una beca de estudios de doctorado del CONACyT (Reg. No. 124983).

***A mi familia y a
sus nuevos integrantes
que han traído con su
presencia mucha
alegría a mi vida.***

AGRADECIMIENTOS

***Dr. Ignacio Camacho Arroyo:**

Por haberme permitido desarrollar este proyecto, por sus enseñanzas personales y académicas durante todos estos años de trabajo.

***A los Doctores Alejandro García Carranca, Clorinda Arias, Iván Velasco y Gonzalo Castillo:**

Por su tiempo e interés para revisar este trabajo ya que sus comentarios y sugerencias sirvieron para mejorar y complementar mi tesis.

***A todos mis compañeros de laboratorio, a los que conocí durante el desarrollo de esta tesis.**

Por todos los gratos momentos compartidos, por que han enriquecido mi vida.

***A mis viejos y nuevos amigos:**

Por compartir su vida conmigo y por todos los momentos que han estado allí, por su apoyo en mis momentos alegres y los no tanto de mi vida, por sus consejos, por la complicidad convertida en secreto y por permitirme en mucho de los casos aceptarme como un miembro más en sus familias.

***Al CONACYT y Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas:**

Por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado

Abreviaturas

- SNC - *Sistema Nervioso Central.*
- P4 -*Progesterona.*
- RP -*Receptor a progesterona.*
- LH -*Hormona Luteinizante.*
- FSH -*Hormona Folículo estimulante.*
- AMPc -*Adenosina monofosfato cíclico.*
- Ca²⁺ -*Calcio.*
- GABAA - *Acido gama amino-butirico A.*
- MAPK -*Proteína cinasa activada por mitógenos.*
- RPm (α, β, δ) -*Receptor a progesterona membranal.*
- ERP -*Elemento de respuesta a progesterona.*
- RU486 - *Antiprogestageno Roussel-Uclaff 38486.*
- SMRT -*Mediador de silenciamiento del receptor a hormonas tiroideas y retinoico.*
- EGF -*Factor de crecimiento epidérmico.*
- TGF α, β - *Factor de crecimiento tumoral.*
- IGF - *Factor de crecimiento similar a la insulina.*
- CDK - *Cinasa dependiente de ciclina.*
- pRB -*Proteína de retinoblastoma.*
- DMEM - *Medio mínimo esencial Eagle's modificado por Dulbecco.*
- CO₂ -*Bióxido de carbono.*
- PBS - *Búfer de fosfatos.*
- EDTA - *Acido diamina etileno tetracético.*
- NaCl - *Cloruro de sodio.*
- nM, μ M -*nanomolar, micromolar.*
- TUNEL -*Transferasa terminal deoxinucleotidil uridina.*
- mA - *Miliamperes.*

INDICE

I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. ANTECEDENTES	11
4.1. Características estructurales y fisiológicas de la progesterona (P4).....	11
4.1.1. Mecanismos de acción de la P4 y de su antagonista (RU486).....	16
4.2 Efectos de la P4 en el ciclo celular	23
4.3 Tumores cerebrales.....	25
4.3.1 Astrocitomas.....	29
4.4 Efectos de la P4 y del RU486 en astrocitomas.....	32
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
VI. HIPÓTESIS	37
VII. OBJETIVOS	37
Objetivo General	37
Objetivos Específicos.....	37
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	38
8.1 Condiciones del cultivo	38
8.2 Análisis de proliferación celular.....	38
8.2.1. Estudio dosis respuesta de la P4 sobre el número de células de las líneas de astrocitoma humano U373 y D54.....	38
8.2.2. Estudio dosis respuesta del RU486 sobre el número de células de las líneas U373 y D54....	39
8.3. Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo.....	40
8.4. Estudio de muerte celular programada.....	40
8.5. Western Blot.....	41
8.6. Análisis de resultados.....	42

IX. RESULTADOS	43
9.1. Efectos de la P4 en el número de células de las líneas U373 y D54.....	43
9.2. Efectos del antagonista RU486 en el número de células de las líneas de astrocitomas U373 y D54	45
9.3. Efecto de la P4 y su antagonista sobre las fases del ciclo celular.....	48
9.4. Efecto de la P4 y de su antagonista sobre la apoptosis de las líneas U373 y D54.:.....	50
9.5. Determinación de la expresión del Receptor a Progesterona (RP)....	51
X. DISCUSIÓN	52
XI. CONCLUSIONES	56
XII. PERSPECTIVAS	57
XIII. REFERENCIAS	58
XIV. ARTÍCULO DERIVADO DEL PROYECTO DE TESIS:	68

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

I. Resumen

Los astrocitomas son los tumores más frecuentes que se desarrollan en el sistema nervioso central. La expresión de los receptores a progesterona (P4) ha sido caracterizada en astrocitomas humanos, sin embargo, los efectos de la P4 no se conocen en este tipo de tumores cerebrales. En este trabajo se estudió el papel de la P4 en el número de células de dos líneas de astrocitomas humanos con diferente grado de evolución (U373, grado III y D54 grado IV). La expresión de las isoformas del receptor a P4 fueron analizadas por Western blot. Los efectos de la P4 y de su antagonista, RU486, en el número de células fueron analizados por 5 días consecutivos. Los resultados muestran que la dosis de 10 nM de P4 incrementa significativamente el número de células en ambas líneas celulares desde el segundo día de cultivo para el caso de la línea D54 y del tercero para la U373 manteniendo este efecto hasta el quinto día de tratamiento. La P4 incrementó la fase S del ciclo celular en la línea U373 en un 61%. El antagonista RU486 (10 μ M) bloqueó los efectos de P4, y administrado sin P4 redujo el número de células a partir del segundo día de cultivo en ambas líneas celulares, además de disminuir 16% la fase S del ciclo en la línea U373.

Los resultados en los ensayos de fragmentación del DNA (TUNEL), muestran que la disminución en el número de células producido por el tratamiento con RU486 no es por apoptosis. Ambas isoformas del receptor a P4 fueron detectadas en ambas líneas celulares. Nuestros datos sugieren que la P4 induce el crecimiento de las líneas de astrocitoma humano a través de la interacción con su receptor nuclear específico.

II. Abstract

Astrocytomas are the most frequent primary brain tumors and constitute a leading cause of cancer-related deaths. Progesterone receptor expression has been characterized in human astrocytomas; however, the effects of progesterone (P4) on these brain tumors are unknown. In this work we studied the role of progesterone in cell growth of two human astrocytoma cell lines with different evolution grade (U373, grade III; and D54, grade IV). Progesterone receptor expression was determined by Western blot. The effects of progesterone and its antagonist, RU486, on cell growth were analyzed for 5 days. Results show that P4 (10 nM) significantly increased the number of D54 cells from the second day of culture, and the number of U373 cells on days 3-5. P4 increased S phase 61% on day 5 of the cell cycle in U373 cells. RU486 blocked the effects of P4. Interestingly, when RU486 was administered alone, it reduced the number of cells from the second day of culture in both astrocytoma cell lines, and diminished S phase in U373 cells in 16% on day 5. Results of DNA fragmentation (TUNEL) assay showed that the diminution in the number of astrocytoma cells produced by RU486 treatment was not by apoptosis. Progesterone receptor isoforms were detected in both cells lines. Our data suggest that P4 induces cell growth of human astrocytoma cell lines through an interaction with its nuclear receptor.

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial caracterizada por una división y crecimiento descontrolado de las células. Uno de los órganos afectados por esta enfermedad es el cerebro; los astrocitomas son tumores cerebrales que se originan a partir de los astrocitos y constituyen alrededor del 45% de todos los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC). Las estrategias más comunes para su tratamiento son la radioterapia, la quimioterapia y la neurocirugía, sin embargo, estas estrategias no han sido totalmente eficaces para este tipo de cáncer (Franco-Hernández *et al.*, 2007).

Otra alternativa terapéutica para estos tumores es la de carácter hormonal, basada en el uso de agonistas o antagonistas a hormonas esteroideas como la P4 (P4). Esta propuesta se ve favorecida por resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que muestran una expresión diferencial de las isoformas del receptor a P4 (RP) conforme avanza el grado de evolución de los astrocitomas, lo cual puede tener importantes consecuencias en el pronóstico y tratamiento de este tipo de tumores.

Sin embargo, no se conoce cómo participa la P4 en la viabilidad celular, así como su papel en la regulación del ciclo celular en este tipo de tumores, lo cual es importante para tratar de implementar una alternativa hormonal para su tratamiento.

IV. ANTECEDENTES.

4.1. Características estructurales y fisiológicas de la progesterona (P4).

La progesterona (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides, su nombre del latín: *pro* = a favor y *gestare* = llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción. Este nombre fue adoptado por primera vez en 1935 por Butenandt, quien purificó e identificó estructuralmente a esta hormona a partir de extractos del cuerpo lúteo. La estructura química de la progesterona (P4) y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (Fig. 1).

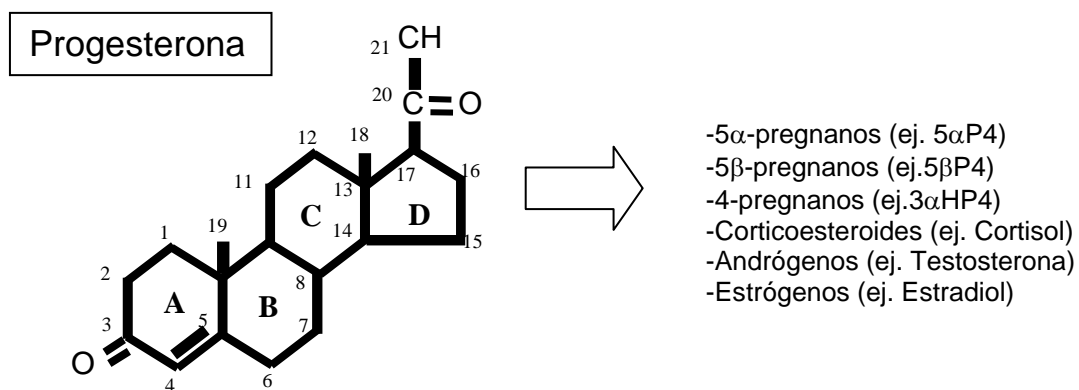


Figura 1. Estructura de la P4. La P4 es el precursor de las hormonas esteroides producidas en las gónadas y glándulas adrenales como los corticoesteroides, andrógenos y estrógenos.

En humanos la P4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo en el ovario durante el ciclo menstrual (Hsueh *et al.*, 1984; Hutchison *et al.*, 1986). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la

hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes β -adrenérgicos (Graham *et al.*, 1997). Otros órganos donde también se ha demostrado la síntesis de P4 son la corteza adrenal, la placenta (Gorospe *et al.*, 1985; Perrot-Applanat *et al.*, 1982), el testículo, (Weisz y Ward, 1980; Dalkin *et al.*, 1992) y cerebro (Pluchino *et al.*, 2006).

La P4 es derivada del colesterol, que es transformado en pregnenolona y posteriormente, en P4 (Fig. 2). Cada paso está regulado por diferentes enzimas localizadas en los tejidos u órganos anteriormente citados.

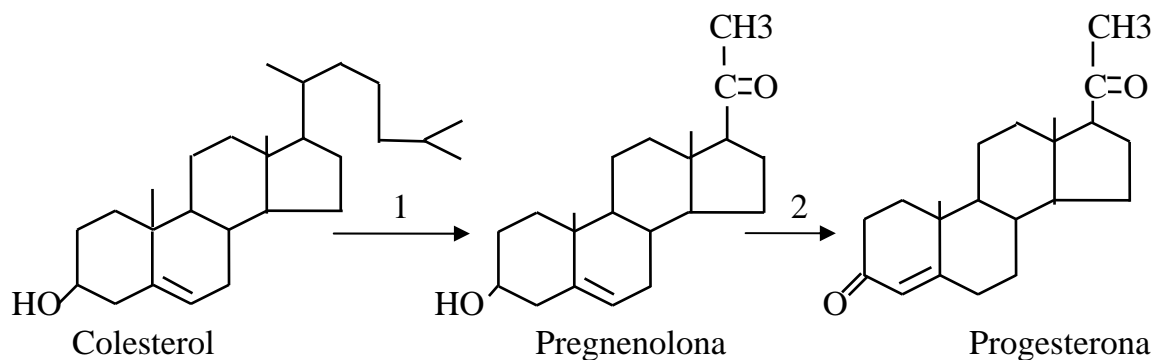
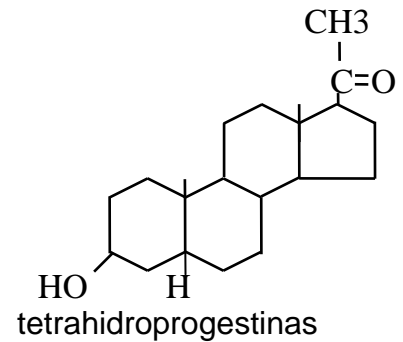
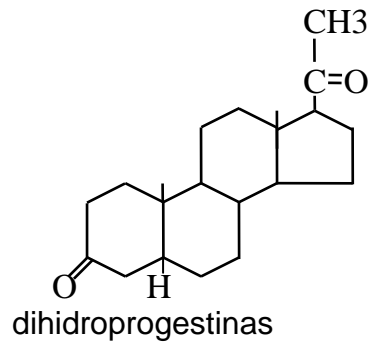


Figura 2. Biosíntesis de la P4. La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17. b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3. c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (1)= 20,22-esteroide liasa, (2)= 3-cetoesteroide $\Delta^4\Delta^5$ -isomerasa (Chávez *et al.*, 1985).

La P4 puede reducirse para formar varios metabolitos (Fig. 3), los cuales pueden incrementar, prolongar o terminar los efectos de la P4, o bien proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la P4 (Karavolas y Hodges, 1990). Existen dos tipos de metabolitos: metabolitos reducidos en el anillo A: Dihidroprogestinas ($5\beta, 5\alpha$ -progestinas), las cuales tiene una gran potencia anestésico a nivel del sistema nervioso central y las tetrahidroprogestinas (reducción en los carbonos 5 y 3) que modulan el funcionamiento de las regiones cerebrales relacionadas con la producción y liberación de LH-RH. Existen otros metabolitos reducidos en el carbono 20 y en el carbono 17, la 20α hidroxiprogesterona y la 17α hidroxiprogesterona, respectivamente; los cuales

presentan numerosas actividades en el organismo. Éstos se sintetizan en el ovario, hígado, riñón y placenta.

A) Metabolitos reducidos en el anillo A



B) Metabolitos modificados en los C-17 y C-20

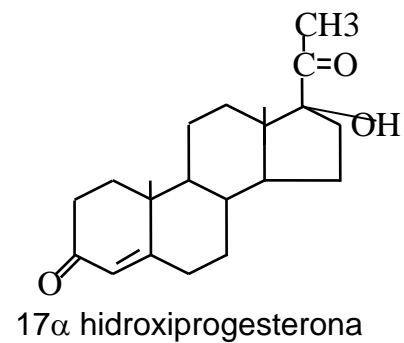
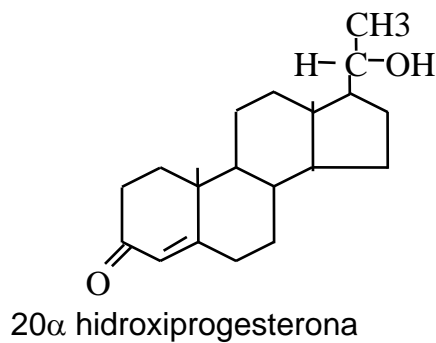


Figura 3. Principales metabolitos de la P4. A) Metabolitos reducidos en el anillo A en los carbonos C5 y C3, dihidroprogestinas y tetrahidroprogestinas, respectivamente. B) metabolitos reducidos en los C-17 y C-20 sintetizados por la 17 α -esteroide hidroxilasa y la 20 α -esteroide deshidrogenasa, respectivamente.

Una vez que la P4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 y del anillo A en los carbonos 5 y 3.
2. La formación de glucorónidos, donde se incrementa la polaridad de la molécula formando compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por vía urinaria.

El proceso de reducción de la P4 ocurre inicialmente en el carbono 20, dando lugar a la formación de la 20 α y 20 β dihidroprogesterona que tienen actividad biológica, posteriormente, se reduce el anillo A en los carbonos 5 y 3, lo

cual resulta en la formación de ocho pregnandiolos o pregnantrioles, los cuales al reducirse a glucorónidos son excretados por la orina (Fig. 4).

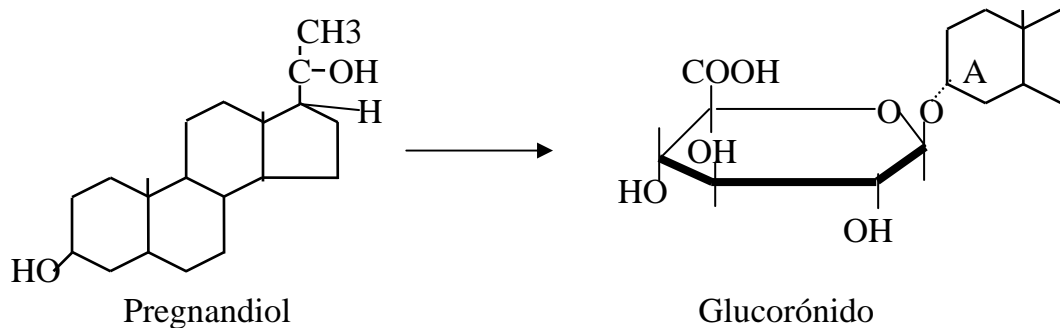


Figura 4. Principales catabolitos de la Progesterona.

La P4 participa en un amplio rango de actividades biológicas en numerosos tejidos. La P4 puede estimular la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; Ke *et al.*, 1987) y de la dopamina (Dluzen *et al.*, 1991). Participa en la inducción de la lordosis (Schaeffer *et al.*, 1990); en la síntesis de uteroglobina (Beier *et al.*, 1968), en la reacción acrosomal y en el flujo de Ca^{2+} en el espermatozoide (Meizel *et al.*, 1991; Tesarik *et al.*, 1992) y durante la diferenciación sexual, o bien, inhibidores como en la contractilidad uterina (Csapo *et al.*, 1979) y la síntesis de norepinefrina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti *et al.*, 1992; Tabla 1).

Los principales órganos blanco de la P4 son: El útero, en donde regula su proliferación y diferenciación; el miometrio, en donde controla su contractilidad y mantiene las condiciones adecuadas para la implantación del embrión (Graham y Clarke, 1997); en el ovario, en donde interviene en la maduración y liberación del ovocito maduro; en la glándula mamaria, en donde promueve la proliferación y diferenciación del tejido alveolar de la misma, además de la secreción de leche después del nacimiento (Graham y Clarke, 1997). En el cerebro regula la excitabilidad neuronal, el sueño, la plasticidad neuronal y la conducta sexual (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994, 1995 y 1999).

Tabla 1. Acciones fisiológicas de la Progesterona

Tejido	Función
Útero/Ovario	Liberación del ovocito (Susuki <i>et al.</i> , 1994) Facilitación de la implantación (Graham y Clarke, 1997) Mantenimiento del embarazo (Rothchild, 1983) Estimulación de la regeneración del estroma (Clarke <i>et al.</i> , 1993).
Glándula Mamaria	Desarrollo alveolar (Topper y Freeman, 1980). Regulación de la síntesis de leche durante el embarazo (Savouret <i>et al.</i> , 1990).
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual (Camacho-Arroyo <i>et al.</i> , 1995). Excitabilidad neuronal, plasticidad neuronal (Camacho-Arroyo <i>et al.</i> , 1999).
Pulmón	Incremento de la ventilación durante el ciclo menstrual y el embarazo (Brodeur <i>et al.</i> , 1986).
Hueso	Regulación de la masa del hueso (Wei <i>et al.</i> , 1993)

4.1.1. Mecanismos de acción de la P4 y de su antagonista (RU486).

Se han determinado dos diferentes mecanismos de acción por los cuales la P4 actúa dentro de la célula, éstos son conocidos como mecanismos genómicos y no genómicos. La P4 puede ejercer ambos mecanismos al mismo tiempo en la misma célula produciéndose una combinación de ambos mecanismos de señalización y así, regular diferentes funciones celulares a diferentes tiempos (desde segundos hasta días).

El mecanismo no genómico involucra la acción rápida (milisegundos a minutos) de la P4. Este tipo de mecanismo la hormona actúa tanto a nivel de membrana celular como del citoplasma. Algunas de las acciones no genómicas que han sido documentadas son: la inducción acrosomal, el incremento en la movilidad del espermatozoide, la modulación de la liberación de gonadotropinas en

el cerebro, la inducción de la maduración del ovocito en especies de anfibios y peces (Hanna *et al.*, 2006).

La P4 interactúa con: a) canales iónicos permeables a Ca^{2+} o K^+ ; b) sitios moduladores de receptores a neurotransmisores como en el receptor de GABA_A ; c) receptores a factores de crecimiento y receptores de neurotransmisores acoplados a proteínas G. Estas interacciones causan cambios en la conductancia iónica, inducción de cascadas de segundos mensajeros como producción de AMPc, activación de MAP cinasas, proteína C y la disminución en los niveles de fosfatidilinositol (Camacho-Arroyo, 2003).

Además de las acciones anteriores, se ha descrito la presencia de una nueva familia de receptores de progestinas localizados en la membrana celular ($\text{RPm}\alpha$, $\text{RPm}\beta$, y $\text{RPm}\gamma$) con estructura y perfiles farmacológicos diferentes a los receptores presentes en el núcleo celular. Estos RPms se encuentran conservados evolutivamente desde peces hasta humanos (Zhu *et al.*, 2003a, b) y tienen la capacidad de unirse a progestinas y estructuralmente son similares a receptores de proteínas G con siete dominios transmembranales, sitios de glicosilación y sitios de residuos de cisteína para la formación de enlaces disulfuro (Hanna *et al.*, 2006; Fig. 5).

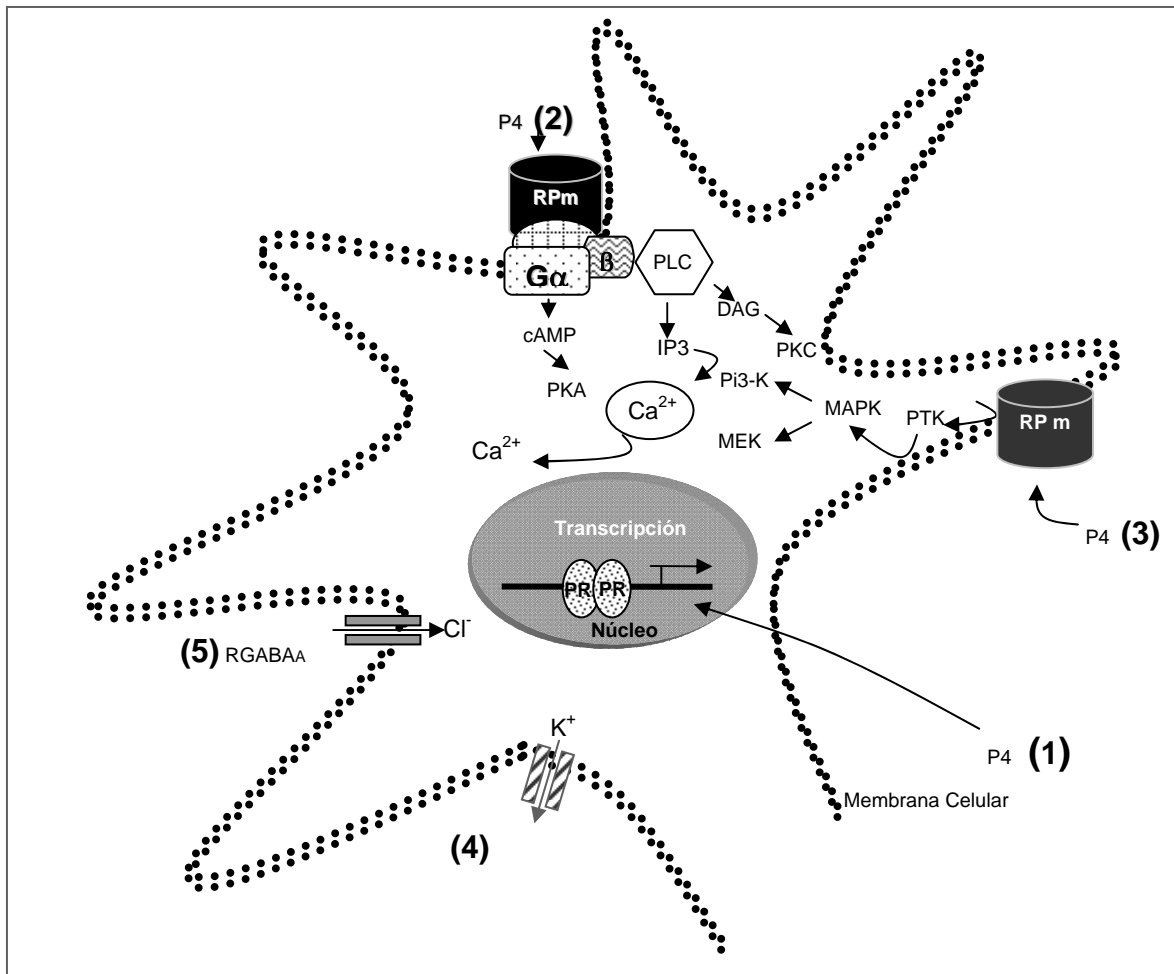


Figura 5. Mecanismos genómicos y no genómicos de acción de la P4. Mecanismo genómico: 1) Unión con un receptor intracelular (RP) regulando la transcripción de genes específicos. Mecanismos no genómicos: 2) Sistemas de receptores acoplados a segundos mensajeros como el de dopamina y los receptores de factores de crecimiento. 3) Interacción con receptores membranales a P4. 4) Interacción con canales iónicos como Ca^{2+} y K^+ . 5) Interacción con receptores a neurotransmisores como el GABA_A (Camacho-Arroyo, 2003).

El mecanismo genómico es la vía más estudiada, en ésta la P4 interactúa directamente con su receptor intracelular específico (RP), el cual dimeriza e interactúa con elementos de respuesta a P4 (ERP) ubicados en los promotores de los genes blanco regulando así la expresión génica (Camacho-Arroyo, 2003). En ausencia del ligando, el RP forma complejos oligoméricos con proteínas chaperonas, entre ellas proteínas de choque térmico HSP (40, 70 y 90), ficobilinas (FKBP51 y KKBP52) y p23 (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

Cuando la hormona circulante entra por difusión a través de las membranas citoplásmica y nuclear (Tata, 2000) se une al receptor causando los distintos cambios conformacionales que promueven la disociación de las proteínas chaperonas; la fosforilación del RP (en residuos de serinas, tirosinas o treoninas por casein cinasas, tirosinas cinasas y la cinasa 2 dependiente de ciclina A) que activan al receptor exponiendo la región que le permite dimerizarse, lo que resulta en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta a P4 (ERP), que son secuencias palindrómicas de DNA separadas por tres nucleótidos en donde dos receptores se unen simétricamente a cada mitad de la secuencia como un homodímero cooperativo. Una vez unido al ERP, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por hormonas esteroides, favoreciendo así la síntesis de proteínas.

Se ha observado que los receptores nucleares a P4 interactúan con cofactores que pueden: 1) modificar la estructura de la cromatina y 2) favorecer la interacción de manera indirecta del receptor con los factores generales de transcripción y la RNA polimerasa II (Prieto *et al.*, 2003; Burris, 2001). Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación o bien puede ser degradado por el proteosoma 26S (Camacho-Arroyo 2003; Fig. 6).

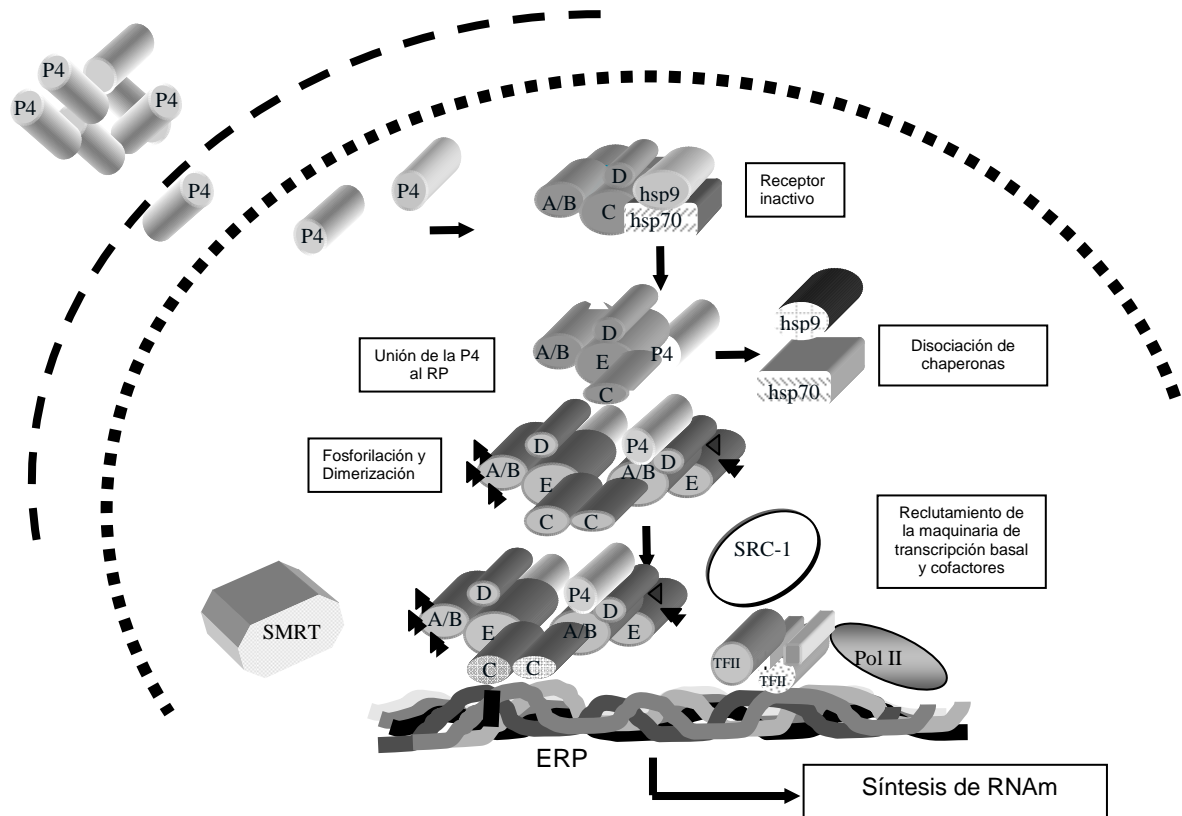


Figura 6. Mecanismo de acción genómica de la P₄. El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P₄ se une al RP, las HSP se disocian y el RP presenta cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta a P₄ (ERP), reclutar a cofactores y a la maquinaria basal de transcripción, lo cual modifica la transcripción del gen blanco. El complejo formado puede reclutar otros cofactores al promotor como SRC-1 que: 1) abren la estructura de la cromatina a través de su actividad de histona acetil transferasa en el caso de los coactivadores; 2) si se reclutan correpresores como SMRT, se presenta una estructura más compacta de la cromatina por la actividad de histona acetiltransferasa (Camacho-Arroyo *et al.*, 2007).

El RP es un importante factor de transcripción activado por ligando (P4). El estudio y síntesis de moléculas con propiedades antagonistas a hormonas esteroides permitió la generación de moléculas sintéticas que al interactuar con los receptores llevan a la inactivación de uno o numerosos pasos de los mecanismos de acción del receptor reprimiendo así las acciones biológicas de la P4 en una célula blanco.

Uno de los primeros antagonistas sintetizados para disminuir o suprimir los efectos de la P4 en el embarazo fue la mifepristona o RU486 (Roussel-Uclaff 38486) desarrollada por los laboratorios franceses Roussel-Uclaf, Schering Berlin, Organon, que mantiene al receptor tanto de P4 como de glucocorticoides en una conformación inapropiada inhibiendo su acción. El RU486 se une con una gran afinidad ($K_d \leq 10^{-9}$ M) al RP (Cadepond *et al.*, 1997).

El RU486 es una de las progestinas más usadas como antagonista del RP ya que por sus características estructurales como el grupo fenil-aminodimetil en la posición 11- β del esqueleto esteroidal (R1) y en el carbono 11 de la cadena lateral (R2) (Fig. 7) le permiten competir y unirse con alta afinidad al sitio de unión a la hormona del RP (Murphy *et al.*, 2000).

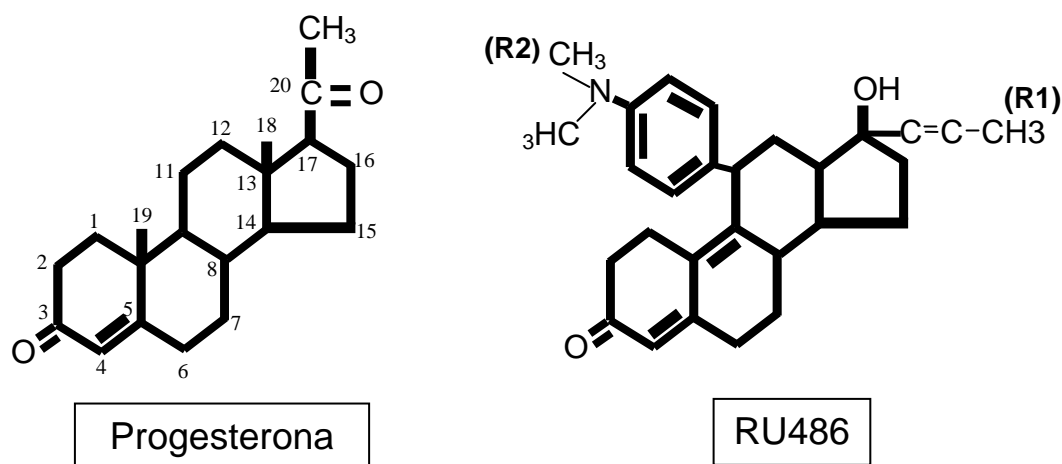


Figura 7. Estructura química de la P4 y de su antagonista RU486 (mifepristona). La posición de los carbonos son numerados en la estructura del esteroide. La estructura del RU486 muestra las sustituciones en las posiciones 11 β y 17 α característicos de la molécula.

Los mecanismos por los cuales el RU486 inactiva el complejo del RP no han sido completamente descritos, sin embargo, algunos mecanismos generales que han sido postulados para su acción son (Fig. 8):

- a) El RU486 se une a los receptores inactivos en un estado no transformado y estabiliza el complejo RP y las proteínas de choque térmico HSP90 manteniendo al receptor inactivo, previniendo la interacción con el DNA (Murphy *et al.*, 2000).
- b) El RU486 promueve la disociación del complejo RP-chaperonas, induce una fuerte dimerización del RP, promueve la unión al DNA, pero no estimula los siguientes eventos involucrados en el reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal (Beck *et al.*, 1993).
- c) Otro mecanismo sugiere que el complejo RU486-RP compite con el complejo P4-RP por los ERP del DNA (Gass *et al.*, 1998).
- d) Estudios *in vitro* de coimmunoprecipitación *in vitro* y ensayos de doble-híbrido han demostrado la formación de heterodímeros del RP. Así en una célula pueden existir dímeros cuyos componentes sean RP-antagonista/RP-hormona y cambiando totalmente la capacidad para unirse al DNA.(Murphy *et al.*, 2000)
- e) El complejo RP-antagonista interactúa con correpresores de receptores nucleares (SMRT; Leonhardt y Edwards, 2002).

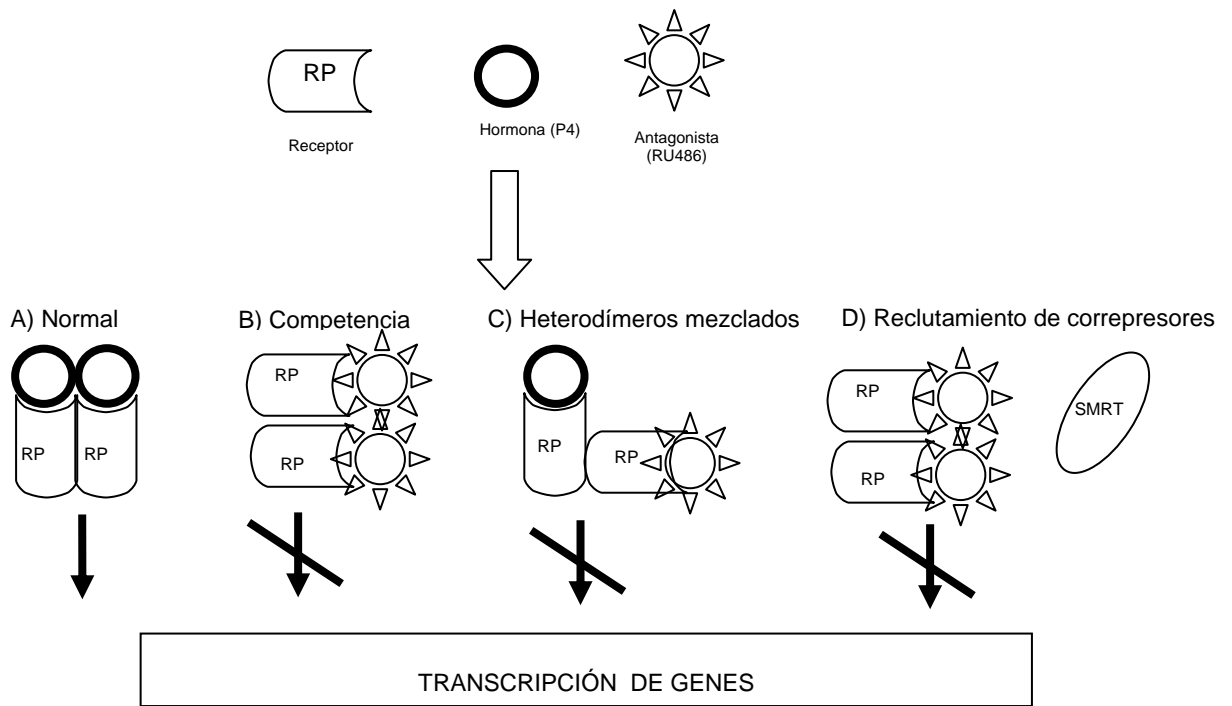


Figura 8. Mecanismos de acción del RU486. A) En condiciones normales, la hormona se une al receptor y se activa la transcripción de genes. B) La interacción del receptor con el RU486 compite por los homodímeros del RP unidos a la hormona. C) La presencia del RU486 permite la formación de heterodímeros de receptor, lo cual impide la unión de éste al elemento de respuesta. D) La interacción del RU486 con el RP recluta proteínas correpressoras que impiden la transcripción de genes.

A pesar de los mecanismos anteriormente descritos en muchos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* se ha informado que esta molécula es un antagonista parcial, ya que puede tener efectos agonistas, así, la actividad agonista/antagonista de los componentes similares al RU486 puede ser reflejo del balance entre expresión y la accesibilidad de los coactivadores o correpresores presentes en una célula.

Además, se ha reportado que la actividad agonista o antagonista del RU486 depende de la isoforma del RP que esté presente. En distintos modelos se ha descrito que los efectos agonistas del RU486 están mediados por RP-B, ya que muchos de los efectos inducidos por RU486 no son observados cuando RP-A se expresa (Meyer *et al.*, 1990), mientras que los efectos antagonistas están

mediados por la isoforma A, ya que se ha demostrado que la interacción del RU486 es más fuerte y recluta con mayor eficiencia a correpresores de la transcripción (Chabbert-Buffet *et al.*, 2005).

Los antagonistas a hormonas esteroides son de gran importancia clínica, Philibert en 1981 describió por primera vez las propiedades antiprogestacionales (propiedades abortivas) de esta molécula en humanos (Spitz *et al.*, 1996). Numerosos estudios clínicos han permitido definir tanto la dosis óptima como la vía de administración para la terminación del embarazo. El RU486 bloquea al RP en la placenta provocando la terminación del embarazo.

Otro de los usos del RU486 son en el tratamiento de endometriosis y fibroides y ciertos tumores que responden a P4 como leiomiomas (el RU486 induce ovulación, disminuye la expresión del RP y detiene la luteolisis provocada en esta enfermedad). Otros objetivos clínicos han evaluado su papel en terapias de cáncer de mama metastático (inhibiendo el crecimiento tumoral y estimulando la diferenciación de la mama; Chabbert-Buffet *et al.*, 2005).

4.3 Efectos de la progesterona en el ciclo celular

Otro de los efectos estudiados de la P4 es su participación en la regulación del ciclo celular tanto en condiciones normales como patológicas, donde la P4 está involucrada en la regulación de la función de factores de crecimiento y de sus receptores, además de regular la expresión de oncogenes y proteínas del ciclo celular como ciclinas e inhibidores de ciclinas (Wiebe, 2006).

En ovario, mama y endometrio en condiciones normales la P4 es considerada como una hormona que promueve la proliferación y diferenciación celular a través de la regulación de genes implicados en el ciclo celular como *c-myc* y numerosas ciclinas (Rider, 2002). En el caso de células del estroma del útero de la rata la presencia de P4 más la actividad de receptores de tirosinasa como el factor de crecimiento epidérmico o el factor de crecimiento transformante alfa, incrementan la expresión de la ciclina D1 (Sutherland y Musgrove, 2004).

En condiciones patológicas como el cáncer, la P4 incrementa la expresión de los protooncogenes que responden a señales de proliferación *c-fos* y *c-myc* en células de cáncer de mama T47-D (Piroli *et al.*, 1998). Además se observa un aumento en la progresión del ciclo celular, lo cual está relacionado con una inducción de genes asociados con la regulación del propio ciclo como de las proteínas reguladoras de ciclo (ciclinas; Musgrove *et al.*, 1991,1993), factores de crecimiento (EGF, TGF- α , TGF- β , IGF; Murphy *et al.*, 1986; Musgrove *et al.*, 1993; Pasqualini *et al.*, 1998)

La inducción del ciclo celular por P4 se ve reflejada en un aumento del número de células que entran a la fase S. Así también, la P4 puede inhibir la expresión de genes involucrados en la supresión del crecimiento celular como el gen p53 en células T47-D (Hurd *et al.*, 1995), sugiriendo que ésta puede estimular la proliferación celular por medio de la remoción de los efectos inhibidores de esta proteína.

La P4 modifica profundamente la progresión del ciclo celular, en una subclona de T47-D denominada T-47D-YB que expresa constitutivamente la isoforma B del RP y muestra una resistencia a los efectos del EGF. En esta línea celular la P4 muestra una acción bifásica en el ciclo celular: primero estimula la entrada al ciclo celular en el primer ciclo mitótico acompañada por un aumento de ciclina D1, D3 y E, posteriormente tiene un efecto de inhibición, ya que se produce un arresto en la fase de G1 tardío del segundo ciclo celular donde la presencia de ciclinas disminuye y se presenta un aumento en el inhibidor p21 (Pasqualini *et al.*, 1998, Musgrove *et al.*, 2001).

4.3 Tumores cerebrales.

Los tumores cerebrales son patologías numerosas y con múltiples características que producen síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y cualidades invasivas que destruyen los tejidos donde se localizan. Durante mucho tiempo se han propuesto numerosos factores y teorías para explicar el origen de estas neoplasias (traumatismos, infecciones, enfermedades metabólicas, exposición a toxinas, etc.). Sin embargo, aún en la actualidad no se conoce de manera clara su origen.

El estudio de los tumores cerebrales comenzó a finales del siglo XIX. Müller (1838) enunció por primera vez que los tumores cerebrales podrían originarse a partir de células embrionarias que permanecieron en el cerebro durante el desarrollo del individuo. Cohnleim (1878) sugirió que la causa de los tumores era una anomalía en la disposición embriológica de las células y propone que los estímulos ambientales podrían generar neoplasias en lugares donde hay una rápida diferenciación de capas germinales o una migración de células embrionarias mal situadas. En 1879, Sir William Mckewen remueve por primera vez un tumor cerebral (DeVita, 1995). Estos estudios permitieron que Cushing en 1926 clasificara y describiera más de 200 tumores cerebrales.

Más tarde, después de la Segunda Guerra Mundial, se desarrollaron numerosas técnicas para la localización, extracción y terapias para los diversos tumores cerebrales (DeVita, 1995). En la actualidad, se poseen grandes avances en la localización y tratamiento de los tumores cerebrales; a través de las tomografías computarizadas y de la resonancia magnética nuclear se puede conocer con exactitud el tamaño, la forma y la profundidad del tumor. Con respecto al tratamiento de los tumores del SNC, los principales abordajes son la neurocirugía, la quimioterapia y la radioterapia (Chang *et al.*, 2007).

Las causas de los tumores cerebrales son variables. Entre éstas se han identificado factores genéticos que incluyen mutaciones tanto en el inicio del desarrollo del cerebro o como en la etapa adulta (Wrensch *et al.*, 2002), así como, factores ambientales, agentes físicos (exposición a campos electromagnéticos), agentes químicos (exposición a acrilonitrilo, formaldehído, aceites lubricantes, fenoles, solventes orgánicos y pesticidas) o agentes biológicos virus (influenza, varicela, virus zoster; Inskip, 1996; Wrensch *et al.*, 2002).

Los tumores cerebrales se clasifican en:

Tumores de células neurogliales: Astrocitomas, Oligodendrogliomas, Ependimomas

Tumores formados por neuronas: Neurocitomas

Tumores meningoteliales: Meningiomas

Tumores intracraneales de origen mesodérmico: Fibrosarcomas, Condromas,

Linfomas, Hemangioblastomas.

Tumores de restos embrionarios y por defectos en el desarrollo: Craneofaringiomas, Cordomas, Meduloblastomas.

Tumores de la hipófisis: Adenomas.

Tumores de plexos Coroideos: Papilomas plexos coroides.

Tumores de las raíces nerviosas: Neurofibromas, Schwannomas

Los tumores primarios del SNC constituyen del 10 al 15% del total de las neoplasias que más frecuentemente se presentan en el ser humano (Félix, 1995). De acuerdo con sus características histológicas se dividen en primarios o secundarios. Los tumores primarios corresponden a las neoplasias generadas en el SNC y constituyen del 50% al 60% de las neoplasias intracraneales (Valenzuela *et al.*, 1990). En México, los tumores primarios más frecuentes del SNC son los gliomas que representan el 60%, el segundo lugar son los meningiomas con el 20%, los adenomas pituitarios el tercer lugar 18% y otros el 2% (Valenzuela *et al.*, 1990; Fig. 9).

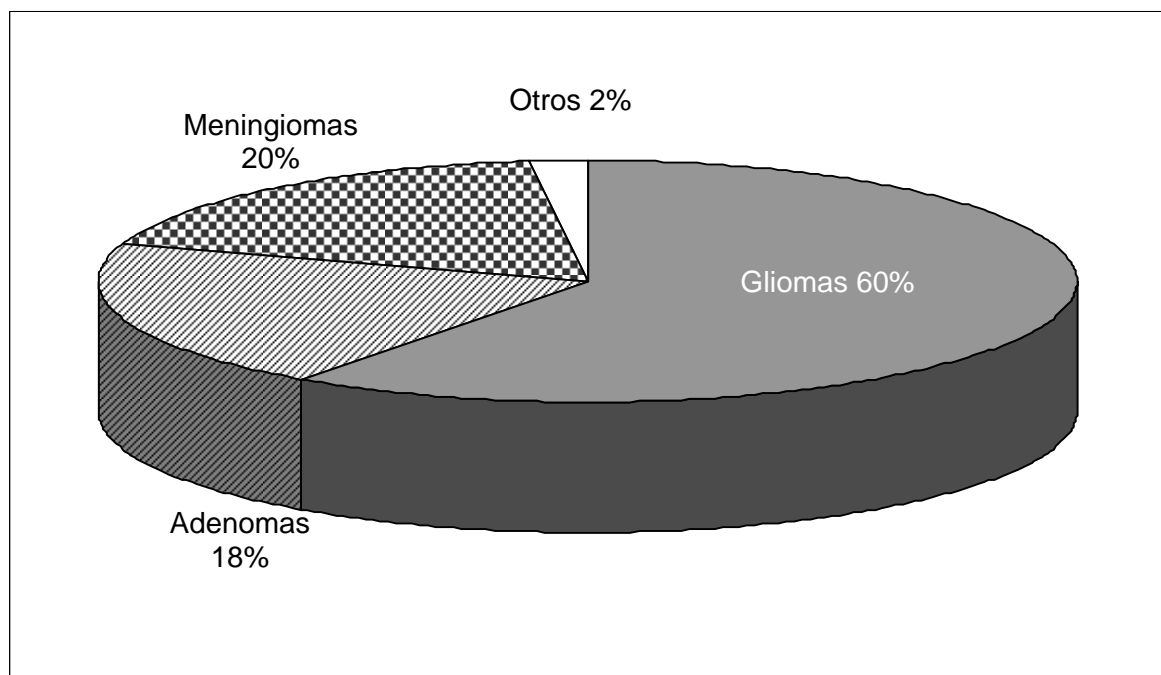


Figura 9. Principales tipos de tumores cerebrales en México. De acuerdo con el registro de la Secretaría de Salud de México, los gliomas (astrocitomas, oligoastrocitomas, ependimomas) es el grupo de tumores cerebrales con más frecuencia en nuestro país, seguido por los meningiomas y adenomas hipofisarios (Felix, 1995).

En general, los tumores cerebrales ocurren con mayor frecuencia en adultos entre los 30 y 50 años, y la mayoría se presentan indistintamente en hombres y en

mujeres, aunque se ha observado que los astrocitomas y meduloblastomas son más frecuentes en hombres y los meningiomas en mujeres (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de ocurrencia de tumores cerebrales entre hombres (H) y mujeres (M).

TIPO DE TUMOR	H/M	TIPO DE TUMOR	H/M
Oligodendroglioma	9 : 7	Ependimomas	6 : 5
Meduloblastoma	5 : 2	Pinealomas	3 : 1
Astrocitomas	3 : 2	Angioblastomas	2 : 1
Glioblastomas	2 : 1	Meningiomas	1 : 2
Cordomas	1 : 1	Craneofaringiomas	2 : 1

Los tumores invaden y destruyen el tejido normal, muchos de sus efectos afectan funciones sensoriales, motoras y cognitivas, incrementan la presión intracraneal, forman edemas cerebrales causan compresión de tejidos en el cerebro, nervios craneales y vasos cerebrales (Brownstein y Stevenson, 2003).

El tratamiento de los tumores cerebrales depende de la patología y localización o la recurrencia del tumor. Así, hay casos que pueden tratarse con un solo tipo de terapia o con terapias múltiples para reducir la masa del tumor, entre las que se incluyen la extracción del tumor por cirugía y la terapia de radiación.

Terapias convencionales:

a) Cirugía:

La cirugía o resección es la primera forma de tratamiento de los tumores cerebrales, el objetivo es remover el tumor sin causar daño en el cerebro. Previo a este procedimiento se requiere información de la localización y tamaño del tumor.

b) Radioterapia:

La radioterapia usa la alta energía de los rayos X o de otros tipos de radiación ionizante para detener la división celular de las células cancerosas. Esta

terapia es utilizada cuando la cirugía no es recomendable para los tumores que no pueden ser completamente removidos o después de la cirugía para destruir las células residuales del tumor y prevenir la recurrencia. La radioterapia puede parar o disminuir el crecimiento de tumores de crecimiento lento. La terapia convencional se da en fracciones pequeñas dosis (1.8-2 Gray) durante un periodo usualmente 5 semanas. La dosis total de radiación depende del tipo de tumor y oscila entre 50-60 Gray.

c) Quimioterapia

Es el tratamiento de la enfermedad mediante fármacos que tienen un efecto tóxico en las células tumorales. La quimioterapia puede darse sola o en combinación con otros tratamientos de tumores cerebrales. En este tratamiento los fármacos que atraviesan la barrera hematoencefálica llegando así a las células tumorales. El cisplatino, carmustina, carboplatino, lomustina, metotrexate, procarbazona, temozolamida, vincristina son los fármacos más utilizados en las terapias para el tratamiento de los diferentes tipos de tumores cerebrales (Basso *et al.*, 2002).

Terapias biológicas.

Las terapias biológicas ofrecen una opción para el tratamiento para las personas que presentan una recurrencia después de los tratamientos convencionales. Este tipo de terapias consiste en estimular al sistema inmune a manera de atacar a las células tumorales. La estimulación de la producción de moléculas modificadoras de respuesta biológicas, inhibidores de angiogenesis, terapias antisentido (RNA antisentido) son nuevos procedimientos para el tratamiento de los tumores cerebrales.

4.3.1. Astrocitomas

Los astrocitomas pertenecen al grupo de tumores de células neurogliales (gliomas), se originan de los astrocitos que son células gliales de forma estrellada y

con grandes prolongaciones citoplásmicas que se encuentran junto a vasos sanguíneos, oligodendrocitos y neuronas (Escobar, 2004).

Este tipo de tumores constituyen alrededor del 45% de todos los gliomas y el 45% de todos los tumores primarios del SNC en el mundo. Se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral. Microscópicamente tienen una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa de los astrocitos (Nguyen *et al.*, 1984). Mientras más malignos presentan mayor delimitación, en tanto que los benignos son difusos e infiltrantes, con tendencia a formar cavidades largas o pseudoquistes.

La Organización Mundial de la Salud clasifica los astrocitomas cerebrales basado en criterios morfológicos, histológicos, de capacidad de invasión y de progresión de la siguiente forma:

Grado I o astrocitoma de bajo grado: Astrocitoma pilocítico.

Grado II o astrocitoma difuso: Astrocitoma fibrilar, protoplasmático y gemistocítico.

Grado III o astrocitoma anaplásico.

Grado IV o astrocitoma de alto grado: Glioblastoma multiforme, gliosarcoma y glioblastoma de células gigantes (Tabla 3, Ohgaki y Kleihues, 2005).

Los astrocitomas grado I y II son benignos o de bajo grado de malignidad. Los de grado I son de crecimiento lento, tumores no infiltrantes que se presentan en los niños y adultos jóvenes, este tipo de tumores son usualmente curables por cirugía. Los astrocitomas de grado II son malignidades de bajo grado de infiltración difusa en el cerebro y no son curables por cirugía, muchos de estos tumores pasan a un grado mayor de evolución (Hullerman y Helin, 2005).

Los astrocitomas de grado III, presentan un notable pleomorfismo y anaplasia, con células multinucleadas y mitosis atípicas abundantes sin presentar extensas zonas de necrosis como en el grado IV. Son positivos a la proteína fibrilar ácida glial. Los pacientes tienen una probabilidad de sobrevivencia del 50% aún con tratamiento de radioterapia.

Tabla 3. Grado de astrocitomas:

<p>Astrocitoma Grado I (astrocitoma de bajo grado)</p>	<p>2% de todos los tumores cerebrales Crecimiento lento, con bordes relativamente bien definidos. Crecen principalmente en cerebelo, rutas de nervio óptico. Ocurren más frecuentemente en niños y jóvenes</p>	<p>Astrocitoma Grado II (astrocitoma de bajo grado)</p>	<p>Crecimiento lento Bordes no definidos. Común entre hombres y mujeres entre los 20-50 años.</p>	<p>Astrocitoma Grado III (Astrocitoma anaplásico)</p>	<p>Crecimiento rápido y más agresivo que los astrocitomas grado II. Células no uniformes, invaden los tejidos vecinos. Comúnmente se desarrollan en mujeres y hombres de 30-50 años. Son más comunes en hombres que en</p>	<p>Astrocitoma Grado IV (Glioblastoma multiforme)</p>	<p>Es el tipo más invasivo de los astrocitomas. Crecimiento rápido. Puede estar compuesto por diferentes tipos celulares como astrocitos, oligodendrocitos. Se desarrollan en mujeres y hombres entre los 50-70 años. Son más comunes en hombres que en mujeres.</p>	<p>El tratamiento es cirugía seguida por radioterapia y quimioterapia.</p>
<p>Cirugía es el tratamiento estándar. Si el tumor no puede ser completamente extraído, radioterapia o quimioterapia son dadas.</p>	<p>El tratamiento depende de la talla y localización del tumor. Se sugiere tomar biopsia para su análisis, tumores no operables pueden ser</p>	<p>Depende de la localización, y de la progresión del mismo. Cirugía y terapia de radiación con quimioterapia durante o seguida de radiación.</p>						

TIPO DE ASTROCITOMA	CARACTERISTICAS	TRATAMIENTO
------------------------	-----------------	-------------

Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas, presentan una rápida evolución, son malignos y están localizados preferentemente en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo. Estos últimos llegan a medir hasta 5 cm, presentan áreas hemorrágicas con células redondas pequeñas hasta agregados celulares grandes. Existe secreción de factores estimulantes de proliferación de vasos sanguíneos (factores angiogénicos) y presentan además células con grandes cantidades de filamentos, desprovistas de desmosomas y nucleolos prominentes. Las personas que desarrollan este grado de tumor tienen pocas esperanzas de vida con una tasa de sobrevivencia menor a 1 año (Hullerman y Helin, 2005).

Una característica común de los astrocitomas la constituye las alteraciones genéticas en oncogenes p.ej.: aquellos que codifican cinasas dependientes de ciclinas (CDK4), factor de crecimiento epidérmico (EGF). También se han confirmado alteraciones en genes que regulan las rutas de la proteína de retinoblastoma (pRb)/E2F importantes en el ciclo celular. Se han descrito que aproximadamente el 30% de los astrocitomas de alto grado de evolución presentan mutaciones en pRB (localizada en el cromosoma 13q14 en humanos). Así como diferentes grados de metilación y pérdida de heterocigosidad en los genes supresores de tumores como p53, p16, p15 (Hulleman y Helin, 2005).

4.4. Efectos de la P4 y del RU486 en astrocitomas.

Muchos estudios han reportado que la P4 ejerce efectos proliferativos y antiproliferativos en numerosos tipos de cáncer (Sager *et al.*, 2003). Sin embargo,

pocos son los estudios sobre los efectos de la P4 sobre el crecimiento de los tumores cerebrales. Se ha señalado que la P4 presenta efectos controversiales.

En cultivos primarios de meningiomas (tumores desarrollados en la capa aracnoides de las meninges) diferentes dosis de P4 (10^{-7} - 10^{-9} M) estimulan el crecimiento tumoral (Jay *et al.*, 1985; Olson *et al.*, 1986). Sin embargo, cuando los tumores reciben un tratamiento conjunto de estradiol y P4, esta última inhibe el crecimiento de los tumores (Blankenstein *et al.*, 1995) lo mismo se ha observado en el caso de los prolactinomas (desarrollados en la parte anterior de la pituitaria) en ratas, donde la P4 inhibe su crecimiento (Piroli *et al.*, 1998). En otro tipo de tumores como los craneofaringiomas la P4 inhibe el crecimiento del tumor en cultivos primarios de estos tumores (Honegger *et al.*, 1997).

Otra evidencia de tipo indirecta de la participación de la P4 en el crecimiento de los tumores cerebrales es la presencia del RP ya que muchos de los efectos de la P4 son mediados por este receptor y en muchos otros tipos de cáncer son considerados marcador pronóstico de la enfermedad. En numerosos estudios se ha reportado la expresión del RP en tumores cerebrales como astrocitomas (Khalid *et al.*, 1997; Poisson *et al.*, 1983; Brentani *et al.*, 1984, González-Agüero *et al.*, 2001), craneofaringiomas (Honegger *et al.*, 1997), meningiomas (Carroll *et al.*, 1995; Bouillot *et al.*, 1994), schwannomas y cordomas (Stojkovic *et al.*, 1992, Camacho-Arroyo *et al.*, 2000).

Los primeros estudios donde se determinó la presencia de receptores a hormonas esteroides fueron en meningiomas realizados por Donnell en 1979, quien detectó la presencia del receptor a estrógenos en cuatro de seis meningiomas. Más tarde, Piosson en 1983 detectó la presencia del RP en cuatro meningiomas.

Dentro de los estudios realizados más destacados están los de Markwalder (1983), Blankenstein (1983) e Ironside (1986), quienes demostraron la unión específica del RP con la P4 a través de ensayos de competencia. Blankenstein (1995), Brandis (1993) y Press (1988) demostraron la presencia del RP por ensayo de competencia utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra

el RP, observando una correlación directa entre la intensidad de la marca con los niveles del RP.

En años posteriores, se ha informado la presencia del RP tanto al nivel de la proteína como al nivel del RNA mensajero en tumores sólidos y en cultivos primarios de meningiomas (Blaauw *et al.*, 1995; Harper *et al.*, 1989; Grumberg *et al.*, 1987; Hayward *et al.*, 1984; Michelsen *et al.*, 1969; Speirs *et al.*, 1997; Camacho-Arroyo *et al.*, 2000).

En los astrocitomas se ha demostrado que aproximadamente el 50% de éstos presentan RP (Paoletti *et al.*, 1990). Se ha observado que existe una relación directa entre el grado del tumor con la expresión del RP. Así, tumores de bajo grado evolutivo (astrocitomas grado I y II) presentan menor expresión de RP en comparación con tumores más agresivos (III y IV), en los que hay una mayor expresión (Caroll *et al.*, 1993; Khalid *et al.*, 1997, 1994; Magrassi *et al.*, 1992), lo cual apoya la teoría de que en este tipo de tumores el RP participa en la evolución de estos tumores.

Esta expresión es inversa a la que se observa en otros tumores típicamente regulados por hormonas esteroideas como el cáncer de mama, neoplasias endometriales y meningiomas (Assimakopoulou *et al.*, 1998). En biopsias de pacientes se ha observado que esta relación se conserva, ya que en astrocitomas de grado IV el 100% de los tumores expresó RP tanto al nivel del RNAm como de la proteína (González Agüero *et al.*, 2001).

Se ha observado una expresión diferencial de las isoformas del RP (RP-A y RP-B) en astrocitomas y en cordomas, siendo la isoforma B la más abundante tanto al nivel de RNAm y de la proteína en los grados más avanzados del tumor (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; González-Agüero *et al.*, 2001). Esta desregulación en el nivel de expresión de las isoformas se puede observar en otros tumores de carácter metastático en los cuales la isoforma RP-B es más abundante (Fujimoto, 1997). Así, la P4 y la presencia no sólo del RP puede tener un papel importante en el desarrollo y el control de los astrocitomas.

La presencia del RP ha sugerido que el tratamiento con antagonistas de la P4 como el RU486 pudiera ser una alternativa para el tratamiento de los distintos tumores cerebrales incluyendo los astrocitomas ya que para el caso de los meningiomas se ha reportado que el RU486 reduce el volumen del tumor no sólo en cultivos primarios y de líneas celulares (Jay *et al.*,1985, Olson *et al.*,1986) o modelos con tumores xenogrficos subcutneos (Matsuda *et al.*, 1997), sino también en pacientes (Grunberg *et al.*, 2006). Sin embargo, la terapia con el RU486 no ha sido aprobada para su aplicación en la clínica, ya que se ha observado que pacientes que reciben terapia de largo tiempo con RU486 (>1 año) pueden presentar efectos secundarios como insuficiencia renal (Grunber, 1991 y 2006).

Para el caso de los astrocitomas sólo se tiene un estudio donde se analiza el efecto del RU486 sobre la proliferación en un modelo de ratones desnudos que fueron inoculados con una línea celular de astrocitoma humano grado IV llamada U87. El tratamiento con el RU486 (0.1 y 0.5 mg/día/animal) durante un mes disminuyó el tamaño y crecimiento tumoral de manera dosis dependiente en comparación con el control (Pinski *et al.*, 1993).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer es una enfermedad multifactorial caracterizada por una división y crecimiento descontrolado de las células. Uno de los órganos afectados por esta enfermedad es el cerebro; los astrocitomas son tumores cerebrales malignos con un alto grado de invasividad.

Las estrategias actuales utilizadas para su tratamiento no han sido eficaces y comprometen el funcionamiento cerebral. Una alternativa terapéutica para este tipo de tumores es la de carácter hormonal basada en el uso de agonistas o antagonistas a hormonas esteroides como la P4 y su antagonista RU486. Esta propuesta se ve favorecida por la presencia del RP que muestra una expresión diferencial de sus isoformas conforme avanza el grado de evolución de los astrocitomas, lo cual puede tener importantes consecuencias en el pronóstico y tratamiento de este tipo de tumores.

Se ha sugerido de la P4 podría participar en el crecimiento de los astrocitomas, sin embargo, se desconocen sus efectos tanto en la proliferación como en el ciclo celular de este tipo de tumores.

VI. HIPÓTESIS

La P4 modificará la proliferación de las líneas celulares U373 y D54 de grados de evolución III y IV en astrocitomas humanos, lo cual estará relacionado con cambios en el ciclo celular.

Si los efectos de la P4 están mediados por su receptor, entonces el antagonista RU486 revertirá sus efectos.

VII. OBJETIVOS

General

Conocer el efecto de la P4 sobre la proliferación en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54.

Específicos

1. Conocer el efecto de la P4 y del RU486 en el número de células de líneas de astrocitomas humanos U373 y D54, a través del ensayo de exclusión de azul tripano.
2. Determinar el efecto de la P4 y del RU486 sobre las fases del ciclo celular de las líneas U373 y D54.
3. Caracterizar el efecto de la P4 y del RU486 sobre la muerte celular de las líneas de astrocitoma humano U373 y D54.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Condiciones del cultivo.

Para evaluar los efectos de la P4 sobre la proliferación de los astrocitomas se realizaron experimentos *in vitro* con líneas celulares adherentes de carácter neuroepitelial de astrocitoma humano U373 y D54, estas líneas representan los últimos dos grados de diferenciación de los astrocitomas (grado III y IV respectivamente), las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Andrés Gutiérrez del Instituto Nacional de Rehabilitación, México. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo esencial Dulbecco modificado (DMEM) a 37°C y 5% de CO₂ y crecidas en monocapa en cajas de cultivo de 100 mm (55 cm²) hasta un estado de subconfluencia.

8.2. Análisis de proliferación celular.

8.2.1. Estudio dosis respuesta de la P4 sobre el número de células en las líneas de astrocitoma U373 y D54

Para determinar el efecto de la P4 sobre la proliferación en las líneas de astrocitoma U373 y D54 se realizó un experimento dosis respuesta. 4×10^3 células U373 y D54 fueron sembradas en placas de 96 pozos con 250 μ l de medio DMEM durante 24 h. Posteriormente, el medio fue cambiado a un medio DMEM sin rojo fenol y suplementado con suero fetal bovino sin hormonas (Hyclone) por 24 h. A continuación diferentes dosis de P4 (1, 10, 100 nM y 1, 10 μ M) fueron evaluadas, se utilizó 2-hidroxipropil- β -cyclodextrina (0.02%) disuelta en agua estéril como control, ya que la P4 que se utilizó en los experimentos se encuentra acoplada a esta molécula para permitir su disolución en H₂O y en el medio de cultivo. Cada dosis fue evaluada por sextuplicado en tres experimentos independientes durante 5 días. Cabe señalar que las células recibieron en una sola ocasión las dosis señaladas durante todo el experimento.

Ya que el experimento consistió en realizar un conteo total de células, se colectó el medio de cada dosis (para coleccionar las células que se encontraran flotando en el medio) y se colocó en un tubo eppendorff nuevo y

estéril, posteriormente se lavó el pozo con 50 μ l de PBS 0.1 M, pH 7.4 + EDTA 1 mM, el cual también se colectó en el mismo tubo eppendorff, las células adheridas a la placa, fueron incubadas con 100 μ l de PBS 0.1 M, pH 7.4 + EDTA 1 mM por 3 min. a 37°C, fueron recolectadas y por último se enjuagaron los pozos con 50 μ l de PBS 1 X que también fue recolectado. Cada muestra fue centrifugada a 1,000 rpm por 7 min, el botón celular fue resuspendido en 10 μ l de PBS 0.1 M, pH 7.4 y 10 μ l de una solución de azul tripano (0.4% de azul tripano en 0.85% de NaCl). Las células fueron contadas en un hemocitometro y se analizó tanto el número de células totales, las células muertas y vivas presentes en cada tratamiento.

8.2.2 Estudio dosis respuesta del RU486 sobre la proliferación de las líneas U373 y D54.

Para analizar el efecto del RU486 sobre la proliferación de líneas de astrocitoma 4×10^3 células fueron sometidas al mismo tratamiento descrito para P4. Las dosis del antagonista fueron 1 y 10 μ M disueltas en etanol con una concentración final de 0.1% en el medio de cultivo. Se evaluaron estas dosis de RU486 ya que se requiere por lo menos de 100 veces más del antagonista para bloquear la actividad de la P4.

Una vez obtenidas las dosis de P4 y del antagonista que mostraron un efecto significativo en el número de células de las líneas U373 y D54, se realizó un experimento conjunto de P4 (10 nM) y del antagonista (10 μ M) y se evaluó efecto sobre las líneas celulares.

8.3 Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo.

Para determinar el efecto de la P4 sobre el ciclo celular en las líneas de astrocitoma se sembraron 350,000 en cajas de cultivo petri de 55 cm^2 en medio

de cultivo DMEM completo por 24 h, posteriormente, el medio fue cambiado por medio DMEM sin rojo fenol y suero sin hormonas por 24 h, a continuación las células fueron tratadas con una sola dosis de: vehículo (ciclodextrina 0.02%), P4 (10 nM), RU486 (10 μ M) y tratamiento conjunto P4 (10 nM) + RU486 (10 μ M) de tratamiento. Las células fueron colectadas cada día durante 5 días con PBS 0.1 M, pH 7.4 + EDTA 1 mM y fueron obtenidas por centrifugación 1000 rpm/ 7min. El botón celular fue resuspendido en 1 ml de PBS y fijado con 9 ml de etanol frío al 70%. Las células fueron mantenidas a 4 °C hasta el momento de su análisis. Posteriormente, las células fueron centrifugadas 7 min a 1000 rpm y fueron lavadas con 5 ml de PBS 0.1 M, pH 7.4 y nuevamente fueron centrifugadas como fue descrito anteriormente y el botón fue resuspendido en 1 ml de una solución de yoduro de propidio (0.02 μ g/ml), Tritón X-100 (0.1%) y RNasa A libre de DNAsas (0.1 μ g/ml) en PBS. 1×10^6 células por condición experimental fueron analizadas en el citómetro de flujo Becton Dickinson (FACSort) a 535 nm. Los histogramas de DNA fueron colectados y analizados con el programa MODFIT (Cell quest, Ohio).

8.4 Estudio de la muerte celular programada.

La apoptosis fue evaluada a través de la reacción de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling, Gorczyca *et al.*, 1993). 200,000 células de las líneas U373 y D54 fueron crecidas sobre portaobjetos en cajas petri de 60 mm (21 cm²) en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino por 24 h.

Posteriormente, el medio fue retirado y fue sustituido por medio DMEM sin rojo fenol y sin hormonas por 24 h. A continuación fueron adicionados los tratamientos hormonales tal y como se realizaron en los experimentos anteriores, vehículo (ciclodextrina al 0.02% final), P4 (10 nM), RU486 (10 μ M), P4 (10 nM) + RU486 (10 μ M). Durante 5 días el medio fue retirado, las células fueron lavadas con PBS 0.1 M, pH 7.4 frío y posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 1 h. A continuación las células recibieron un lavado nuevamente con PBS 0.1 M, pH 7.4 a temperatura ambiente y fueron mantenidas a 4 °C hasta el momento de su procesamiento.

Antes de realizar el ensayo de fragmentación de DNA las células fueron lavadas con PBS 0.1 M, pH 7.4 y permeabilizadas en una solución de Tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio 0.1% por 2 min en hielo. Para la detección de apoptosis se utilizó el Kit de detección de muerte celular in vitro de Roche. Los controles negativos se incubaron en una solución buffer de reacción (kit) y los controles positivos fueron tratados con DNAsa I (1 mg/ ml) por 10 min. a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron expuestas a 50 μ l de la reacción de TUNEL durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron lavadas en PBS 0.1 M, pH 7.4 y fueron fijadas en pases sucesivos de alcohol al 80%, xilol-alcohol (50:50), xilol y fueron montadas en porta objetos para su análisis en el microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse, E600, Road Melville, NY).

8.5 Western Blot.

Para la determinación de la expresión de las isoformas del RP se realizó la técnica de western blot, para ello se extrajo las proteínas de 2×10^6 células de las líneas celulares U373, D54 (líneas de astrocitoma humano) y T47D (línea de cáncer de mama utilizada como control positivo de expresión de RP), sin ningún tratamiento las cuales fueron colectadas y homogenizadas con el buffer de lisis TDG con inhibidores de proteasas (10 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotretitol, glicerol 30%, 1% de Triton x-100, 15 mM de azida de sodio, 1 mM de EDTA, 4 μ g/ml leupeptina, 22 μ g/ml aprotinina y 1 mM PMSF). Las proteínas fueron obtenidas por centrifugación a 20,000 g a 4° C por 15 min., y fueron cuantificadas por el método de Bradford. 70 μ g de proteína fueron separadas por electroforesis en geles al 10% de SDS-acrilamida a 20 mA. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (60 mA, 2 h, temperatura ambiente en condiciones de semi-humedad). Las membranas fueron bloqueadas a temperatura ambiente con leche libre de grasa al 5% y albúmina al 0.5% por 2 h. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4° C con 2 μ g/ml de anticuerpo policlonal de ratón anti-RP (NeoMarkers RB-1492-P), el cual reconoce ambas isoformas del RP (RP-A y RP-B). Los Blots fueron incubados con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (horseradish preoxidase, Santa Cruz

Biotechnology) por 45 min. La señal fue detectada por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

8.6 Análisis de los resultados.

Para realizar el análisis estadístico se usó el programa SPSS13.0, los datos fueron analizados por una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Tukey para la comparación entre los grupos.

En el siguiente esquema se resume el método empleado en el siguiente trabajo (Fig. 10).

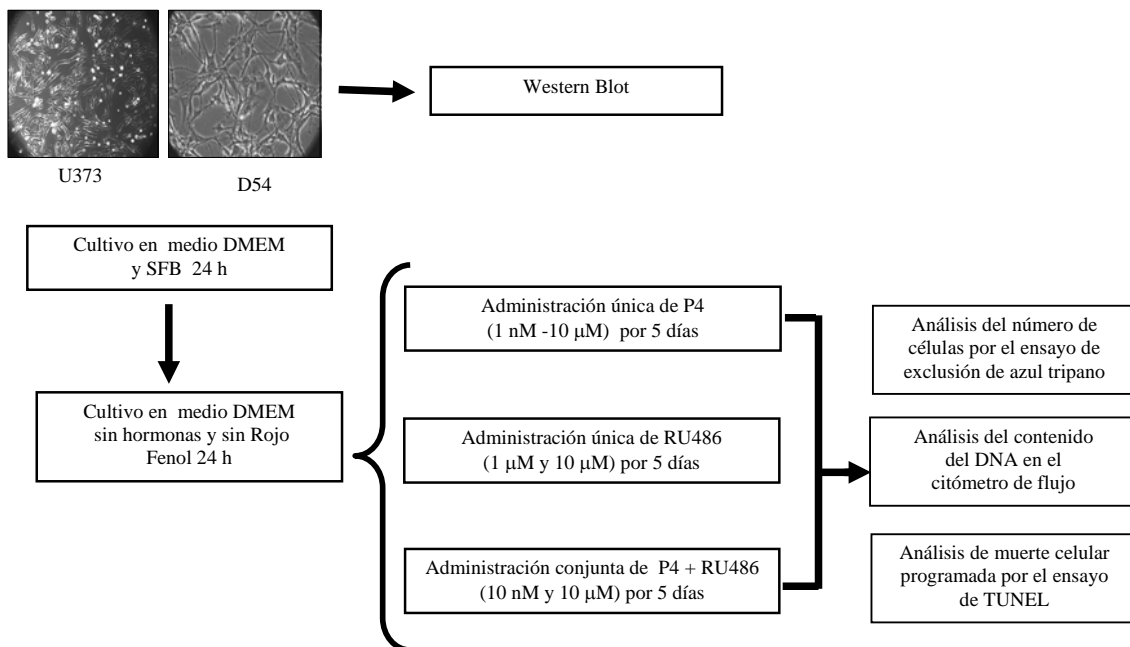


Figura 10. Resumen del método empleado en la realización del estudio. Se mantuvieron las células en medio D-MEM completo por 24 h, posteriormente se mantuvieron 24h en medio D-MEM sin rojo fenol y suero fetal bovino (SFB) sin hormonas, para posteriormente analizar las diferentes condiciones hormonales, y realizar los diferentes análisis, número de células, ciclo celular o apoptosis.

IX. RESULTADOS

9.1. Efectos de la P4 en el número de células de las líneas celulares U373 y D54.

Para evaluar el efecto de la P4 sobre la proliferación de líneas celulares de astrocitomas se realizó un estudio durante 5 días con diferentes dosis de P4 (1 nM hasta 10 μ M) en ambas líneas celulares de estudio (U373 y D54). Los resultados muestran que sólo la dosis de 10 nM tuvo un efecto incrementando significativamente el número de células de ambas líneas celulares comparado con el vehículo a partir del tercer día de tratamiento para la línea U373 y del segundo día para la línea D54, manteniéndose el efecto hasta el final del experimento. Las otras dosis analizadas (1 y 100 nM así como 1 y 10 μ M) no tuvieron un efecto significativo en el número de células de las líneas (Fig. 11). Por otro lado los tratamientos con P4 mantienen a las células viables de entre 94-95% para ambas líneas celulares,

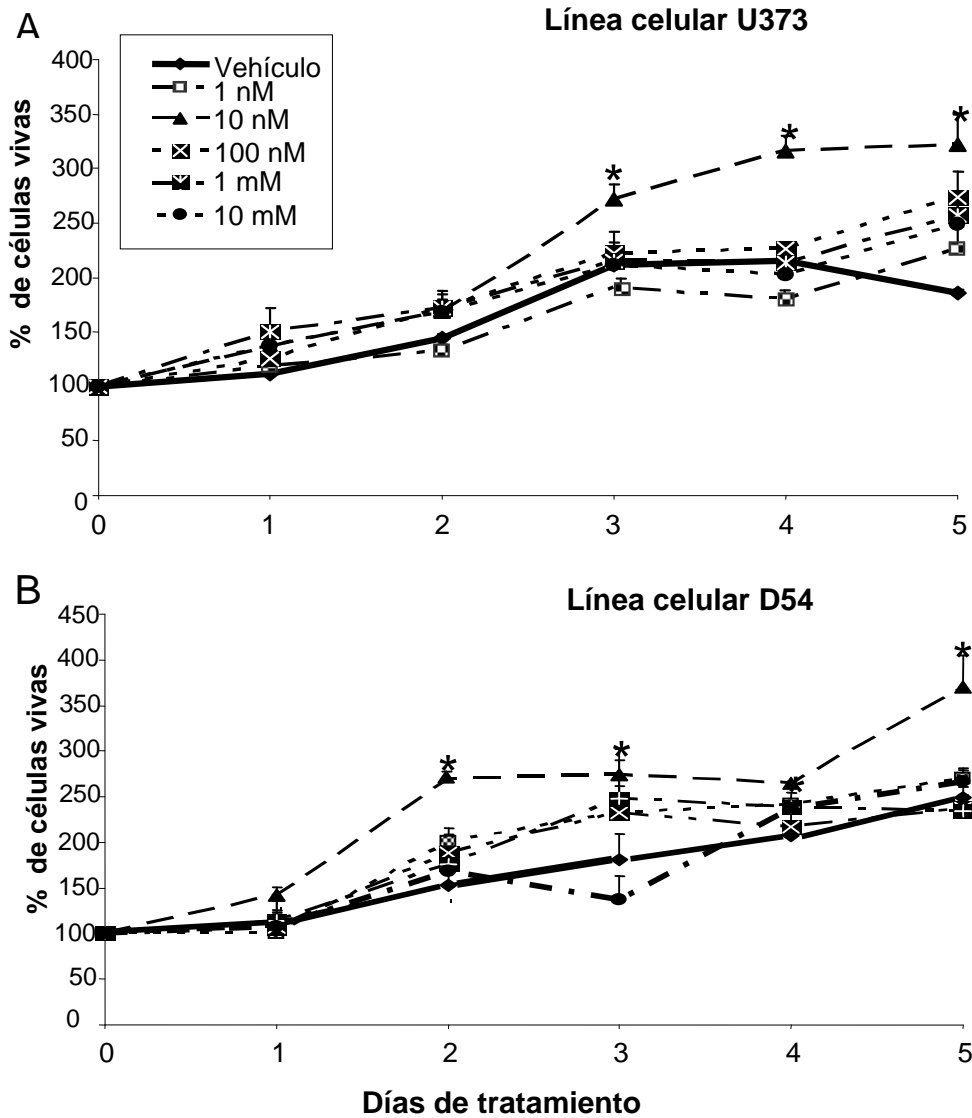


Figura 11. Efecto de la P4 en el número de células de las líneas de astrocitoma humanos U373 y D54.

A) U373 y B) D54. Las líneas celulares fueron tratadas con diferentes dosis de P4 (1, 10, 100 nM y 1 y 10 μM) o vehículo (0.02% de ciclodextrina disuelta en agua estéril). Cada tratamiento fue realizando por sextuplicado en tres experimentos diferentes durante 5 días de tratamiento. Cada día las células fueron colectadas y se realizó el ensayo de exclusión con azul tripano, contando el número de células vivas. Los datos son $X \pm E.S.$, * $P < 0.01$ vs vehículo.

9.2. Efectos del antagonista RU486 en el número de células de las líneas de astrocitoma U373 y D54.

Las líneas tumorales U373 y D-54 fueron cultivadas en presencia del antagonista RU486 (1 μ M y 10 μ M) sin P4. Estas dosis fueron elegidas tomando en cuenta las reportadas en la literatura para asegurarse que todos los RP interactúen con el antagonista. Los resultados muestran que ambas dosis tienen un efecto inhibitorio sobre el número de células de ambas líneas celulares siendo la dosis 10 μ M la más efectiva (Fig. 12). Para ambas líneas celulares, la dosis de 10 μ M tuvo un efecto significativo a partir del segundo día para la línea U373 y el tercer día para la D54 de tratamiento comparado con el control manteniéndose el efecto hasta el final del experimento (Fig. 12).

El tratamiento con RU486 disminuyó la viabilidad celular a un 85% para la línea U373 y de un 90-92% para la línea D54. Tomado en cuenta los resultados obtenidos con la P4 y con el RU486 se realizó un experimento para determinar el efecto de la coadministración de P4 y RU486 sobre el número de células. Los resultados muestran que el tratamiento conjunto bloqueó los efectos de la P4 en el día 4 para la línea U373 y en el día 2 para la línea D54, sin embargo, la viabilidad de se mantuvo en un 97-98%, respectivamente (Fig.13).

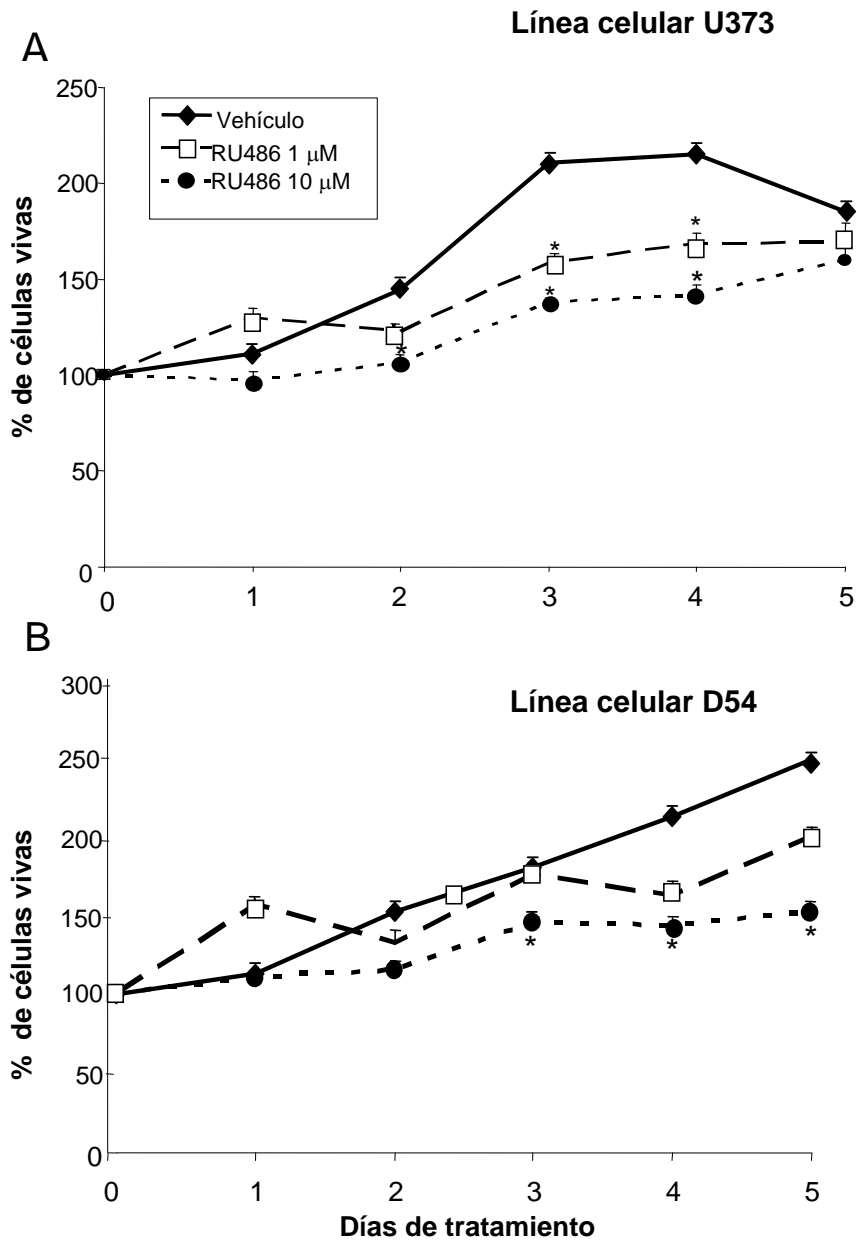


Figura 12. Efecto de RU4896 sobre el número de células de las líneas de astrocitoma. A) U373, B) D54. Las células fueron tratadas con RU486 1 y 10 μM. Las células fueron analizadas como se menciona en la figura 11. Los datos son $X \pm E.S.$, * $P < 0.01$ vs vehículo.

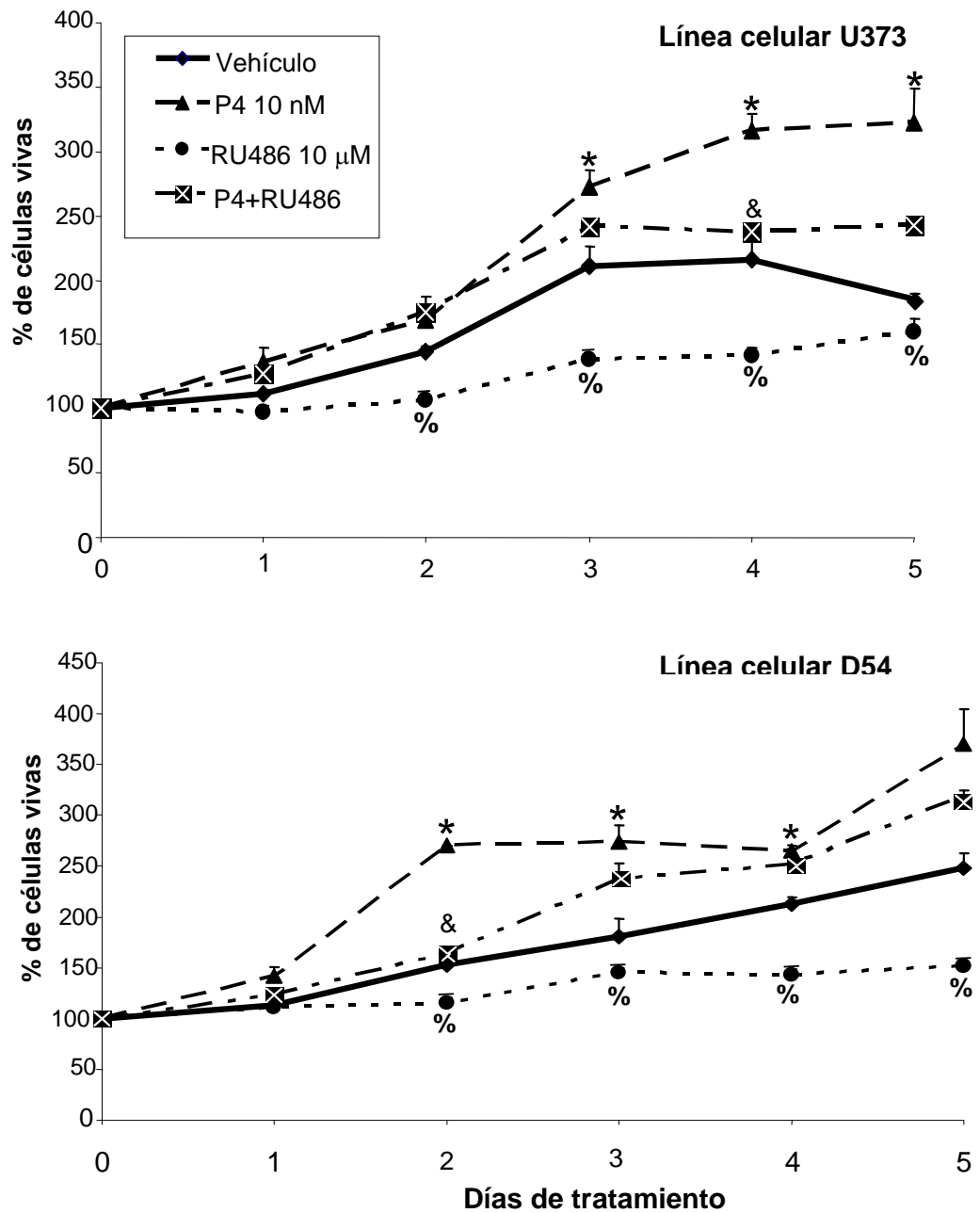


Figura 13. Efecto de la P4 y del RU486 sobre el número de células las líneas de astrocitoma humano U373 y D54. A) U373 y B) D54. Las células fueron tratadas con P4 (10 nM), RU486 (10 μM), P4+RU486 y vehículo. Las células fueron analizadas como se menciona en la figura 11. Los datos son $\bar{X} \pm E.S.$, * $P < 0.01$ vs vehículo, & $P < 0.01$ vs P4, % $P < 0.01$ vs otros grupos.

9.3. Efectos de la P4 y del RU486 sobre las fases del ciclo celular.

En este trabajo se evaluaron los efectos de la P4 y del RU486 sobre el ciclo celular a través del ensayo de citometría de flujo. Los resultados muestran que la P4 provocó un incremento significativo de 1.14 veces (7.92%) en el día 5 en la fase S en el ciclo de la línea U373 en comparación con el vehículo. Mientras que el tratamiento con el antagonista RU486 redujo el número de células en fase S en 1.66 veces (6.93%; Tabla 4, Fig. 14). En la línea D54 no se observaron cambios significativos en el ciclo celular durante los 5 días de tratamiento con P4 (datos no mostrados).

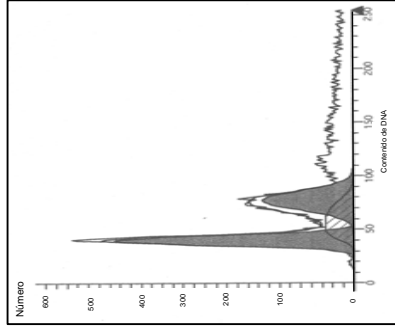
Tabla 4. Análisis del ciclo celular de la línea de astrocitoma U373 expuesta a P4 y RU486

Tratamientos	Días	G0-G1	S	G2/M
	0	42.51 ± 6.0	28.56 ± 6.6	28.92 ± 8.1
Veh	3	56.67 ± 5.5	27.46 ± 7.4	15.86 ± 7.5
	5	58.23 ± 3.7	20.37 ± 4.4	21.39 ± 4.2
	0	43.10 ± 5.8	28.63 ± 8.2	28.26 ± 6.9
P4	3	54.53 ± 1.6	28.58 ± 6.3	16.87 ± 5.7
	5	52.22 ± 8.8	32.89 ± 9.6	14.90 ± 6.3
	0	42.51 ± 6.0	28.56 ± 6.6	28.92 ± 8.1
RU486	3	59.51 ± 3.4	23.45 ± 3.1	17.03 ± 4.3
	5	58.27 ± 5.4	17.15 ± 5.4	24.58 ± 9.1
	0	43.10 ± 5.8	28.63 ± 6.9	28.26 ± 8.2
P4+RU486	3	55.72 ± 3.4	26.99 ± 5.8	17.29 ± 5.0
	5	58.95 ± 2.8	18.19 ± 4.0	22.85 ± 4.8

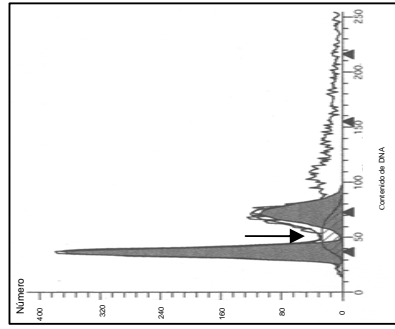
Los valores son % de 4 experimentos por tratamiento $\bar{X} \pm SE$.

D3

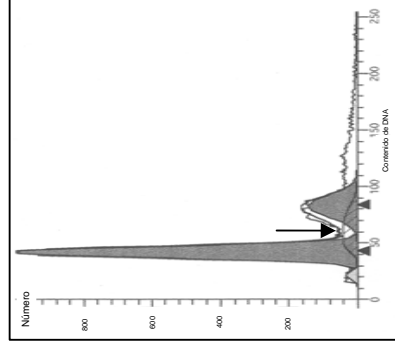
Veh



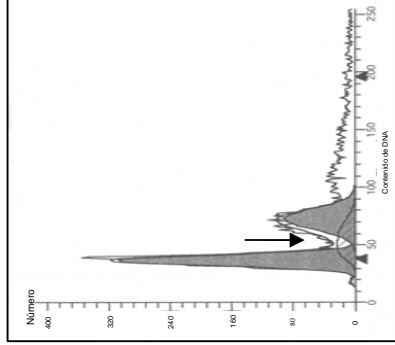
P4



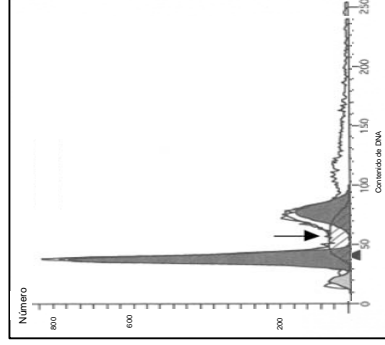
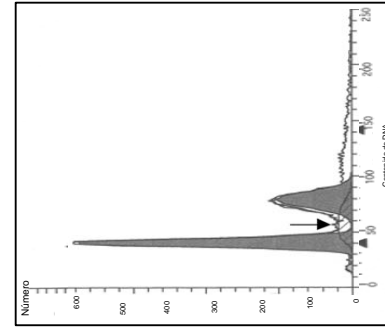
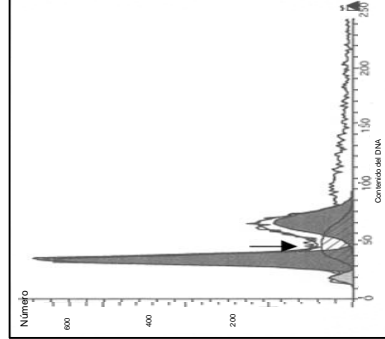
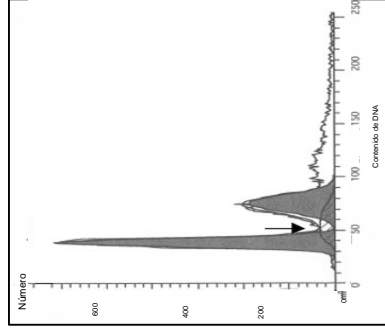
RU486



P4+RU486



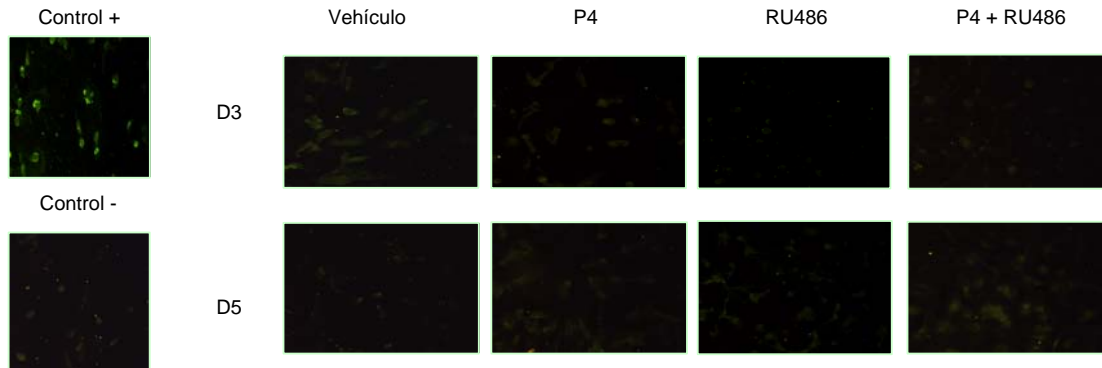
D5



9.4. Efectos de la P4 y del RU486 sobre la apoptosis de las líneas U373 y D54.

Tomado en cuenta el efecto en la reducción en el número de células en el tratamiento con el antagonista RU486 en ambas líneas celulares de astrocitomas, se realizó el ensayo de determinación de la fragmentación del DNA por la técnica de TUNEL para comprobar si la disminución celular se debía a una muerte por apoptosis. Para ello ambas líneas fueron cultivadas con los tratamientos hormonales (Vehículo, P4 10 nM, RU486 10 μ M, P4 10 nM + RU486 10 μ M) durante 5 días. Los resultados mostraron una presencia de células apoptóticas menor al 1% en todos los tratamientos en ambas líneas celulares (Fig. 15). No se observaron cambios morfológicos o muerte con el tratamiento con RU486 por lo que se sugiere la participación de otro mecanismo involucrado en la disminución del número de células.

A) Línea celular U373



B) Línea celular D54

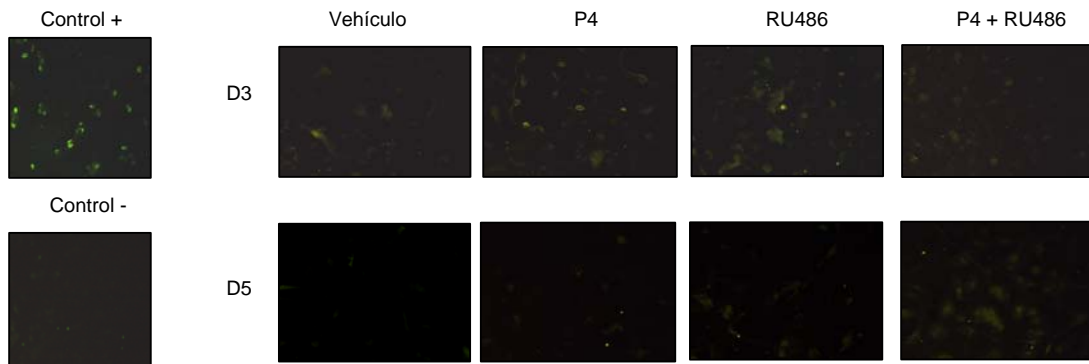


Figura 15. Determinación de la apoptosis celular a través de la técnica de TUNEL en ambas líneas tumorales. Las células fueron cultivadas como se menciona en materiales y métodos. No se detectó apoptosis con ninguno de los tratamientos, solo se detectó apoptosis en los controles positivos los cuales fueron tratados con DNAsa. (D3, D5), días de cultivo.

9.5. Determinación de la expresión del Receptor a Progesterona (RP)

La expresión del RP fue determinada en ambas líneas celulares (U373 y D54) a través de la técnica de Western Blot. Se detectaron dos bandas, una de 94 y otra de 114 kDa que corresponden PR-A y PR-B, respectivamente y se utilizó a la línea celular T47D como control positivo donde se ha caracterizado la expresión de las isoformas de RP.

En la línea U373 presentan un mayor contenido de RP-B mientras que la línea D54 presenta un mayor contenido de RP-A que de RP-B (Fig. 15).

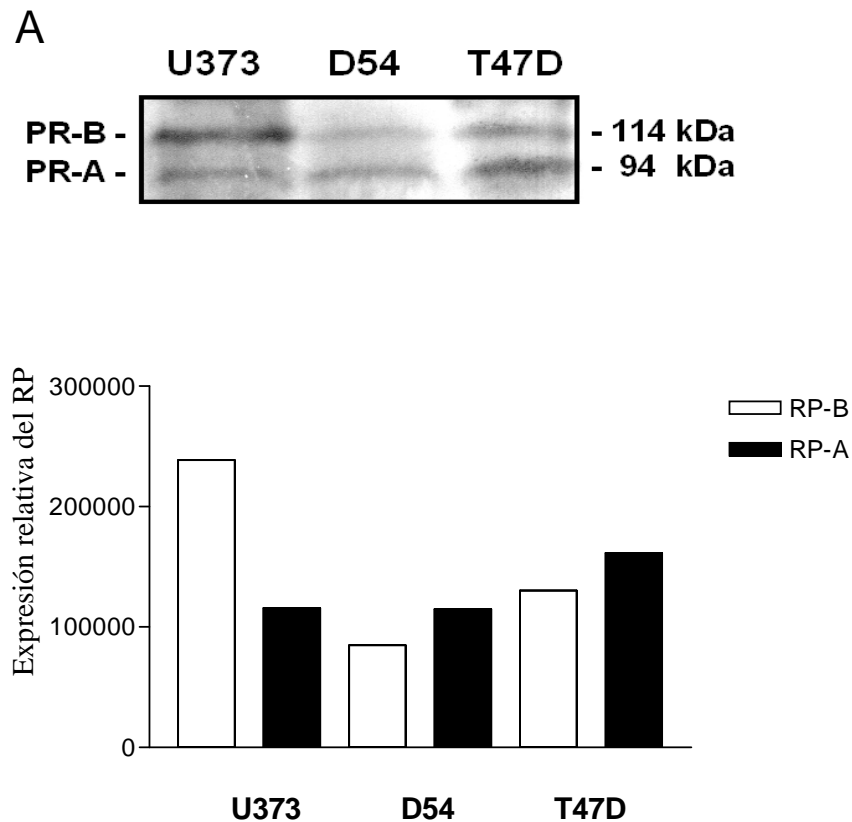


Figura 15 Expresión de las isoformas del RP en las líneas de astrocitoma humano. A) De las líneas de astrocitoma U373, D54 y de cáncer de mama T47D 70 μ g de proteína fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%, los cuales fueron transferidos en membranas de nitrocelulosa y fueron incubadas con el anticuerpo para RP. El complejo proteína-anticuerpo fue detectado por quimioluminiscencia. B) Análisis densitométrico de la expresión del RP

x. **Discusión**

En el presente trabajo se estudió el efecto de la P4 sobre el número de células y el ciclo celular de dos líneas celulares de astrocitoma humanos U373 y D-54 con diferente grado de evolución (grados III y IV, respectivamente) por medio de los ensayos de exclusión por azul tripano y citometría de flujo. Los resultados muestran que la P4 incrementa el número de células de ambas líneas de astrocitoma humano sin modificar la muerte apoptótica y produce un aumento en la fase S del ciclo celular en la línea U373 lo que sugiere un aumento en la proliferación de células en presencia de P4.

En otro tipo de tumores y de líneas celulares se ha reportado que la P4 puede tener propiedades proliferativas como antiproliferativas (Sutherland *et al.*, 1998, Lange *et al.*, 1999). Los resultados en este trabajo sugieren que la P4 pudiera inducir la proliferación de las líneas celulares de astrocitomas humanos, como en el caso del cáncer de endometrio donde altas concentraciones de P4 (25 $\mu\text{g/ml}$) inducen la proliferación celular además de la estimular la vascularidad y angiogénesis endometrial (Chwalisz *et al.*, 2000).

En otro tipo de tumores cerebrales como los meningiomas, diferentes dosis de P4 (1 nM -100 nM) también tienen un efecto proliferativo sobre estos tumores (Jay *et al.*, 1985), sin embargo, en prolactinomas, en el cáncer de endometrio o bien en líneas celulares de cáncer de ovario, la P4 además de tener un efecto antiproliferativo puede inducir apoptosis (Yu *et al.*, 2001, Schairer *et al.*, 2002, Piroli *et al.*, 1998).

El efecto en la inducción de la proliferación de las líneas de astrocitoma podría deberse a la estimulación del ciclo celular en estas células, sobre todo en el caso de la línea U373, donde se observó un aumento significativo en la fase S del ciclo celular al ser tratada con P4. En células de ovario, mama y endometrio en condiciones normales la P4 promueve la proliferación y diferenciación celular. Esta hormona puede actuar en los diferentes tejidos estimulando o reprimiendo la transcripción específica de numerosos genes, muchos de ellos implicados en el ciclo

celular como *c-myc*, y numerosas ciclinas (Rider, 2002). Musgrove ha demostrado que la exposición de P4 en células T47 D induce un aumento la fase S y provoca un arresto en la fase G1 tardía (Musgrove *et al.*, 2001). En cultivos de glándula mamaria de ratón, la P4 también incrementa la síntesis de ADN (Lanari *et al.*, 2002).

Por otro lado, numerosos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* han señalado que los efectos producidos por la P4 son inhibidos en presencia del antagonista RU486. El RU486 es una molécula altamente utilizada en el tratamiento de numerosas patologías como la endometriosis y el cáncer de mama (Spitz, 2003) y en muchos casos no es citotóxico en concentraciones micromolares (Lamberts *et al.*, 1987). El RU486 es una molécula que tiene una alta afinidad por el RP, sus efectos son dependientes de la dosis, provoca un cambio conformacional en éste que bloquea el sitio de interacción con proteínas coactivadoras que es necesario para inducir la transcripción de genes (Leonhardt *et al.*, 2002).

El efecto inhibitor del RU486 se ha reportado en otro grupo de tumores cerebrales como son los meningiomas. Olson en 1987, usando cultivos primarios de meningiomas, demostró una inhibición del crecimiento de las células en un 18% al 36% en los casos analizados. El mismo grupo de investigación usando un modelo con ratones implantados con células tumorales de meningiomas, demostró la desaparición de los nódulos implantados en dos de tres ratones por acción del RU486 (10 mg/kg/día) después de tres meses de estudio (Olson *et al.*, 1987). Así, el tratamiento con RU486 en los tumores cerebrales puede tener efectos variables sobre la proliferación celular, ya que puede tener un doble efecto el cual dependerá no sólo de la concentración del RU486, sino también del contexto celular y de los coreguladores presentes en los diferentes tipos celulares (Jun *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, el tratamiento con RU486 sobre las líneas U373 y D54, provocó una disminución en el número de células de ambas líneas celulares. En células de cáncer de mama T47-D el RU486 incrementa la expresión del inhibidor de cdk p21 lo cual produce una inhibición de los complejos ciclina D1-cdk4 y ciclina E-cdk2 del ciclo celular provocando una acumulación de la proteína pRb y por ende genera un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular (Alban *et al.*, 2001).

Otro efecto descrito para el RU486 es el de ser un fuerte antiglucocorticoide, ya que se une con la alta afinidad al receptor de glucocorticoides (RG) e inhibe los efectos de la dexametasona (agonista del RG) en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Jung-Testas *et al.*, 1983). Estudios en animales (ratones desnudos) sugieren que el RU486 puede ser utilizado en enfermedades reguladas por glucocorticoides como la hipertensión (mediada por glucocorticoides), artritis y glaucoma (Spitz *et al.*, 1993). Los resultados de la fragmentación del DNA por el ensayo de TUNEL muestran que la disminución del número de células con el tratamiento con RU486 no se debe a la presencia de células apoptóticas. Estos resultados sugieren que los efectos del RU486 solo sean a través del retardo de la replicación del DNA.

Muchos trabajos reportan que el tratamiento de cultivos primarios de astrocitomas grado III con dexametasona tienen efectos tanto proliferativos como antiproliferativos (Freshney *et al.*, 1980). En líneas celulares de astrocitomas (A172, T98G) este agonista a glucocorticoides tiene efectos inhibidores de la proliferación tumoral y el RU486 tiene un efecto proliferativo en estas líneas (Kaup *et al.*, 2001).

La P4 puede llevar a cabo sus efectos biológicos a través de los mecanismos genómicos y no genómicos, los resultados obtenidos con el tratamiento conjunto sugieren que los efectos de la P4 en estas líneas celulares son a través de la interacción con su receptor intracelular específico (RP), el cual fue detectado en ambas líneas celulares. Los resultados obtenidos muestran que la RP-B fue la isoforma predominante en la línea celular U373, mientras que la isoforma RP-A lo fue en la D54, lo cual pudiera deberse al diferente grado de evolución de las células. Se ha descrito en astrocitomas de alto grado de evolución expresan en mayor proporción la isoforma RP-B (González-Agüero *et al.*, 2001), la cual se sabe es la isoforma que induce la transcripción de genes y muchos de ellos implicados en la regulación del ciclo celular (Jacobsen *et al.*, 2003). Por otro lado, no se descarta la participación del mecanismo no genómico en los efectos de la P4.

Ahora bien, la diferencia en la regulación del ciclo celular entre las líneas celulares a la presencia de la P4 o del RU486 sugiere, que existe una pérdida del control del ciclo celular conforme al grado de evolución, ya que existe un aumento en la desregulación de las proteínas que participan en la regulación del ciclo celular, principalmente, en la transición de la fase G1-S (ciclina D, pRb, inhibidor p21), cuyas alteraciones han sido descritas para los astrocitomas grado III y IV (Hullerman, 2005). Esto sugiere que los efectos de la P4 dependen del microambiente (cantidad de receptor, presencia de isoformas, coactivadores, correpresores, etc.) presente en los tumores con diferente grado de evolución (Anisimov, 2007).

Así, en este trabajo se destaca la importancia de la P4 en la proliferación de líneas de astrocitomas humanos con diferente grado de evolución, siendo de gran importancia conocer el mecanismo de acción de la P4 y de su antagonista para la aplicación de una terapia hormonal que sea más efectiva que los tratamientos actuales y tener una opción más para mejorar las condiciones de vida que presentan este tipo de enfermedad.

XI. CONCLUSIONES

- La P4 incrementa el número de células de las líneas de astrocitoma humano U373 y D54.
- EL RU486 causa una disminución en el número de células de las líneas de astrocitomas humano U373 y D54 y revierte el efecto proliferativo de la P4 en estas líneas celulares.
- La P4 aumenta la proporción de células en la fase S del ciclo celular en la línea U373.
- La disminución en el número de células en las líneas U373 y D54 producidos por el RU486 no se debe a la presencia de apoptosis celular.

xii. PERSPECTIVAS

1. Analizar el patrón de expresión de las isoformas del RP con los diferentes tratamientos hormonales.
2. Utilizar otros agonistas y antagonistas de la P4 para comprobar que los resultados obtenidos están mediados por el RP y no por el receptor a glucocorticoides.
3. Evaluar la expresión de las ciclinas implicadas en la fase de S del ciclo celular en la línea celular U373 por efecto del RU486 y P4.

XIII. REFERENCIAS

- Alban P, Hurd C, Dinda S, Khattree N, Moudgil VK. 2001. Differential regulation of retinoblastoma protein by hormonal and antihormonal agents in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem* 77:135-141.
- Anisimov VN., 2007. Biology of aging and cancer. *Cancer Control* 14:23-31.
- Assimakopoulou M., Sotitopoulou B, Maraziotis T., Varakis. 1998. Does sex steroid receptor status have any pronostic or predictive significance in brain astrocytomas tumors? *Clin. Neuropatho* 17: 27-34.
- Basso U, Ermani M, Vastola F, Brandes AA. 2002. Non-cytotoxic therapies for malignant gliomas. *J Neurooncol* 58:57-69.
- Beck CA, Estes PA, Bona BJ, Muro-Cacho CA, Nordeen SK, Edwards DP. 1993 The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors. *Endocrinology* 133:728-740.
- Beier HM. 1968. Uteroglobulin a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim. Biophys Acta* 160:289-291.
- Blaauw G, Koudstaal J, Blankenstein MA, Debets-Te Baerts M, Gijzen AH. 1995. Progesterin receptors in meningiomas. Comparison of cytosolic assays with immunocytochemical identification in cryostat and paraffin sections. *Acta Neurochir* 134:83-87.
- Blankenstein MA, Koehorst SG, van der Kallen CJ, Jacobs HM, van Spriell AB, Donker GH, van't Verlaat JW, Blaauw G, Thijssen JH. 1995. Oestrogen receptor independent expression of progesterin receptors in human meningioma-a review *J. Steroid Biochem Molec Biol* 53:361-369.
- Bouillot P, Pelliser J, Devictor B. 1994. Quantitative imaging of estrogen and progesterone receptor, estrogen-regulated protein and growth factor: Immunocytochemical assay in 52 meningiomas. Correlation with clinical and morphological data. *J Neurosurgery* 81: 756-773.
- Brentani MM, Lopez MT, Martins VR, Plese JP. 1984. Steroid receptors in intracranial tumors. *Clin Neuropharmacol* 7:347-350.

- Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG. 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. **J Appl Physiol** 60:590-595.
- Brownsten K, Stevenson L. 2003. The essential guide to Brain Tumors (ed) National Brain Tumors Foundation) pp 24.
- Burris, 2001. The nuclear receptor superfamily, in: T.P. Burris, E.R.B. McCabe (Eds.), Nuclear Receptors and Genetic Disease, Academic Press, New York, pp. 1–57.
- Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE.1997. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. **Annu Rev Med** 48:129-156.
- Camacho-Arroyo I, González Arenas A, González-Moran G. 2007. Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks.Comp **Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** 146(4):644-6
- Camacho-Arroyo I, González-Aguero G, Gamboa-Domínguez A, Cerbón MA, Ondarza R. 2000 Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. **J Neurooncol** 49:1-7.
- Camacho-Arroyo I, Hernández-Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R. 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. **Neurosci Lett** 269:9-12.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. **Rev Invest Clin** 47:329-340.
- Camacho-Arroyo I, Rodriguez-Dorantes M. 2006. Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In: Research Signpost (ed) Molecular Endocrinology Kerala India, pp 25-38.
- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. **J Endocrinol** 142:311-316.
- Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, Gonzalez-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.

- Camacho-Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in the brain. In Gayathri A (ed) Recent Research Developments in Life Sciences. Research Signpost. Kerala. pp.221-242.
- Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM. 1995. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. **Neurosurgery** 37:496-503.
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM. 2005 Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. **Hum Reprod Update**. 11:293-307.
- Chang JE, Robins HI, Mehta MP. 2007 Therapeutic advances in the treatment of brain metastases. **Clin Adv Hematol Oncol** 5:54-64.
- Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1985 Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. **J Steroid Biochem**. 22:121-126.
- Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpff H, Elger W. 2000 Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. **Steroids** 65: 741-751.
- Clarke CL. 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanisms of action: In race GE, Brennecke SP (eds) Molecular aspects of placental and fetal Autacoids. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Csapo AI, Resch BA. 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogestosterone. **Am J Obstet Gynecol** 134:823-827.
- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC. 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats **J Endocrinol** 132:39-45.
- DeVita. 1995. Cáncer, Principios y "Práctica de Oncología, México pp 1444-1455.
- Dluzen DE, Ramírez VD. 1991. Modulatory effects of progesterone upon dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are stereo-specific. **Brain Res** 538:176-179.
- Escobar I. 2004 Glia y tumores. Los nuevos conceptos sobre las funciones de la neuroglia astrocitaria y los mecanismos de su transformación en gliomas. **Rev Mex Neuroci** 6: 571-578.

- Félix I. 1995. Atlas Neuropatología, Vol. I (tumores intracraneanos), (ed) Auroch. México pp1-150.
- Franco-Hernández C, Martínez-Glez V, Rey JA. 2007 Biology molecular of glioblastomas Neurocirugia (Astur). 18:373-82.
- Freshney RI, Sherry A, Hassanzadah M, Freshney M, Crilly P, Morgan D. 1980. Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids. **Br J Cancer** 41:857-866.
- Fujimoto J, Ichigo S, Reiko H, Sakaguchi H, Tamaya T. 1997. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. **J Steroid Biochem Molec Biol** 62:449-454.
- Ganong WF. 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. **Front Neuroendocrinol** 14:233-239.
- Gass EK, Leonhardt SA, Nordeen SK, Edwards DP. 1998. The antagonists RU486 and ZK98299 stimulate progesterone receptor binding to deoxyribonucleic acid in vitro and in vivo, but have distinct effects on receptor conformation. **Endocrinology** 139:1905-1919.
- González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. **Brain Res Bull** 56: 43-48.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Res** 53:1945-1951.
- Gorospe WC, Freeman ME. 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion *in vitro*. **Biol Reprod** 32:279-283.
- Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocr Rev** 18:502-519.
- Grunberg SM, Daniels AM, Muensch H, Daniels JR, Bernstein L, Kortés V, Weiss MH. 1987. Correlation of meningioma hormone receptor status with hormone sensitivity in a tumor stem-cell assay. **J Neurosurg** 66:405-408.

- Grunberg SM, Weiss MH, Russell CA, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Sitruk-Ware R. 2006. Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma **Cancer Invest** 24:727-733.
- Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL. 1991. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestosterone agent mifepristone. **J Neurosurg** 74:861-866.
- Halper J, Colvard DS, Scheithauer BW, Jiang NS, Press MF, Graham ML 2d, Riehl E, Laws ER Jr, Spelsberg TC. 1989. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas: comparison of nuclear binding, dextran-coated charcoal, and immunoperoxidase staining assays. **Neurosurgery** 25:546-552.
- Hanna R, Pang Y, Thomas P, Zhu Y. 2006. Cell-surface expression, progestin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progestin receptors alpha and beta in transfected cells. **J Endocrinol** 190:247-260.
- Hayward E, Whitwell H, Paul KS, Barnes DM. 1984. Steroid receptors in human meningioma. **Clin Neuropharmacol** 7:351-356.
- Honegger J, Renner C, Fahlbusch R, Adams EF. 1997. Progesterone receptor gene expression in craniopharyngiomas and evidence for biological activity. **Neurosurgery** 41:1359-1363.
- Honegger J, Renner C, Fahlbusch R, Adams EF. 1997. Progesterone receptor gene expression in craniopharyngiomas and evidence for biological activity. **Neurosurgery** 41:1359-1363.
- Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. **Endocr Rev** 5:76-127.
- Hulleman E, Helin K. 2005 Molecular mechanisms in gliomagenesis. **Adv Cancer Res** 94:1-27.
- Hurd C, Khatteer N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK. 1995. Homonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line **J Biol Chem** 270: 28507-28510.
- Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ. 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on *corpus luteum* function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. **Endocrinology** 119:1964-1971.

- Inskip T. 1996. Brain and the other Nervous system, Cancer rates and risk 4th Edition. 562-590.
- Jacobsen BM, Richer JK, Sartorius CA, Horwitz KB. 2003. Expression profiling of human breast cancers and gene regulation by progesterone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8:257-268.
- Jay JR, MacLaughlin DT, Riley KR, Martuza RL. 1985. Modulation of meningioma cell growth by sex steroid hormones in vitro. *J Neurosurg* 62:757-762.
- Jun S, Tsai S, Bert W O'Malley. 2007. Distinct temporal and spatial activities of RU486 on progesterone receptor function in reproductive organs of ovariectomized mice. *Endocrinology*. 148:2471-2486.
- Jung-Testas I, Baulieu EE. 1983. Inhibition of glucocorticosteroid action in cultured L-929 mouse fibroblasts by RU 486, a new anti-glucocorticosteroid of high affinity for the glucocorticosteroid receptor. *Exp Cell Res* 147:177-182.
- Karavolas HJ, Hodges DR. 1990. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. *Ciba Found Symp* 153:22-44.
- Kaup B, Schindler I, Knupfer H, Schlenzka A, Preiss R, Knupfer MM. 2001. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol* 51:105-110.
- Ke FC, Ramirez VD. 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 45:514-517.
- 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.
- Lanari C, Molinolo A. A. 2002. Progesterone receptors, animal models and cell signalling in breast cancer diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res.* 4: 240-243.
- Lange CA, Richer JK, Horwitz KB. 1999. Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol Endocrinol* 13:829-836.

- Leonhardt SA, Edwards DP. 2002 Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med* 227:969-980.
- Magrassi L, Bono F, Milanese G, Butti G. 1992. Vitamin D receptor expression in human brain tumors *J Neurosurg Sci* 36:27-30.
- Matsuda Y, Kawamoto K, Kiya K, Kurisu K, Sugiyama K, Uozumi T. 1994. Antitumor effects of antiprogestones on human meningioma cells in vitro and in vivo. *J Neurosurg* 80:527-534.
- Meizel S, Turner KO. 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 77:R1-5.
- Meyer ME, Pornon A, Ji JW, Bocquel MT, Chambon P, Gronemeyer H. 1990. Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J*:3923-3932.
- Michelsen JJ, New PF. 1969. Brain tumour and pregnancy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 32:305-307.
- Murphy AA, Zhou MH, Malkapuram S, Santanam N, Parthasarathy S, Sidell N. 2000 RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells. *Fertil Steril*. 74:1014-1019.
- Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, murphy LC, Lazarus L. 1986. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 46: 728-734.
- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee Cs, Sweenwy KJ, Watts CK, Sutherland RL. 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. *Mol Cell Biol* 13:3577-3587.
- Musgrove EA, Hunter LJ, Lee CS, Swarbrick A, Hui R, Sutherland RL. 2001 Cyclin D1 overexpression induces progestin resistance in T-47D breast cancer cells despite p27 (Kip1) association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem*. 276:47675-47683.
- Musgrove EA, Lee Cs, Sutherland RL. 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor α , epidermal growth factor receptor, *c-fos* and *c-myc* genes. *Mol Cell Biol* 11:5032-5043.

- Nguyen JP, Caron JP, Gaston A, Lovarn R, Poirier J, 1984. Anatomico-radiological correlations in astrocytic cerebral tumors. **Neurochirurgie** 30:11-15.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas *Acta Neuropathol.* 109:93-108.
- Olson JJ, Beck DW, Schlechte JA, Loh PM. 1986 Effect of the antiprogestone RU-38486 on meningioma implanted into nude mice. **J Neurosurg** 66:584-587.
- Paoletti P, Butti G, Zibera C, Scerrati M, Gibelli N, Roselli R, Magrassi L, Sica G, Rossi G, Robustelli della Cuna G. 1990. Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. **J Neurosurg** 73:736-742.
- Pasqualini JR, Paris J, Sitruk-Ware R, Chetrite G, Botella J. 1998. Progestins and breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol** 65:225-235.
- Perrot-Applanat M, David-Ferreira JF. 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. **Cell Tissue Res** 223:627-639.
- Petitti N, Etgen AM. 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. **Neuroendocrinology** 55:1-8.
- Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV. 1993. Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. **J Clin Endocrinol Metab** 77:1388-1392.
- Piroli G, Torres A, Grillo C, Lux-Lantos V, Aoki A, De Nicola AF. 1998. Mechanisms in progestin antagonism of pituitary tumorigenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol** 64:59-67.
- Pluchino N, Luisi M, Lenzi E, Centofanti M, Begliuomini S, Freschi L, Ninni F, Genazzani AR. 2006. Progesterone and progestins: effects on brain, allopregnanolone and beta-endorphin. **J Steroid Biochem Mol Biol** 102:205-213.
- Poisson M, Pertuiset BF, Hauw JJ, Philippon J, Buge A, Moguilewsky M, Philibert D. 1983. Steroid hormone receptors in human meningiomas, gliomas and brain metastases. **J Neurooncol** 1:179-189.

- Prieto A, Villamar-Cruz O, Saqui-Salces M, Neri-Gómez T, Almaraz-Nieves A, Hernández-Molina V I, Valdez Rodríguez H, Camacho-Arroyo I. 2003. ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? **Edu Quím** 14: 196-201.
- Rider V. 2002. Progesterone and the control of uterine cell proliferation and differentiation. **Front Biosci** 1; 7:d1545-1555.
- Rothchild I. 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P (Eds) Progesterone and progestins. Raven Press, New York, pp 219-229.
- Sager G, Orbo A, Jaeger R, Engstrom C. 2003. Non-genomic effects of progestins--inhibition of cell growth and increased intracellular levels of cyclic nucleotides. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 84:1-8.
- Sandoval Balanzario, Rangel Morales, Castillo Herrera, Becerra Lomelí, Sandoval Olivares. 2004. Práctica clínico-quirúrgica en astrocitomas cerebrales grado II **Rev Med IMSS** 42: 157-162.
- Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E. 1990 Molecular action of progesterone. **Int J Biochem** 22:579-594.
- Schaeffer C, Roos J, Aron C. 1990 Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. **Horm Behav**; 24:50-61.
- Schairer C. 2002 Progesterone receptors--animal models and cell signalling in breast cancer. Implications for breast cancer of inclusion of progestins in hormone replacement therapies. **Breast Cancer Res** 4:244-248.
- Speirs V, Boyle-Walsh E, Fraser WD., 1997. Constitutive co-expression of estrogen and progesterone receptor mRNA in human meningiomas by RT-PCR and response of in vitro cell cultures to steroid hormones. **Int. J. Cancer** 72:714-719.
- Spitz IM, Bardin CW. 1993 Mifepristone (RU 486) a modulator of progestin and glucocorticoid action. **N Engl J Med** 329:404-412.
- Spitz IM, Croxatto HB, Robbins A. 1996 Antiprogestins: mechanism of action and contraceptive potential. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 36:47-81.

- Spitz IM. 2003 Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. ***Steroids*** 68:981-993.
- Stojkovic RR, Jovancevic M, Santel DJ, Grcevic N, Gamulin S. 1992. Sex steroid receptor in intracranial tumors. ***Cancer*** 65:1968-1970.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptor in human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. ***Hum Reprod*** 9:1589-1595.
- Sutherland RL, Musgrove EA. 2004. Cyclins and breast cancer. ***J Mammary Gland Biol Neoplasia*** 9:95-104.
- Sutherland RL, Prall OW, Watts CK, Musgrove EA. 1998. Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. ***J Mammary Gland Biol Neoplasia*** 3:63-72.
- Tata JR. 2002. Signalling through nuclear receptors. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 3:702-710.
- Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M., 1992. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. ***FEBS Lett*** 1308:116-120.
- Topper YJ, Freeman CS. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. ***Physiol Rev*** 60: 1049-1106.
- Valenzuela Z. 1990. Neuropatología de meningiomas serie del hospital de especialidades Centro Medico la Raza, 1980-1989 (ed) IMSS. México. pp 58.
- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM. 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 195:525-532.
- Weisz J, Ward I. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. ***Endocrinology*** 106:306-316.
- Wiebe JP. 2006. Progesterone metabolites in breast cancer. ***Endocr Relat Cancer***. 13:717-738.

- Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. 2002. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. ***Neuro Oncol.*** 4:278-299.
- Yu S, Lee M, Shin S, Park J 2001. Apoptosis induced by progesterone in human ovarian cancer cell line SNU-840. ***J Cell Biochem*** 82:445-451.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P. 2003 .Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 4;100:2237-2242.
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. 2003. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 100:2231-2236.

Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines

Gabriela González-Aguero · Andrés A. Gutiérrez · Diana González-Espinosa · José D. Solano · Rocío Morales · Aliesha González-Arenas · Edith Cabrera-Muñoz · Ignacio Camacho-Arroyo

Received: 28 September 2007 / Accepted: 31 October 2007 / Published online: 15 November 2007
© Humana Press Inc. 2007

Abstract Astrocytomas are the most frequent primary brain tumors and constitute a leading cause of cancer-related deaths. We studied the effects of progesterone and its antagonist, RU486, on cell growth of two human astrocytoma cell lines with different evolution grade (U373, grade III; and D54, grade IV). Progesterone receptor expression was determined by Western blot. The effects of different doses of progesterone and RU486 on cell number, cell cycle, and apoptosis were analyzed for five consecutive days. Progesterone (10 nM) significantly increased the number of D54 cells from the second day of culture, and the number of U373 cells on days 3–5. RU486 (10 μ M) blocked progesterone effects in both astrocytoma cell lines. Interestingly, RU486 administered without progesterone significantly reduced the number of cells from the second day of culture in both cell lines. Progesterone increased S phase of cell cycle in U373 cells (61%, on day 5). RU486 blocked the effects of progesterone on cell cycle but administered alone did not significantly change cell cycle profile. DNA fragmentation (TUNEL) assay showed that the diminution in the number of astrocytoma cells produced by RU486 was not by apoptosis. Progesterone receptor isoforms were detected in both cell lines. Our data

suggest that progesterone induces cell growth of human astrocytoma cell lines through the interaction with its nuclear receptor.

Keywords Astrocytomas · Cell growth · D54 cells · Progesterone · Progesterone receptor · RU486 · U373 cells

Introduction

Astrocytomas comprise the most common primary malignant brain tumors in adults, representing between 30 and 40% of all tumors with fatal outcomes in the majority of patients [1, 2]. Astrocytomas are classified according to their histological characteristics in four groups (I–IV) being the fourth group the more malignant characterized by excessive proliferation, neovascularization, and high invasiveness [3].

The treatment given to patients with astrocytomas depends on many factors, including the tumor size and localization, its growth rate, and the symptoms the patient is experiencing. Various strategies have been used to treat astrocytomas including extensive surgical resection, fractionated and focused radiation, and intracavitary and/or intra-arterial chemotherapy that result in prolonged and non always significant survival for patients but compromise brain function [4]. An alternative for the treatment of astrocytomas is hormonal therapy based on sex steroid hormones such as progesterone (P4), which participates in the regulation of cell proliferation of several tumors [5, 6]. It has been reported that a progestin, medroxyprogesterone, inhibits S-phase of C6 rat glioma cells [7], but the anti-progestin RU486 also inhibits the growth of a human astrocytoma cell line injected in nude mice [8]. However, P4 effects on human astrocytomas growth have not been well characterized.

G. González-Aguero · J. D. Solano · A. González-Arenas · E. Cabrera-Muñoz · I. Camacho-Arroyo (✉)
Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF 04510, Mexico
e-mail: camachoarroyo@gmail.com

A. A. Gutiérrez · D. González-Espinosa
Unidad de Terapia Celular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Mexico DF, Mexico

R. Morales
Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico DF, Mexico

P4 elicits its effects mostly by interaction with its classical progesterone receptor (PR), which is a ligand-activated transcription factor and it is considered as a predictive marker for disease prognosis and for response to hormonal therapy in breast cancer [9]. It has been found that PR expression directly correlates with histological grades of human astrocytomas, suggesting that PR-positive tumors possess a high proliferative potential [10]. PR exhibits two isoforms (PR-A and PR-B) with different function and regulation [11]. Previous studies in our laboratory have reported the expression pattern of PR isoforms in human astrocytomas [12]. We found that the predominant PR isoform expressed in astrocytomas grades III and IV was PR-B. This differential expression is important because P4 can exert different function in a cell depending on the expression of PR isoforms [12, 13].

In spite of the presence of PR in human astrocytomas, the role of P4 in astrocytomas cell growth and the participation of PR in this process are unknown. In this work, we studied the effects of P4 and its antagonist RU486 on cell growth of human astrocytoma cell lines U373 and D54, corresponding to grades III and IV of tumor evolution, respectively. We also determined the presence of PR isoforms in these cells by Western blot analysis.

Results

Effects of P4 and RU486 on the growth of U373 and D54 human astrocytoma cells lines

A time-course study over a 5-day period with different doses of P4 (1 nM–10 μ M) was performed in U373 and D54 human astrocytoma cell lines. Although the majority of P4 doses induce a slight increase in cell growth of both cell lines, only the dose of 10 nM significantly increased the number of cells from the second day of culture in D54 cells and from the third day in the case of U373 cells. In both cell lines P4 (10 nM) effect persisted until day 5 (Fig. 1). The treatment with RU486 (10 μ M) without P4 for 5 days significantly decreased the number of U373 and D54 cells as compared with vehicle treatment from the second day of the experiment (Fig. 2). RU486 co-administered with P4 significantly blocked the effects of the latter on days 2 and 4 in D54 and U373 cells, respectively (Fig. 2).

Effects of P4 and RU486 on cell cycle and apoptosis

We evaluated P4 and RU486 effects on cell cycle by flow cytometry. P4 produced a significant increase (61% on day 5) in S phase of the cell cycle in U373 cells as compared

with cells treated with vehicle (Fig. 3 and Table 1), whereas RU486 administration reduced the number of cells in S phase (16% on day 5) (Fig. 3 and Table 1).

In the D54 cell line no significant changes were observed in the cell cycle during 5 days of culture (data not shown). In order to assess whether apoptosis had a role in the reduction of the number of cells after RU486 treatment, U373 and D54 cells were examined for apoptotic activity using the TUNEL assay. In situ detection of apoptotic cells revealed an absence of apoptotic cells in both cell lines during treatment with RU486 (data not shown). The percentage of cells in apoptosis was <1% in all cases. No cell death or apparent morphological changes were observed during treatment with RU486.

Determination of PR expression

PR expression was determined in U373 and D54 cells by Western blot. PR-A and PR-B isoforms were detected as bands of 94 and 114 kDa, respectively. PR-B presented a higher content than PR-A in U373 cells, whereas PR-A was the predominant one in D54 cells (Fig. 4).

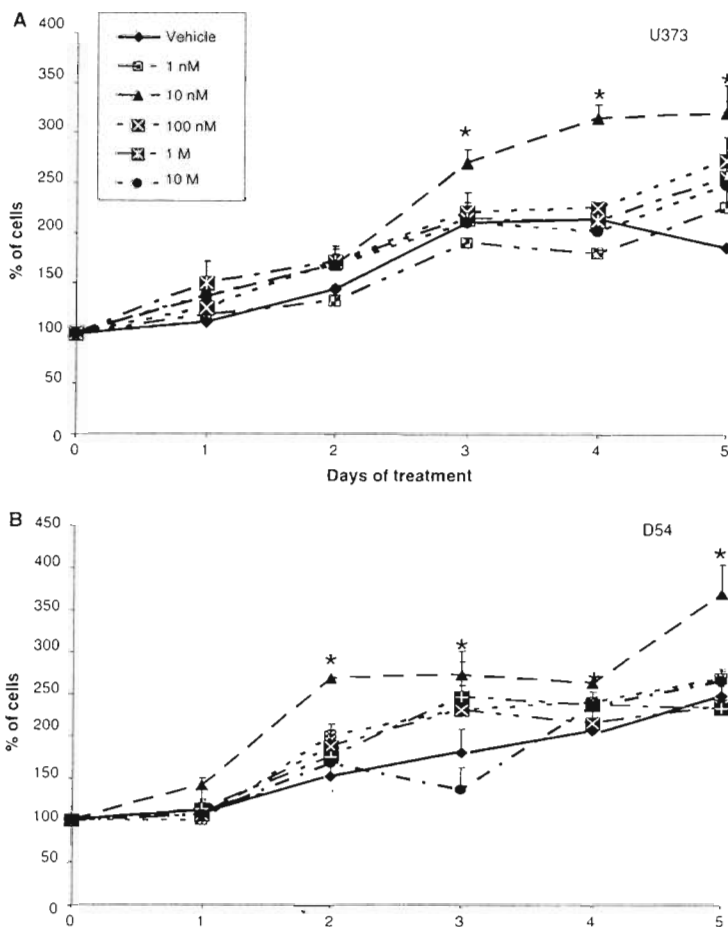
Discussion

In the present study, we examined the role of P4 and its receptors (PR) in the regulation of cell growth of two human astrocytoma cancer cell lines: U373 and D54. The results show that P4 increases cell growth of human astrocytoma cells, whereas its antagonist RU486 blocks P4 effects, and administered alone inhibits cell growth. In other brain tumors P4 has different effects. In cell cultures of meningiomas (intracranial or intraspinal from the arachnoid layer of meninges) different doses of P4 (1–100 nM) stimulate cell growth [14, 15], but P4 inhibits cell growth of prolactinomas [16].

P4 can exert its effects through genomic or non-genomic mechanisms. Our results suggest that P4 effects on astrocytomas cell growth occurs via a classical genomic mechanism through an interaction with PR, since RU486 blocked P4 effects on cell growth and cell cycle distribution, and PR isoforms are present in U373 and D54 cells. The participation of other mechanisms involving membrane progesterone receptors cannot be discarded, although these receptors have not been described in astrocytomas. It is important to mention that the concentration of P4 (10 nM) that induces a significant increase in the number of astrocytoma cells is found in the luteal phase of the woman menstrual cycle [17].

PR has been detected in several human brain tumors such as meningiomas, chordomas, craniopharyngiomas,

Fig. 1 Effects of P4 on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. (a) U373 and (b) D54 human cancer cell lines were treated with different doses of P4 (1, 10, and 100 nM, and 1 and 10 μ M) or vehicle (0.02% cyclodextrin in sterile water). Each treatment was performed in six different experiments, each one by triplicate for 5 days. Every day cells were removed from incubation and the number of cells was measured by trypan blue dye exclusion using an inverted microscope. Data are means \pm E.S. * $P < 0.01$ vs. vehicle

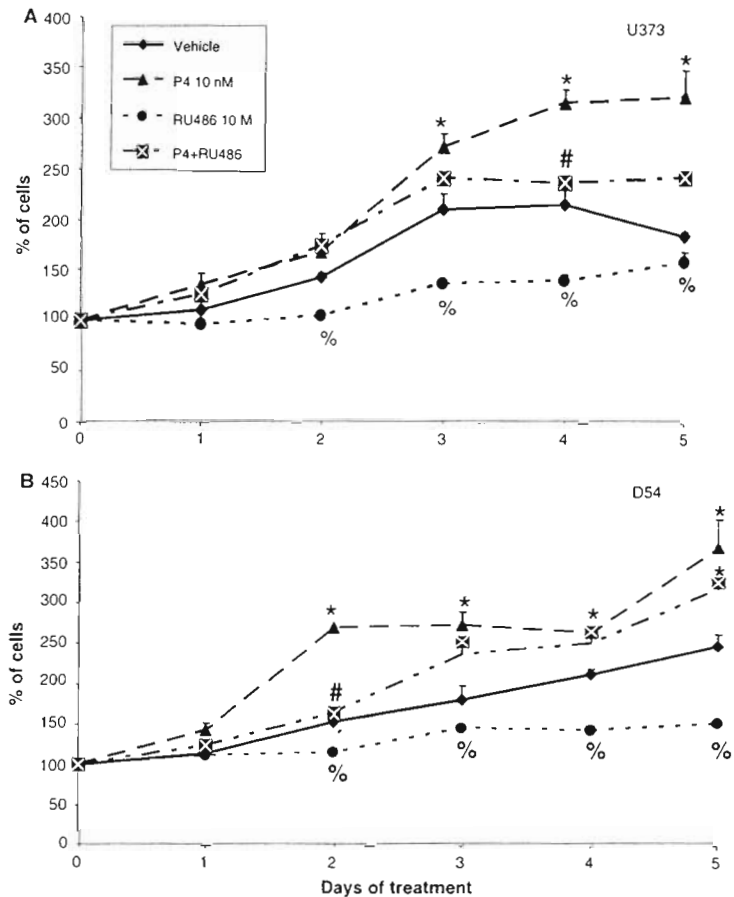


and astrocytomas [18–20]. It has been found that PR expression directly correlates with histological grades of human astrocytomas, suggesting that PR-positive tumors possess a high proliferative potential [10, 12]. The expression of PR in U373 and D54 cells (Fig. 4) suggests that P4 and RU486 effects are mediated by this receptor. We observed that PR-B was the predominant isoform in U373 cells, whereas PR-A was the predominant one in D54 cells. Thus, this differential PR isoform expression should be involved in the distinct effects of P4 effects in U373 and D54 cells such as those observed in cell cycle.

Interestingly, RU486 alone significantly diminished the number of U373 and D54 astrocytoma cells. This antagonist, at the same concentration used in our work, has been found to

exert antiproliferative activities in vitro in neuroblastoma and meningioma cells [21]. Besides, the proliferation of glioma U87MG cell line grafted in nude mice was reduced by RU486 [8]. Although RU486 can interact with glucocorticoid receptor, it has higher affinity for PR, and it is known that induces a conformational change in the ligand binding domain of PR that does not allow the recruitment of coactivators but facilitates receptor interaction with corepressors [22–24]. The molecular mechanisms involved in RU486 effects in U373 and D54 cells are unknown; however, it is possible that RU486 modifies (diminishing or increasing) the expression of several set of genes in these cells as it has been reported, by using microarrays, in female mice (without P4 treatment) [25, 26].

Fig. 2 Effects of P4 and RU486 on cell growth of U373 and D54 cells. (a) U373 and (b) D54 cells were treated with P4 (10 nM), RU486 (10 μ M), P4 + RU486, and vehicle. Cells were analyzed as mentioned in Fig. 1. Data are means \pm E.S. * P < 0.01 vs. vehicle, # P < 0.01 vs. P4, % P < 0.01 vs. the other groups



Results of DNA fragmentation (TUNEL) assay show that the diminution in the number of U373 and D54 cells observed after RU486 treatment is not due to apoptosis since the number of TUNEL labeled cells did not significantly change during all the experiment (from day 0 to day 5 of culture). Thus, it is possible that RU486 effects should be due to a retardation of DNA replication, thereby inhibiting further progress in the cell cycle. Although P4 and RU486 modified cell cycle profile of U373 cells, this effect was not observed in D54 cells, suggesting that cell cycle regulation by P4 depends on the astrocytomas evolution grade [27].

In conclusion, P4 induces cell proliferation in two human astrocytoma cell lines, U373 and D54 (grades III and IV, respectively), which is blocked by its antagonist

RU486, suggesting that P4 effects are mediated by its nuclear PR which is expressed in these cells.

Materials and methods

Cell lines and culture

U373-GB and D54 human astrocytoma cell lines derived from human astrocytomas grades III (ATCC, Manassas, VA) and IV, generously obtained by Dr. Andres Gutiérrez from Dr. Sontheimer (Birmingham, AL) laboratory, and T47D human breast cancer cells (used as positive control of PR expression) were maintained in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) and RPMI medium,

Fig. 3 Cell cycle analysis of U373 cells after P4 and RU486 treatment. Histograms of DNA content show the effects of vehicle (VEH), P4 and its antagonist, RU486, on cell cycle distribution on day 5 (D5). Cells were treated as in Fig. 2. Arrows indicate S phase of the cell cycle. Number in Y axis indicates the events (cells) quantified in each phase of the cell cycle

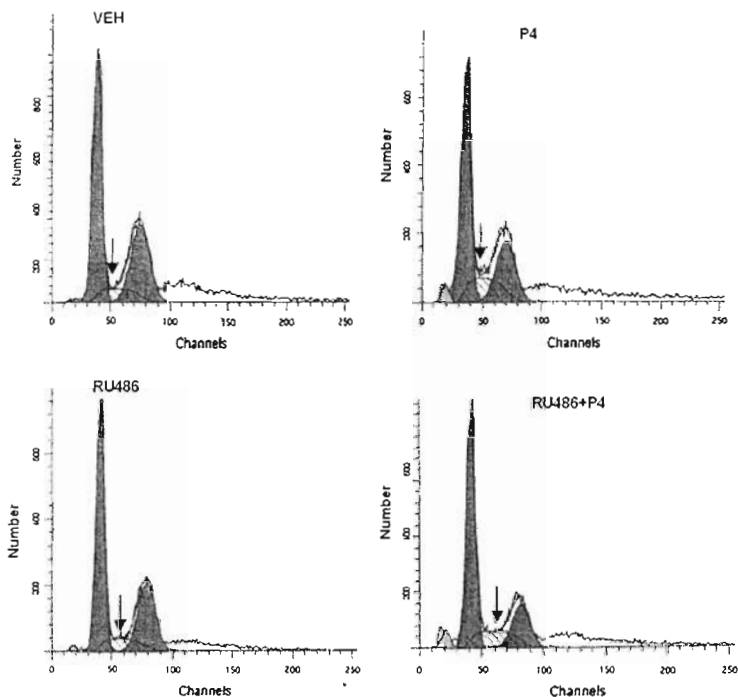


Table 1 Cell cycle analysis of U373 cells exposed to P4 and RU486

Treatment	Days	G0-G1	S	G2/M
Veh	0	42.51 ± 6.0	28.56 ± 6.6	28.92 ± 8.1
	3	56.67 ± 5.5	27.46 ± 7.4	15.86 ± 7.5
	5	58.23 ± 3.7	20.37 ± 4.4	21.39 ± 4.2
P4	0	43.10 ± 5.8	28.63 ± 8.2	28.26 ± 6.9
	3	54.53 ± 1.6	28.58 ± 6.3	16.87 ± 5.7
	5	52.23 ± 8.8	32.89 ± 9.6*	14.90 ± 6.3
RU486	0	42.51 ± 6.0	28.56 ± 6.6	28.92 ± 8.1
	3	59.51 ± 3.4	23.45 ± 3.1	17.03 ± 4.3
	5	58.27 ± 5.4	17.15 ± 5.4	24.58 ± 9.1
P4 + RU486	0	43.10 ± 5.8	28.63 ± 6.9	28.26 ± 8.2
	3	55.72 ± 3.4	26.99 ± 5.8	17.29 ± 5.0
	5	58.95 ± 2.8	18.19 ± 4.0	22.85 ± 4.8

Values are % of cells in each phase of the cell cycle. Data are means ± SE of four experiments per treatment

* $P < 0.05$ as compared with vehicle (Veh) on day 5

respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO NY), 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids (all from GIBCO), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ were grown

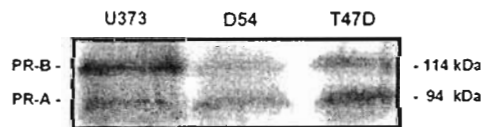


Fig. 4 PR isoforms expression in U373 and D54 human astrocytoma cell lines. D54, U373 and T47D cells were lysed and proteins (70 µg) were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with antibodies for PR as described in Materials and methods. The protein-antibody complexes were detected by ECL

as monolayer cultures in 100 cm² cell culture dish (Corning, NY).

Hormones

Progesterone-water soluble (cyclodextrin-encapsulated progesterone) and (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin were dissolved in sterile water and prepared in culture medium DMEM phenol red-free medium. RU486 (Sigma, St Louis) was dissolved in ethanol and prepared in culture medium with a final ethanol concentration of 0.1%.

Treatment

U373 and D54 cell lines were plated on 96-well microtest plates in 250 μ l of DMEM with 10% FBS at a cell density of 4×10^3 cells for 24 h. Medium was changed by DMEM or RPMI phenol red-free medium supplemented with 10% FBS without steroid hormones (Hyclone, Utah), 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids during 24 h. Then, different doses of P4 (1, 10, and 100 nM, 1 μ M, and 10 μ M), or hormone vehicle (0.02% w/v cyclodextrin in sterile water) were added to the culture (day 0).

Each dose–response experiment was performed in six independent cultures, each one by triplicate, during 5 days. In other experiments, the effects of P4 (10 nM), RU486 (10 μ M), and P4 (10 nM) + RU486 (10 μ M) administered at the same time were also evaluated during 5 days.

Cell growth

Cells were harvested from incubation every day during five consecutive days with PBS 1X + EDTA (1 mM). Then, they were centrifuged (1,000 rpm/7 min) and the pellet was resuspended in 10 μ l of PBS 1X and 10 μ l of Trypan blue. The number of living cells, evaluated by a blind observer, was measured by trypan blue dye exclusion [28] using an inverted microscope (Olympus CKX41, Center Valley, PA).

Cell cycle analysis by flow cytometry

A total of 350,000 U373 or D54 cells were seeded in 100 cm^2 cell culture dishes, cultured, and treated with P4 and RU486 as mentioned above. Cells were collected every day during 5 days after treatments with P4 and RU486. Cells were washed from dishes by incubation in PBS 1X-EDTA for 3 min at 37°C. then they were scraped from dishes, transferred to sterile 15-ml tubes and obtained by centrifugation (1,000 rpm/7 min). Cells were washed twice in PBS 1X, and were fixed with 70% ethanol at 4°C. Next, samples were washed with PBS, centrifuged (1,000 rpm/7 min), and cell pellet was suspended in 1 ml of staining solution (0.02 μ g/ml propidium iodide, 0.1% Triton X-100, and 0.1 μ g/ml RNase A 1 free DNase in PBS). 1×10^6 cells per day and treatment were analyzed at 535 nm on a Becton Dickinson (FACSort) flow cytometer. Data were collected and DNA histograms were analyzed with the program MODFIT (Cell Quest, Ohio).

Detection of apoptosis

Apoptosis was evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate

(dUTP) nick end labeling (TUNEL) method [29]. A total of 200,000 U373 or D54 cells were seeded on glass coverslips in 50 cm^2 cell culture dish in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h. Medium was changed by DMEM phenol red-free medium supplemented with 10% FBS without steroid hormones, 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids during 24 h. Then, hormonal treatments: vehicle, P4 (10 nM), RU486 (10 μ M), and P4 (10 nM) + RU486 (10 μ M) were administered on day 0, and apoptosis was evaluated daily for 5 days. Every day medium was retired, cells were washed with cool PBS 1X, and were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h. Cells were washed again with PBS 1X at room temperature and were conserved at 4°C. The In Situ Cell Death detection Kit, fluorescein kit (ROCHE, Basel), was used and the procedure protocol recommended by manufacturer was followed. Briefly, cells were permeabilized with 0.1% Triton X100 in sodium citrate 0.1% solution for 2 min at 4°C. Negative control reaction buffer and positive control reaction treated with Dnase I (Invitrogen, Carlsbad) for 10 min at room temperature were performed. Samples were then subjected to 50 ml of TUNEL reaction mixture in a humidifier chamber at 37°C for 60 min. We detected labeled ends as fluorescent signal (green) under fluorescence microscopy (Nikon eclipse, E600, Road Melville, NY). The apoptotic index was estimated by counting the number of stained apoptotic cells using the Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) in each culture (three independent cultures in triplicate per experimental condition).

Protein extraction and western blotting

U373, D54 and T47D cells (2×10^6) plated in 100 cm^2 dishes without any treatment were collected and homogenized in TDG lysis buffer with protease inhibitors (10 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothreitol, 30% glycerol, 1% Triton X-100, 15 mM sodium azide, 1 mM EDTA, 4 μ g/ml leupeptin, 22 μ g/ml aprotinin, and 1 mM PMSF). Proteins were obtained by centrifugation at 20,000g, at 4°C for 15 min, and quantified by the method of Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Proteins (70 μ g) were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE at 20 mA. Colored and enhanced chemiluminescence markers (Bio Rad, CA and Gibco-BRL, MD) were included for size determination. Gels were transferred 2 h to nitrocellulose membranes (Amersham, NJ) (60 mA, at room temperature in semi dry conditions), which were blocked at room temperature with 5% non-fat dry milk and 0.5% bovine serum albumin for 2 h. Membranes were then incubated with 2 μ g/ml of mouse-anti-PR polyclonal

antibody (NeoMarkers RB-1492-P, Fremont, CA), which recognizes both PR isoforms (PR-A and PR-B), at 4°C overnight. Blots were then incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 45 min. Signals were detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham, NJ).

Data analysis

Statistical analysis was performed by SPSS13.0 software for windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey test for comparison between groups.

Acknowledgments The authors thank Dr. M.A. Cerbón, Dr. Marcela Lizano, and Dr. Ana Salazar for their advice on this investigation. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project No. 43224-Q), México.

References

1. K. Allan, R.C. Jordan, L.C. Ang, M. Taylor, B. Young, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**, 216–220 (2000)
2. R.M. Kirla, H.K. Haapasalo, H. Kalimo, E.K. Salminen, *Cancer* **97**, 644–648 (2003)
3. C. Dumas-Duport, B. Scheithaver, J. O'Fallon, P. Kelly, *Cancer* **62**, 2152–2165 (1988)
4. U. Basso, M. Ermani, F. Vastola, A.A. Brandes, *J. Neurooncol.* **58**, 57–69 (2002)
5. S. Yu, M. Lee, S. Shin, J. Park, *J. Cell. Biochem.* **82**, 445–451 (2001)
6. H. Seeger, D. Wallwiener, A.O. Mueck, *Horm. Metab. Res.* **35**, 76–80 (2003)
7. M.A. Altinöz, A. Bilir, E. Ozar, F.D. Onar, A. Sav, *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 541–547 (2001)
8. J. Pinski, G. Halmos, Y. Shirahige, J.L. Wittliff, A.V. Schally, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1388–1392 (1993)
9. A. Nicolini, A. Carpi, G. Tarro, *Front. Biosci.* **1**, 1818–1843 (2006)
10. H. Khalid, S. Shibata, M. Kishikawa, A. Yasunaga, M. Iseki, T. Hiura, *Cancer* **80**, 2133–2140 (1997)
11. I. Camacho-Arroyo, A. González-Arenas, G. González-Morán, *Comp. Biochem. Physiol. A* **146**, 644–652 (2007)
12. G. González-Aguero, R. Ondarza, A. Gamboa-Domínguez, M.A. Cerbón, I. Camacho-Arroyo, *Brain Res. Bull.* **56**, 43–48 (2001)
13. J. Fujimoto, S. Ichago, R. Hirose, H. Sakaguchi, T. Tamaya, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **62**, 449–454 (1997)
14. J.J. Olson, D.W. Beck, J. Schlechte, P.M. Loh, *J. Neurosurg.* **65**, 99–107 (1986)
15. J.R. Jay, D.T. MacLaughlin, K.R. Riley, R.L. Martuza, *J. Neurosurg.* **62**, 757–762 (1985)
16. G. Piroli, A. Torres, C. Grillo, V. Lux-Lantos, A. Aoki, A.F. De Nicola, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **64**, 59–67 (1998)
17. K. Stening, O. Eriksson, L. Wahren, G. Berg, M. Hammar, A. Blomqvist, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R1711–R1716 (2007)
18. I. Camacho-Arroyo, G. González-Aguero, A. Gamboa-Domínguez, M.A. Cerbón, R. Ondarza, *J. Neurooncol.* **49**, 1–7 (2000)
19. R.S. Carroll, J. Zhang, K. Dashner, M. Sar, P.M. Black, *Neurosurgery* **37**, 496–503 (1995)
20. J. Honegger, C. Renner, R. Fahlbusch, E.F. Adams, *Neurosurgery* **41**, 1359–1363 (1997)
21. I.M. Spitz, *Steroids* **68**, 981–993 (2003)
22. S.M. Grunberg, M.H. Weiss, C.A. Russell, I.M. Spitz, J. Ahmadi, A. Sadun, R. Sitruk-Ware, *Cancer Invest.* **24**, 727–733 (2006)
23. M.J. Tetel, P.H. Giangrande, S.A. Leonhardt, D.P. McDonnell, D.P. Edwards, *Mol. Endocrinol.* **13**, 910–924 (1999)
24. S.E. Wardell, D.P. Edwards, *Semin. Reprod. Med.* **23**, 9–21 (2005)
25. Y.P. Cheon, Q. Li, X. Xu, F.J. DeMayo, I.C. Bagchi, M.K. Bagchi, *Mol. Endocrinol.* **16**, 2853–2871 (2002)
26. I.C. Bagchi, Q. Li, Y.P. Cheon, S.R. Mantena, A. Kannan, M.K. Bagchi, *Semin. Reprod. Med.* **23**, 38–45 (2005)
27. V.N. Anisimov, *Cancer Control.* **14**, 23–31 (2007)
28. N. Keshelava, T. Frgala, J. Krejsa, O. Kalous, C.P. Reynolds, *Methods Mol. Med.* **110**, 139–153 (2005)
29. W. Gorczyca, J. Gong, Z. Darzynkiewicz, *Cancer Res.* **53**, 1945–1951 (1993)