



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LA PROGESTERONA EN LA REGULACIÓN
DE LA EXPRESIÓN DE VEGF Y EGFR EN LAS
LÍNEAS CELULARES DE ASTROCITOMAS
HUMANOS U373 Y D54**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

TANIA KARINA GONZÁLEZ GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Francisco Javier Plasencia De la Parra

VOCAL: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SECRETARIO: Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

1er. SUPLENTE: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: M. en C. Edith Araceli Cabrera Muñoz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 107 EDIFICIO "F",
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. OLIVIA TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE: TANIA KARINA GONZÁLEZ GARCÍA

La realización de la presente tesis fue posible gracias al apoyo económico brindado por el Subprograma 127 del Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y por la DGAPA, UNAM (Proyecto PAPIIT: IN212611), bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química.

DEDICATORIA

♥ A mis papás ♥

No hay palabras suficientes ni adecuadas para expresar cuánto los amo.

Mis estrellas, mi motivación, mi ejemplo a seguir...

Hacen que al final del día, todo el esfuerzo valga la pena.

“As the moon kindles the night

As the wind kindles the fire

As the rain fills every ocean

And the Sun the Earth

your heart will kindle my heart

Take my heart

Take my heart

Kindle it with your heart

And my heart cannot be

Kindled without you

with your heart kindle my heart”

♪ A mi hermana 🎧

Mi amuleto de la suerte, me haces feliz con tu sola presencia.

Como siempre lo he dicho y lo seguiré diciendo...eres la mejor.

Cualquiera envidiaría la vida junto a ti. ¡Te amo!

“...and then you call me and it's not so bad, it's not so bad, and

I want to thank you for giving me the best day of my life

Oh, just to be with you is having the best day of my life...”

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ignacio Camacho, por demostrar confianza en mí desde los inicios de mi carrera, por darme la oportunidad de participar activamente en el mundo de la investigación científica, por el apoyo brindado y por las recomendaciones que han hecho mejorar mi formación académica.

A Tania Hernández. Mi muy querida mentora, gracias por compartirme tus conocimientos y experiencia, por la paciencia, tiempo invertido, consejos y valiosas enseñanzas. Por mostrarme lo emocionante de un buen resultado después de haberse esforzado por obtenerlo, teniendo la certeza de aportar información confiable a la ciencia. Tu responsabilidad y dedicación han sido mi principal guía. Gracias por estar conmigo. ¡Trabajar contigo fue la mejor elección!

A Andy, mi hermanita. Tú me das la confianza para seguir cuando me parece más difícil. Gracias por tu apoyo incondicional y por siempre ser parte de mis logros. Durante más de quince años has hecho que estudiar me sea más placentero y divertido. Eres un gran motivo para cada día mejor. Gracias, Misif ¡nunca lo olvidaré!

A mi hermosa mamá...eterna amiga. A mi papá...*para ti, querido Pinoccio*. Los mejores. Les agradezco infinitamente por hacer de mí una mejor persona, por todo el amor que me dan, por hacerme tan feliz y por estar siempre ahí para mí, dispuestos a ayudarme y apoyarme hasta en lo más mínimo. Gracias por enseñarme que vale la pena esforzarse para conseguir lo que uno desea y que la mejor decisión es levantarse después de una caída. Una vez más... ¡Los amo!

A Úrsula Ordaz y Humberto García, porque hicieron crecer en mí ese gusto y amor por la ciencia del cual no me daba cuenta.

A mis abuelitos y a Trini, que siempre han tenido para mí palabras de ánimo, me han apoyado y me hacen sentir bien. Los adoro.

A Edith, Aliesha, Jorge, Valeria, Graciela, Alejandro, Miguel y Gaby, que han hecho que mi estancia en el Laboratorio 107 sea tan agradable como divertida. De cada uno he aprendido grandes cosas. Gracias por sus consejos y apoyo.

A mi gran amiga Luisa Nivón. ¡Qué suerte tuve por haberte encontrado hace ya muchos años y qué afortunada soy por seguir teniendo tu amistad! He tenido la dicha de compartir contigo muchos momentos; los importantes y otros innumerables que no lo son tanto ¡Te quiero!

A Teresita, Mary y Karla, a quienes quiero y de quienes estoy muy orgullosa. Desde un inicio me brindaron su amistad e hicieron que mi camino por la facultad fuera de lo mejor. Gracias por acompañarme durante todo este tiempo.

A José y Fernando, a quienes quiero y admiro. ¡Qué bueno que tuve la oportunidad de conocerlos mejor! Encontré en ustedes una amistad muy especial que no pienso dejar. Gracias por los momentos y aventuras compartidas.

A Laura, Stephani y Bety. Porque nunca es tarde para encontrar buenos amigos...les agradezco por los geniales momentos que hemos pasado y por permitirme formar parte de sus vidas. Las quiero.

Al Dr. Javier Plasencia y a la Dra. Vanessa Maya. Porque con sus observaciones y comentarios, sin duda enriquecieron este trabajo.

A la UNAM y a la Facultad de Química, a las cuales estoy muy orgullosa de pertenecer. Mi agradecimiento por haber aportado los elementos necesarios para llegar a cumplir de la mejor manera una de mis grandes metas.

*“Tantas cosas extraordinarias le habían ocurrido ya,
que Alicia empezaba a pensar que en realidad
muy pocas cosas eran imposibles”*

Alicia en el país de las maravillas

ÍNDICE

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
4. Antecedentes	4
4.1. Astrocitomas	4
4.2. Estructura y funciones de la progesterona (P ₄)	8
4.2.1. Antagonistas de P ₄	11
4.3. Receptor a progesterona (RP)	13
4.3.1. Características y función del RP	13
4.3.2. Isoformas del RP	15
4.4. Mecanismos de acción de la P ₄	17
4.5. P ₄ y tumores cerebrales	19
4.6. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	20
4.7. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	24
4.8. Efecto de la P ₄ en la expresión de VEGF y EGFR	29
5. Planteamiento del problema	31
6. Hipótesis	31
7. Objetivos	32
7.1. Objetivo general	32
7.2. Objetivos particulares	32
8. Metodología	33
8.1. Cultivo celular	33
8.2. Extracción de RNA total	34
8.3. RT-PCR	35
8.3.1. Oligonucleótidos	35
8.3.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	35
8.3.3. PCR	36
8.4. Extracción de proteínas totales	37
8.5. Western blot	38

8.6. Análisis densitométrico y estadístico	39
9. Resultados	40
10. Discusión	48
11. Conclusiones	53
12. Referencias	54
13. Anexo	65
13.1. Estandarización de condiciones para PCR	65
13.2. Niveles basales de mRNA de VEGF y EGFR en líneas celulares U373 y D54	66

1. ABREVIATURAS

AA	Astrocitoma anaplásico
AF	Función de activación
AP	Proteína activadora
DBD	Dominio de unión al DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
FSH	Hormona folículo estimulante
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
hRP	Receptor a progesterona humano
Hsp	Proteína de choque térmico
LBD	Dominio de unión al ligando
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NLS	Secuencia de localización nuclear
P₄	Progesterona
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor a progesterona
RTK	Receptor con actividad de tirosina cinasa
RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
Sp1	Proteína específica 1
SPRM	Modulador selectivo del receptor a progesterona
SRC	Coactivador de receptores a hormonas esteroides
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

2. RESUMEN

La progesterona (P_4) es una hormona esteroide secretada principalmente por los ovarios. Sus principales órganos blanco son el útero, la glándula mamaria y el cerebro. Esta hormona es fundamental en la regulación de la reproducción, además de participar también en la regulación de muy diversos procesos no asociados a la reproducción. Aunque la P_4 realiza sus efectos a través de diversos mecanismos, la mayoría son mediados a través de la unión con su receptor intracelular, el receptor a progesterona (RP).

Se sabe que la P_4 puede participar en el proceso de tumorigénesis en tejidos u órganos blanco y se ha propuesto que puede regular el crecimiento de los astrocitomas, que son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano. Los astrocitomas presentan alteraciones en la expresión de genes como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular, y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis. Se ha reportado que la expresión de VEGF y EGFR es regulada por la P_4 en células de cáncer de mama, pero no se conoce su papel en la regulación de la expresión de estos genes en astrocitomas humanos.

En el presente trabajo se determinó el efecto de la P_4 sobre la expresión a nivel del mRNA y de la proteína de VEGF y EGFR en las líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 y D54 (grados III y IV de evolución, respectivamente) por medio de las técnicas de RT-PCR y Western blot.

En la línea celular D54 el tratamiento con P_4 durante 12 h aumentó significativamente la expresión del mRNA de VEGF y EGFR. El contenido de la proteína de VEGF y EGFR aumentó con P_4 a las 24 h. Además, el tratamiento conjunto de P_4 y del antagonista del RP, RU486, revirtió los efectos de la P_4 . Por otro lado, la P_4 no mostró un efecto sobre la expresión de los dos genes en la línea celular U373. Estos datos sugieren que la P_4 regula la expresión de VEGF y EGFR en las líneas celulares de astrocitomas humanos a través de su receptor intracelular dependiendo del grado de evolución tumoral.

3. INTRODUCCIÓN

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

Se han encontrado diversos factores asociados con el desarrollo y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar *et al.*, 2009). Existen informes que sugieren que las hormonas sexuales, entre las que se encuentra la progesterona (P_4), pueden participar en el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; Gonzalez-Agüero *et al.*, 2007; Gonzalez-Agüero *et al.*, 2001). Además, existe evidencia que indica que la P_4 es capaz de regular la expresión de ciertos genes, como VEGF y EGFR (Liang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007), los cuales comúnmente se encuentran implicados en procesos tumorales (Furnari *et al.*, 2007).

A pesar de las investigaciones sobre hormonas y su relación con el desarrollo de tumores, se desconoce el papel de la P_4 en la regulación de la expresión de VEGF y EGFR en astrocitomas, por lo que en este trabajo se estudió el efecto de la P_4 sobre la expresión de dichos genes en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (grados III y IV, respectivamente).

4. ANTECEDENTES

4.1. Astrocitomas

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

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

- *Astrocitoma pilocítico (grado I)*

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

- *Astrocitoma difuso (grado II)*

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

- *Astrocitoma anaplásico (grado III)*

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

quimioterapia (Buckner *et al.*, 2007). El tiempo de supervivencia de los pacientes con esta patología es de 2-3 años (Louis *et al.*, 2007).

- *Glioblastoma multiforme (grado IV)*

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

Los glioblastomas pueden desarrollarse por progresión a partir de gliomas de menor malignidad (“glioblastoma secundario”) o desarrollarse *de novo*, es decir, sin evidencia de una lesión previa de menor malignidad (“glioblastoma primario”), los cuales representan aproximadamente el 90% de los casos (Furnari *et al.*, 2007). Morfológicamente, los glioblastomas primarios y secundarios son indistinguibles entre ellos. Clínicamente, los glioblastomas secundarios tienden a ocurrir en pacientes jóvenes (con una media de 45-50 años), mientras que los glioblastomas primarios ocurren mayormente en pacientes de edades más tardías (Sarkar *et al.*, 2009). La supervivencia de los pacientes con GBM es corta, generalmente fallecen dentro

del primer año después del diagnóstico (Louis *et al.*, 2007). Estos tumores son muy resistentes a la radioterapia y quimioterapia y debido a su alta capacidad para infiltrarse, en especial al parénquima cerebral, generalmente no es posible realizar resección quirúrgica (Hadjipanayis *et al.*, 2009).

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

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

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

4.2. Estructura y funciones de la progesterona (P₄)

La P₄ (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol; por lo que al igual que éste, contiene un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Ganong, 2006). El primer paso en su biosíntesis corresponde a la conversión de colesterol en pregnenolona, reacción que tiene lugar en la mitocondria. Posteriormente, la pregnenolona pasa de la mitocondria al retículo endoplásmico liso donde es convertida en P₄ (Figura 1) (Schumacher *et al.*, 2009).

La P₄ es sintetizada y secretada por los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), testículos, glándulas adrenales y placenta (Henley *et al.*, 2005). Además, puede ser sintetizada en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, ya sea *de novo* a partir del colesterol o a partir de pregnenolona circulante (Baulieu, 1999). En los vertebrados, la síntesis y secreción de P₄ está regulada por otras hormonas, tales como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Henley *et al.*, 2005).

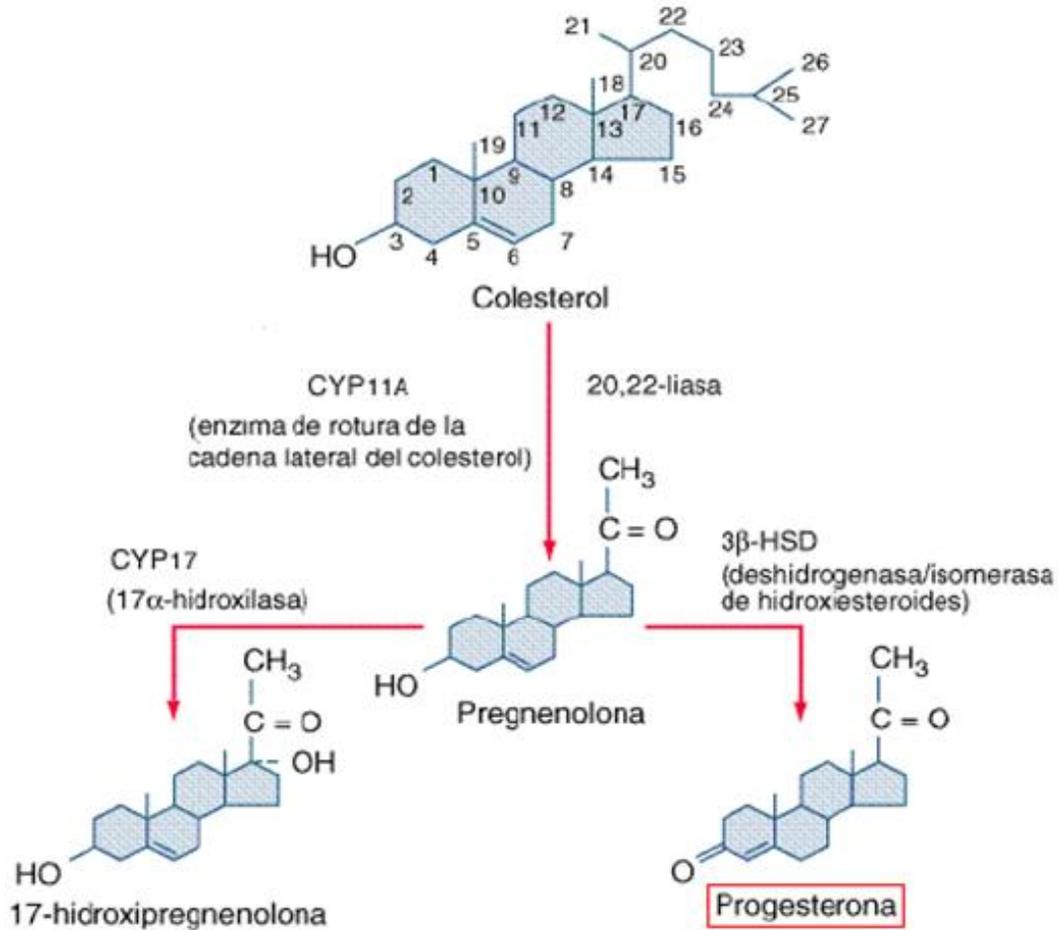


Figura 1. Biosíntesis de la P₄. Conversión de colesterol a pregnenolona por CYP11A (también llamada colesterol 20,22-desmolasa o P450_{scc}) y de ésta a P₄ por la enzima 3β-hidroxisteroide deshidrogenasa (3β-HSD). La 3β-HSD cataliza 2 reacciones: la deshidrogenación del grupo OH del carbono (C) 3 y la subsecuente isomerización del doble enlace entre el C5 y C6 a un doble enlace entre el C4 y C5 (Carr *et al.*, 2005).

Cuando es metabolizada, la P₄ es convertida a 5α-dihidroprogesterona (5α-DHP), metabolito que es susceptible a una reducción y es convertido a 3α,5α-tetrahydroprogesterona (3α,5α-THP) (Figura 2). Además, puede ser convertida a 20α-hidroxiprogesterona, un metabolito con menor actividad biológica (Schumacher *et al.*, 2009).

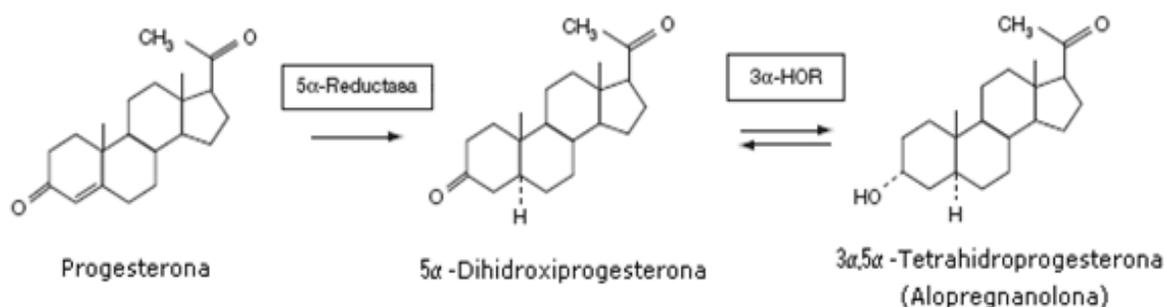


Figura 2. Metabolismo de la P₄. La enzima 5α-reductasa cataliza la conversión de P₄ a 5α-DHP, mientras que la 3α-hidroxiesteroide oxidorreductasa (3α-HOR; también llamada 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa) cataliza la conversión de 5α-DHP a 3α,5α-THP (alopregnanolona) (Schumacher *et al.*, 2009).

Cerca del 2% de la P₄ circulante está en su forma libre, mientras que 80% está unida con albúmina y 18% con globulina de unión a corticosteroides (Ganong, 2006; Westphal *et al.*, 1973). La P₄ tiene una vida de 34.8-55.13 horas (Klein *et al.*, 2001) y en el hígado se convierte en pregnandiol, el cual se conjuga con ácido glucurónico y se excreta en la orina (Figura 3) (Ganong, 2006).

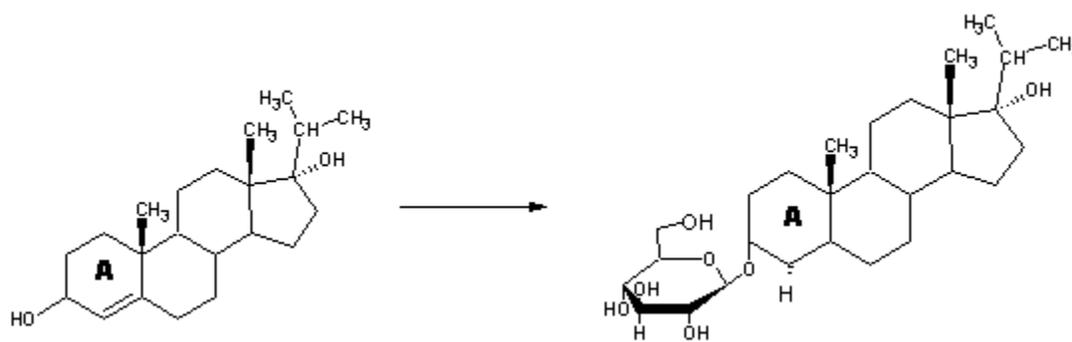


Figura 3. Formación de un glucurónido a partir de pregnandiol.

En los varones, la concentración plasmática de P₄ es cercana a 300 pg/mL. En las mujeres, la concentración de P₄ cambia a lo largo del ciclo menstrual (Tabla 1), en el embarazo y en la menopausia (Ganong, 2006).

Tabla 1. Concentración plasmática de P₄ en las diferentes etapas del ciclo menstrual.

Etapa	Progesterona (pg/mL)
Menstruación	100-500
Folicular	100-1000
Ovulatoria	1000-2000
Lútea	4000-15000

La P₄ se encuentra involucrada en la regulación de un amplio número de funciones en los mamíferos. Participa en procesos como la regulación de la ovulación, estimulación de la regeneración del estroma endometrial, mantenimiento del embarazo, desarrollo alveolar de la glándula mamaria como parte de la preparación para la lactancia (Graham *et al.*, 1997), ascenso de la temperatura basal en la ovulación (Ganong, 2006), estimulación de la respiración, conducta sexual, modulación de la masa ósea, regulación del sistema inmune, neuroprotección, reducción de la excitabilidad neuronal, memoria y aprendizaje, ciclo sueño-vigilia y en el crecimiento de diversos tumores (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003).

4.2.1. Antagonistas de P₄

Los antagonistas de P₄ pertenecen a la gran familia de ligandos del receptor a esta hormona esteroide. Desde que fue publicado el primer reporte acerca de la mifepristona (RU486), un antagonista de progestinas y glucocorticoides (Figura 4), numerosos ligandos relacionados a éste han sido sintetizados, los cuales exhiben un amplio espectro en su rango de actividad, desde antagonistas de P₄ puros hasta ligandos con actividad de agonista-antagonista (Spitz, 2003).

Inicialmente los antagonistas de P₄ fueron divididos en antagonistas Tipo 1 y Tipo 2. Los antagonistas Tipo 1 fueron considerados como “puros” ya que antagonizan por completo la acción de su receptor. Un ejemplo es la onapristona (ZK98299) (Figura 4). En contraste, los antagonistas Tipo 2, como el RU486, pueden incluso activar al receptor al que se unen de manera dependiente del tipo

celular, el contexto del promotor y otras vías de señalización. Los compuestos con actividad de agonista-antagonista son actualmente conocidos como moduladores selectivos del receptor a progesterona (SPRMs) o como agonistas-antagonistas parciales (Spitz, 2003).

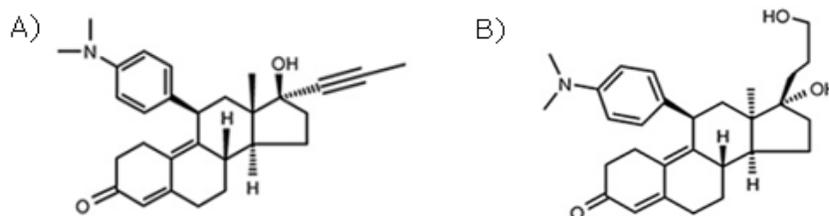


Figura 4. Estructura química de dos antagonistas de P_4 . A) RU486 (Mifepristona). La estructura muestra sustituciones en las posiciones 11 y 17 que son características de antiprogestinas esteroidales. B) ZK98299 (Onapristona) (Leonhardt *et al.*, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2009).

Se sabe que el RU486 compite con la P_4 por el sitio de unión de ésta a su receptor intracelular (RP) y que se une al RP con una constante de afinidad media aproximada de $1.4 \text{ nM} \pm 0.6$ (ligeramente mayor que la de la P_4) (Raaijmakers *et al.*, 2009). Aunque la activación del RP no se ve afectada al unirse el RU486, estudios con coactivadores de la familia p160 y de la estructura del sitio de unión al ligando, han demostrado que el RU486 no se une a las mismas regiones que un agonista y que induce una conformación diferente de su extremo C-terminal (Leonhardt *et al.*, 2002). Esta conformación alterna no permite la interacción con coactivadores y promueve el reclutamiento de correpresores.

Los antagonistas de P_4 tienen diversos efectos sobre el sistema reproductivo. Además pueden ser utilizados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, por ejemplo RU486 es utilizado en el tratamiento contra meningiomas (Spitz, 2003).

4.3. Receptor a progesterona (RP)

4.3.1. Características y función del RP

La mayoría de los efectos biológicos de la P_4 están mediados a través del RP, el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner *et al.*, 1990). En una gran variedad de especies, incluyendo aves, roedores, monos y humanos, el RP está expresado en dos isoformas: una larga denominada RP-B y una corta denominada RP-A. (Guerra-Araiza *et al.*, 2000), con excepción del conejo en el cual sólo se ha detectado la isoforma RP-B (Loosfelt *et al.*, 1986). Ambas isoformas del RP son producto de un único gen, pero generadas a partir de diferentes sitios de inicio de la transcripción y reguladas por diferentes promotores. En el humano, este gen se encuentra localizado en el cromosoma 11q22-23 (Tetel *et al.*, 2009), tiene un tamaño aproximado de 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Misrahi *et al.*, 1993) que generan un mRNA de aproximadamente 3000 nucleótidos (Theveny *et al.*, 1987) el cual da origen a un polipéptido de 933 aminoácidos (Misrahi *et al.*, 1993) (Figura 5).

El RP tiene una estructura dividida en dominios funcionales que consiste en una región amino terminal (N-terminal), un dominio de unión al DNA (DBD), una región de bisagra y una región carboxilo terminal (C-terminal) en donde se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD). Al igual que la mayoría de los receptores a esteroides, tiene al menos dos funciones de activación de la transcripción (AF) (Figura 5 y 6).

El dominio N-terminal es el menos conservado entre los receptores nucleares, se codifica a partir del exón 1 y modula las interacciones intramoleculares e interacciones proteína-proteína. El DBD es la región más conservada, se codifica por los exones 2 y 3, consiste de dos motivos denominados “dedos de zinc”, elementos críticos para la activación de genes blanco, participa en su dimerización con otro RP y media la unión del receptor (unido a su ligando) a elementos de respuesta a progesterona (ERP). Los ERP, de

manera general, consisten en secuencias consenso (palindrómicas o directamente repetidas) de seis nucleótidos que están separadas por un espaciador de tres nucleótidos. Adyacente al DBD se encuentra la región de bisagra, la cual se codifica a partir del exón 4, es importante para la apropiada dimerización del RP, participa en la estabilización del receptor mediante su unión con proteínas de choque térmico (Hsp) y contiene una secuencia de localización nuclear (NLS). El LBD consiste de 10-12 α -hélices que forman un sitio hidrofóbico de unión al ligando y se codifica del exón 5 al exón 8 (Misrahi *et al.*, 1993; Tetel *et al.*, 2009).

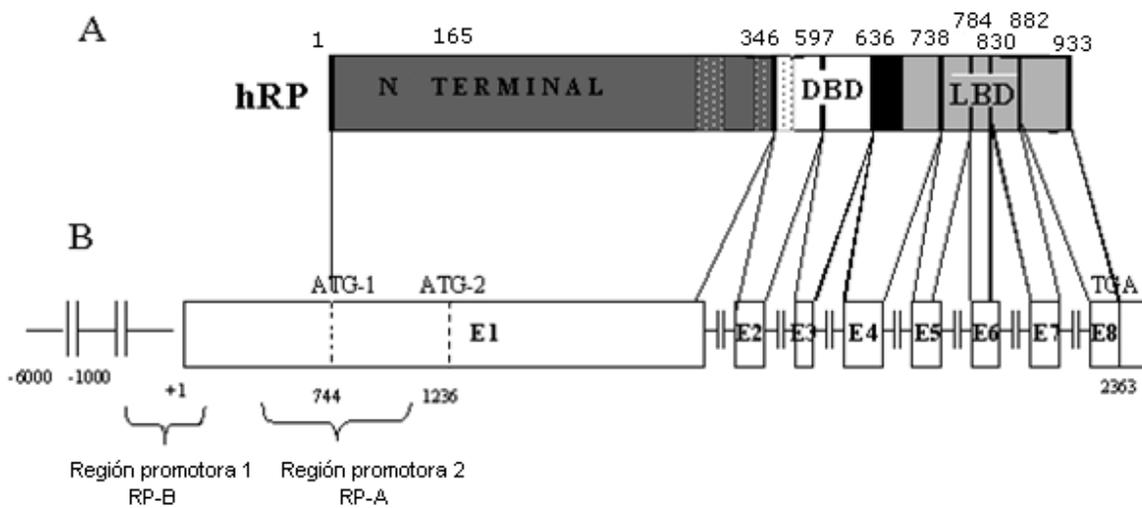


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la proteína y del gen del RP humano (hRP). A) Organización de los dominios del RP. La secuencia total de aminoácidos (933) se muestra dividida en cuatro dominios: en color gris oscuro el dominio amino terminal (N terminal), en blanco el dominio de unión al DNA (DBD), en negro la región de bisagra y señalado en gris claro el dominio de unión al ligando (LBD). B) Esquema del gen. Se muestra la localización de las dos regiones promotoras: la región promotora 1 se encuentra ubicada de la posición -711 a +31 y la región 2 en la posición +464 a +1105. Los exones están señalados con la letra “E” seguida del número correspondiente a cada exón. Los límites de los exones están proyectados con líneas rectas hacia el esquema de la estructura de la proteína en donde se representa su correspondencia con la posición y número de aminoácidos, los cuales están señalados con números en la parte superior. Los intrones están señalados como líneas interrumpidas (-|-) entre cada exón. Se señalan las 2 posiciones de inicio de la traducción (ATG) (ATG-1 a +744 y ATG-2 a +1236) y la posición de término (TGA) (Misrahi *et al.*, 1993).

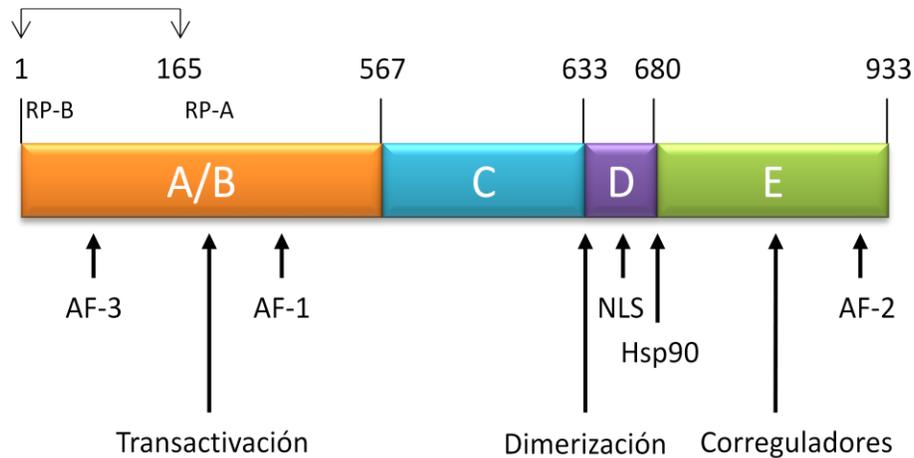


Figura 6. Esquema representativo de los dominios funcionales del RP (A-E). Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delinean el inicio y término de cada dominio, mientras que las flechas (↓) indican el sitio de inicio de la traducción de las dos isoformas. A/B: extremo N-terminal de la isoforma A/B, C: dominio de unión al DNA (DBD), D: región de bisagra, E: dominio de unión al ligando (LBD), AF: función de activación, NLS: señal de localización nuclear; Hsp: proteínas de choque térmico, (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006).

4.3.2. Isoformas del RP

Como se mencionó anteriormente, se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se han denominado RP-A (80-94 kDa; en el humano, hRP: 94 kDa) y RP-B (108-120 kDa; en el humano, hRP: 114 kDa). RP-A carece de 164 aminoácidos en la región amino terminal, mientras que en RP-B sí están presentes (Figura 7). El RP-A posee solamente dos regiones con funciones de activación, mientras que el RP-B contiene además una tercera región (AF-3) presente en el extremo amino terminal (Figura 6). Además existe la presencia de una región con función inhibitoria localizada en la región adyacente a AF-1 que sólo es funcional en RP-A (Guerra-Araiza *et al.*, 2000). Estudios cinéticos indican que la constante de unión de la P_4 por RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente (Raaijmakers *et al.*, 2009).

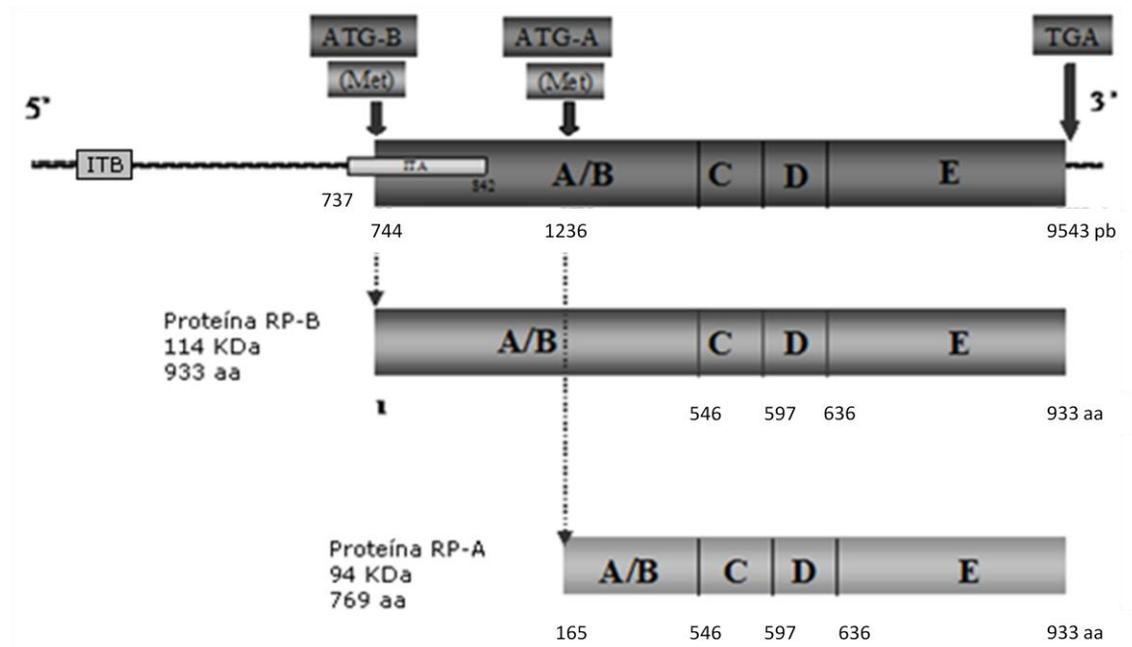


Figura 7. Esquema de la organización de las isoformas del hRP. Los números indican la posición de las bases en el gen y de los aminoácidos (aa) en las proteínas del receptor. A-E: dominios funcionales del RP, ITB: sitio de inicio de la transcripción de RP-B, ITA: sitio de inicio de la transcripción de RP-A, ATG-B: codón de inicio de la traducción de RP-B; ATG-A: codón de inicio de la traducción de RP-A, TGA: codón de término de la traducción.

En el ser humano, ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de la regulación de dos secuencias promotoras distintas que dan lugar a diferentes mRNA. Una secuencia es distal (de -711 a +31) (Figura 5) y corresponde a la secuencia promotora de RP-B, mientras que la otra es proximal (de +464 a +1105) (Figura 5) y corresponde a la secuencia promotora de RP-A, (Kastner *et al.*, 1990; Kraus *et al.*, 1993).

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

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung *et al.*, 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad

transcripcional, incluyendo a RP-B y otros receptores a hormonas esteroides (Clemm *et al.*, 1995; Sartorius *et al.*, 1994; Tung *et al.*, 1993; Vegeto *et al.*, 1993). Esta capacidad represora permite al RP-A mediar las acciones de la P₄ al mismo tiempo que regula los efectos de otras hormonas, participando de forma importante en la integración de señales (*cross-talk*) mediados por otros receptores a hormonas (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006).

4.4. Mecanismos de acción de la P₄

Los mecanismos celulares mediante los cuales la P₄ puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómicos y no genómicos (Bramley, 2003). El primer mecanismo involucra la interacción de la P₄ con su receptor nuclear, el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la P₄ con canales iónicos y receptores membranales como receptores a neurotransmisores, receptores de tipo tirosina cinasa y receptores de siete dominios transmembranales (Figura 8) (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007).

Por medio del mecanismo genómico se generan cambios en la transcripción de genes específicos después de la interacción de la P₄ con el RP. En general, en el mecanismo de acción del RP, la P₄ atraviesa las membranas celulares por difusión simple debido a su carácter lipofílico y en el núcleo o en el citoplasma se une a su receptor, la unión provoca un cambio estructural en el receptor que le permite la disociación de las proteínas de choque térmico (Hsp70, 90 y 56), lo que expone la región que le permite fosforilarse y dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el DNA (ERP). Una vez unido al ERP, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes blanco de P₄ como el VEGF y EGFR (Figura 9) (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006). El receptor activado unido al ligando puede reclutar correguladores, como los coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC) que de manera dependiente de ligando facilitan el proceso de transcripción (McKenna *et al.*, 1999).

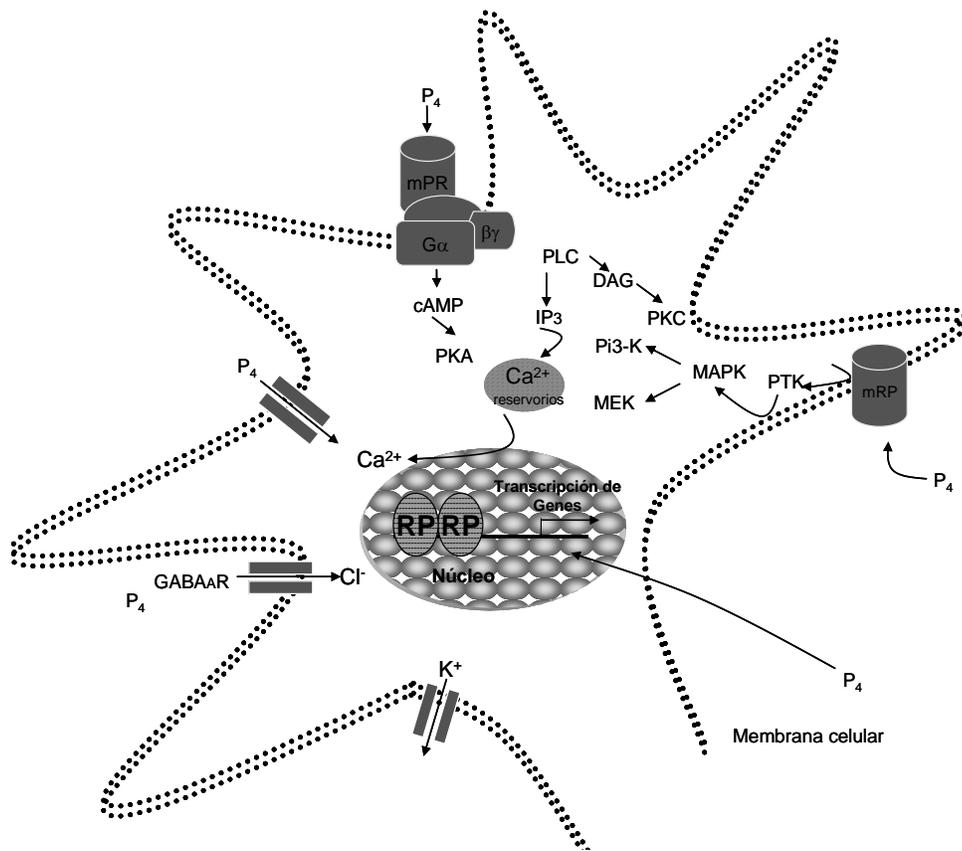


Figura 8. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P₄. Los efectos de la P₄ ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1) a nivel membranar incluye receptores membranarales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP (o mPR): Receptor membranaral a P₄, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Cinasa A, GABA_AR: Receptor a GABA tipo A, Ca²⁺: Calcio, Cl⁻: Cloro, K⁺: Potasio, PTK: Proteína Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, IP₃: Inositol Trifosfato 2) en el núcleo, donde el complejo hormona-receptor (P₄-RP) se une con ERP, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así modulan directamente la expresión génica (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003).

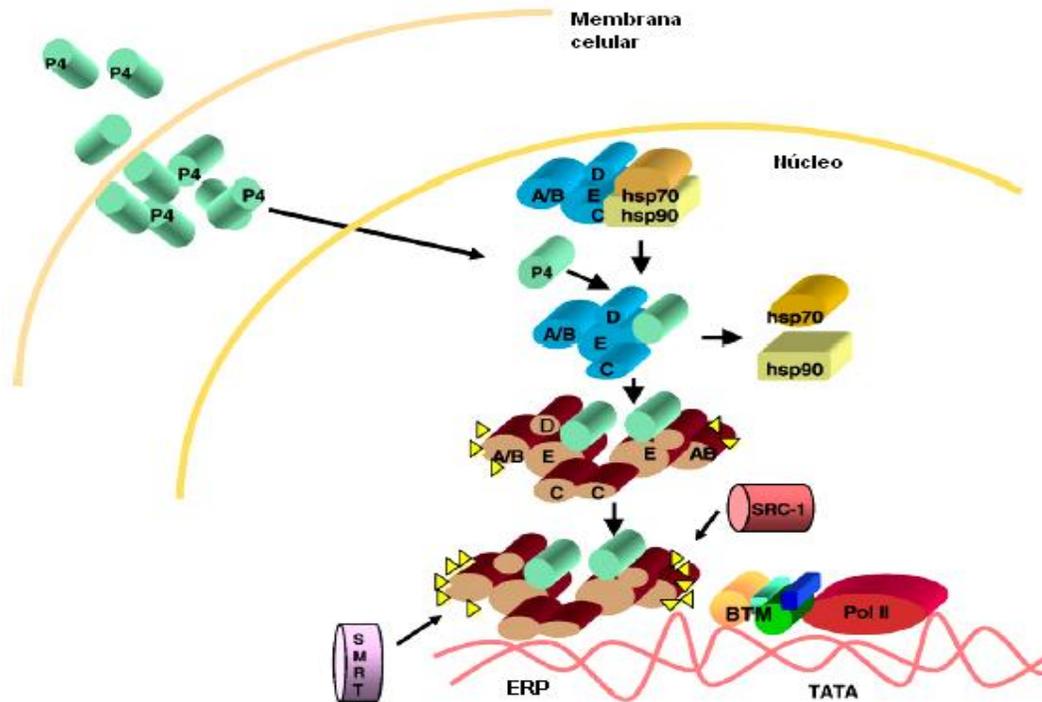


Figura 9. Mecanismo de acción genómico de la P₄. El RP (dominios A/B, C, D, E) se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (hsp). La P₄ atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear, interactúa con su receptor, se liberan las hsp, el receptor se dimeriza, se une a elementos de respuesta a progesterona (ERP) y recluta a correguladores y a la maquinaria de transcripción basal (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006).

Mediante el mecanismo no genómico se modifica la conductancia iónica, la formación de segundos mensajeros y la activación de cascadas de fosforilación. De esta manera la P₄ puede regular diferentes funciones en el cerebro (Bramley, 2003).

4.5. P₄ y tumores cerebrales

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

Se ha sugerido que la P_4 puede regular el crecimiento celular en tumores cerebrales (meningiomas, cordomas y astrocitomas) y que este efecto está mediado por su receptor nuclear (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 1993; Carroll *et al.*, 1995). Otros estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con P_4 aumenta la proliferación de las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (grados III y IV respectivamente) y con el tratamiento de RU486 disminuye la proliferación de estas líneas celulares (Gonzalez-Agüero *et al.*, 2007). Se ha reportado una correlación directa entre las características histológicas del grado del tumor astrocítico y el nivel de expresión de las isoformas del RP, aumentando su expresión en astrocitomas de grado IV (Gonzalez-Agüero *et al.*, 2001; Khalid *et al.*, 1997). Los datos anteriores, en conjunto, sugieren que la P_4 puede participar en el desarrollo de astrocitomas a través del RP lo que posiblemente involucra un mecanismo de acción genómico de la hormona.

4.6. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

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

El VEGF, también conocido como VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (VPF), el miembro más importante de la familia VEGF, es un mitógeno glicosilado que actúa específicamente sobre células endoteliales. Como su nombre lo indica, este factor estimula el crecimiento, sobrevivencia y proliferación de células endoteliales vasculares. Se ha demostrado que puede facilitar la sobrevivencia de vasos existentes, estimular el crecimiento de nuevos vasos, mediar el aumento en la permeabilidad vascular, estimular la vasodilatación (Ferrara, 2004) y promover la migración celular e inhibir la apoptosis (Pruitt *et al.*, 2007). Fue aislado originalmente de células tumorales, entre las que se encuentran células de hepatocarcinoma de cobayo y la línea celular U-937 derivada de linfoma humano. También se ha encontrado que es producido por la

línea celular GS-9L de glioma de rata y la línea NB41 de neuroblastoma de ratón. Si bien, VEGF se ha encontrado sobreexpresado en células tumorales (por ejemplo, provenientes de mama, próstata, pulmón y colon), es también producido por otros tipos celulares como células vasculares de músculo liso (Tischer *et al.*, 1991) y células de la hipófisis del ratón (Plouët *et al.*, 1989).

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

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

*aa: aminoácidos.

*Expresión restringida a gónadas, corteza adrenal y placenta.

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

El gen de VEGF humano se encuentra localizado en el cromosoma 6p12, tiene 8 exones (Figura 10 A), 7 intrones y un único sitio principal para el inicio de la transcripción (-1038). En su región promotora no tiene caja TATA (Tischer *et al.*, 1991) y contiene tres ERP (de -1865 a -1860; de -716 a -711; y de +679 a +684), más de 6 sitios de proteína activadora 1 (AP-1), AP-2 y más de 10 sitios para el factor de transcripción Sp1 (proteína específica 1) (Mueller *et al.*, 2003). El tamaño del gen es de 16 kb, el dominio codificante del gen (intrones y exones) abarca aproximadamente 14 kb y produce una proteína que puede encontrarse como monómero (23 kDa, aunque puede tener de 18 a 24 kDa) (Tischer *et al.*, 1991) o como homodímero (aprox. 46 kDa) unido mediante un puente disulfuro (Pruitt *et al.*, 2007) (Figura 11). La proteína está estructuralmente relacionada con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) con la cual comparte la completa conservación de 8 cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro inter e intracatenarios en PDGF, aunque VEGF presenta 8 cisteínas adicionales dentro de los 50 aminoácidos de su región C-terminal (Tischer *et al.*, 1991).

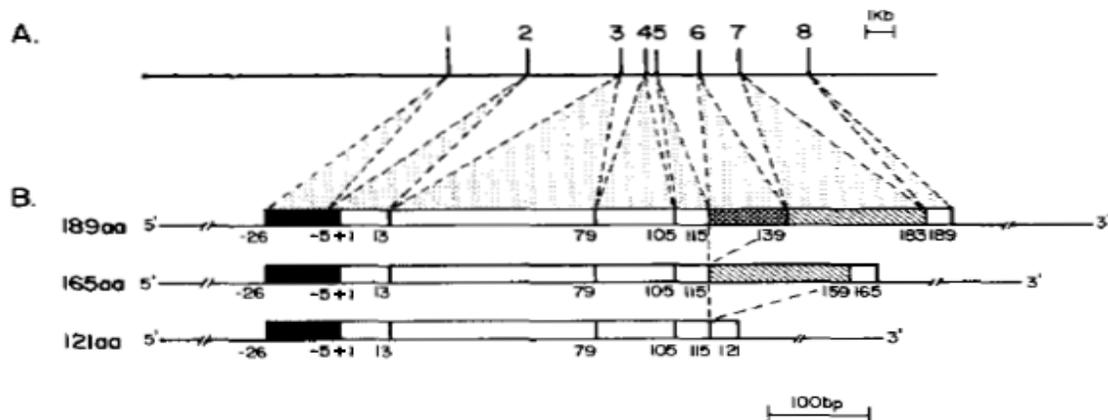


Figura 10. Estructura del gen de VEGF humano. A) Posición de los ocho exones. B) Representación de las isoformas de 189, 165, y 121 aminoácidos (aa) originadas por splicing alternativo. De cada exón del esquema A se proyectan líneas punteadas hacia los esquemas en B para indicar el fragmento y el número de aa codificados por cada exón. El número de aa correspondiente al inicio y final de cada fragmento se muestra debajo del esquema de cada isoforma. Las tres isoformas presentan un péptido señal indicado por una sección gruesa de color negro. El exón 6 únicamente está presente en la isoforma de 189 aa, el cual está indicado por una sección gruesa de entramado cruzado, mientras que el exón 7 está presente en la isoforma de 189 y 165 aa, indicado por la sección gruesa de líneas diagonales (Tischer *et al.*, 1991).

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

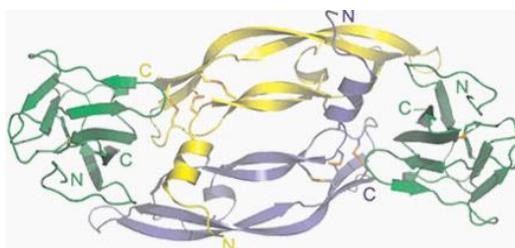


Figura 11. Estructura de la proteína de VEGF. Esta representación de cintas muestra dos monómeros de VEGF (cinta amarilla y cinta azul) formando un homodímero y unidos a uno de sus receptores (cinta verde) (Ferrara, 2004).

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

Se sabe que VEGF participa como un mediador central de angiogénesis en GBM. Se ha demostrado que la supresión de la función de VEGF inhibe el

crecimiento celular en este tipo de tumores y se observa una regresión en la formación de vasos sanguíneos (Maity *et al.*, 2000). También se han encontrado concentraciones significativamente altas de VEGF en tejido proveniente de GBM en comparación con los niveles en otros tumores o en tejido cerebral sano (Takano *et al.*, 1996).

El grado de angiogénesis en un proceso tumoral puede ser un factor pronóstico significativo de la progresión, recurrencia y diseminación de un tumor, ya que estudios *in vivo* e *in vitro* han confirmado una correlación directa entre el grado de tumor y la expresión de VEGF en gliomas, incluyendo GBM (Maity *et al.*, 2000). Se han observado altos niveles de VEGF en fluido cerebroespinal de pacientes con astrocitomas de alto grado de evolución tumoral, mientras que esto no se ha visto en el fluido de pacientes con astrocitomas de bajo grado de evolución (Peles *et al.*, 2004).

4.7. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

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

El gen de EGFR humano, también llamado ERBB1, (Figura 12) (The-UniProt-Consortium, 2010) está localizado en el cromosoma 7p12, tiene 30 intrones, 28 exones y abarca alrededor de 200 kb de las cuales 123 kb están contenidas en el intrón 1. El exón 1 es altamente rico en GC. El gen contiene varios elementos repetidos, incluyendo elementos nucleares interdispersos cortos (SINEs), elementos nucleares interdispersos largos (LINEs), así como una región rica en TGG/A dentro del intrón 15 y dos repetidos largos de CA en el intrón 27 (Reiter *et al.*, 2001). Su región promotora tiene varias características especiales. Es de

aproximadamente 1.1 kb, carece de caja TATA y de caja CAAT, contiene sitios múltiples de inicio de la transcripción (aunque *in vivo* el principal se encuentra localizado en -255) y es rico en G+C (88%). Se sabe que contiene cinco cajas GC y tiene cinco sitios de unión a Sp1 (Johnson *et al.*, 1988), esta unión es esencial para su activación. Análisis funcionales revelaron elementos para transcripción dentro del exón 1 y previo al sitio de inicio de la transcripción hacia la región 5' (Haley *et al.*, 1987), además de regiones de regulación negativa (Reiter *et al.*, 2001).

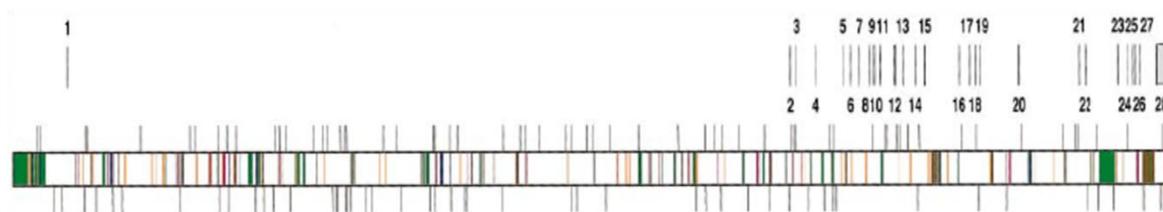


Figura 12. Mapa del gen de EGFR humano. Las líneas grises en la parte superior de la imagen indican la posición y número de exón (1-28). La porción gris claro del exón 28 indica la región 3' no traducida. También se muestra con líneas de colores la posición de elementos repetidos a lo largo del gen: SINEs (naranja), LINEs (verde), elementos LTR (azul), transposones de DNA (morado) y elementos microsatélite (café) (Reiter *et al.*, 2001).

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

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

La molécula, como secuencia completa o precursora tiene 1210 aminoácidos (Kondo *et al.*, 1983) y está dividida en 3 dominios. 1) El dominio N-terminal (codificado por los exones 2-16), que está glicosilado y es rico en cisteínas, se proyecta hacia afuera de la célula y contiene el sitio para la unión a EGF y demás ligandos. Este dominio puede ser dividido en cuatro subdominios (I-IV), incluyendo dos regiones ricas en cisteínas (II y IV; codificados por los exones 5-7 y 13-16)

que contienen sitios para glicosilación y puentes disulfuro, los cuales determinan la conformación terciaria del dominio (en específico el dominio II permite la dimerización de EGFR); y dos regiones pobres en cisteínas (I y III), implicadas en la unión del ligando. 2) Un segundo dominio es hidrofóbico y está embebido en la membrana plasmática (codificado por exón 17). 3) El dominio C-terminal intracelular, que tiene un sitio ininterrumpido de tirosina cinasa (codificado por los exones 18-24) y múltiples sitios de autofosforilación/transfosforilación agrupados hacia el extremo 3' (exones 25-28). La región que abarca del aminoácido 977 al 1022 está involucrada en la internalización del receptor a la célula (Bazley *et al.*, 2005; Frederick *et al.*, 2000; Kuan *et al.*, 2001; Reiter *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2001) (Figura 13).

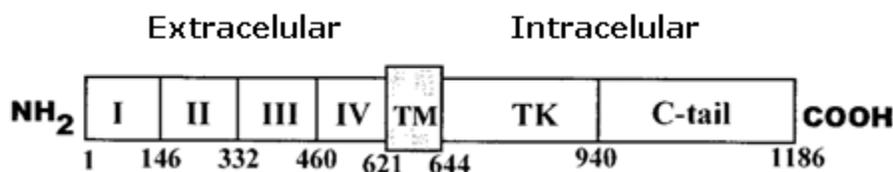


Figura 13. Esquema de la estructura de la proteína de EGFR. El número de aminoácidos que corresponden a cada dominio y subdominio se muestra debajo de la estructura. NH₂: extremo amino terminal, COOH: extremo carboxilo terminal, I-IV: subdominios del dominio N-terminal, TM: dominio transmembranal, TK: dominio de tirosina cinasa (Kuan *et al.*, 2001).

El dominio embebido en la membrana plasmática al igual que el dominio C-terminal es homólogo al producto del oncogen viral erb B, por lo tanto, EGFR es considerado como producto del gen c-erb B (Johnson *et al.*, 1988).

Como resultado de splicing alternativo, EGFR tiene 4 isoformas. En todos los casos, los primeros 24 aminoácidos codifican para el péptido señal. La isoforma 1, la más importante y comúnmente referida sólo como EGFR, tiene todos los exones, su mRNA es de 5800 pb, (Reiter *et al.*, 2001; The-UniProt-Consortium, 2010) y una vez que se escinde el péptido señal tiene 1186 aminoácidos y pesa alrededor de 170 kDa (Kuan *et al.*, 2001). Su región extracelular cuenta con 621 aminoácidos (25-645), la región transmembranal es de 23 aminoácidos (646-668), mientras que la región intracelular tiene 542 aminoácidos (669-1210) (Figura 13). La isoforma 2 presenta 10 exones, mRNA de aproximadamente 1800 pb, 405

aminoácidos incluyendo el péptido señal, pesa aproximadamente 45 kDa, puede actuar como antagonista de la acción de EGF y puede ser secretada al espacio extracelular. La isoforma 3 tiene 20 exones, mRNA de cerca de 3000 pb, pesa cerca de 77 kDa y tiene 705 aminoácidos. La isoforma 4 contiene 20 exones, mRNA de aproximadamente 2400 pb, pesa alrededor de 69 kDa y presenta 628 aminoácidos (Krieg *et al.*, 1992; Reiter *et al.*, 2001; The-UniProt-Consortium, 2010).

La unión del ligando al receptor induce homodimerización o heterodimerización (con otros miembros de la familia de receptores con actividad de cinasa, como Erb-2 en cáncer de ovario) del receptor (Kuan *et al.*, 2001), autofosforilación de residuos de tirosinas e internalización del complejo EGFR-ligando. Una vez que el receptor ha sido activado e internalizado, sirve como sitio de unión para reclutar moléculas transductoras de señales y fosforilar sustratos citoplásmicos, tales como Ras y MAPKs, con lo que se pueden activar vías que producen diversas respuestas celulares, incluyendo cambios en la expresión de genes, rearrreglos del citoesqueleto, efectos antiapoptóticos, estimulación de síntesis de DNA y un incremento en la proliferación y diferenciación celulares (Pruitt *et al.*, 2007) (Figura 14).

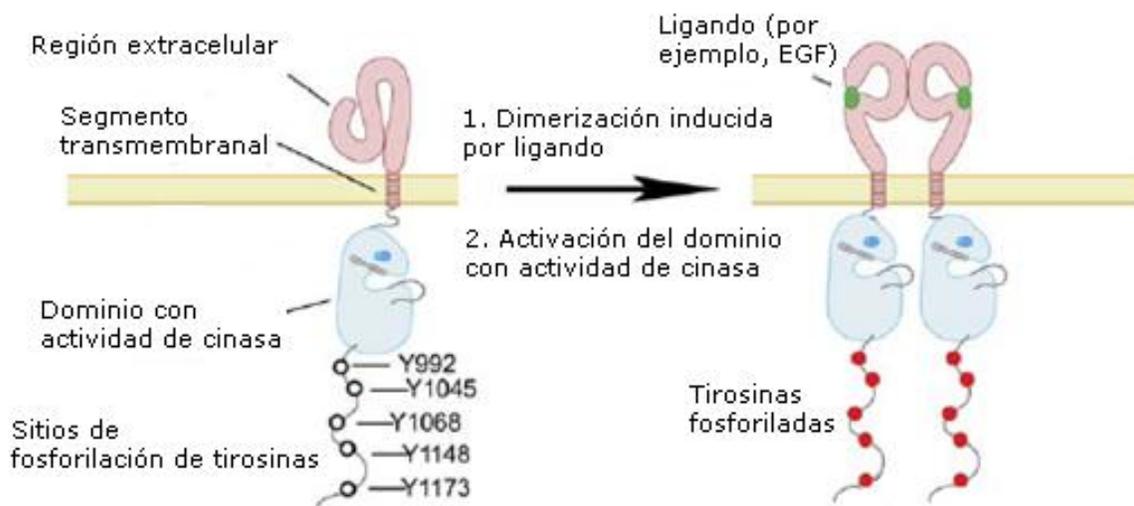


Figura 14. Representación general de la dimerización inducida por ligando y del proceso de activación de EGFR (Zhang *et al.*, 2006).

El nivel de expresión del gen de EGFR varía entre tipos celulares normales y transformados. Está amplificado en carcinoma de próstata, en células humanas A431 de carcinoma de epidermis, en varias líneas derivadas de carcinoma de células escamosas humanas (Johnson *et al.*, 1988) y en GBM (Furnari *et al.*, 2007). Además se sabe que la activación desregulada de EGFR actúa de forma oncogénica, estimulando el crecimiento y diseminación de las células cancerosas (Viana-Pereira *et al.*, 2008).

En un estudio de varias series de líneas celulares derivadas de GBM se encontró de forma consistente un alto incremento en el mRNA de EGFR, hecho que no fue visto en astrocitomas de grado III ni de bajo grado de evolución tumoral (Godard *et al.*, 2003; Henn *et al.*, 1986; Sallinen *et al.*, 1999).

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

De las mutaciones en EGFR se conocen cinco principales formas deletadas: EGFRvI, EGFRvII, EGFRvIII, EGFRvIV y EGFRvV, de las cuales, EGFRvIII (145 kDa y delección de los exones 2-7) es la más comúnmente encontrada en GBM (60-70%), seguida de EGFRvII (delección de los exones 14 y 15) y EGFRvV (forma truncada en el aminoácido 958). Existe evidencia de que estas mutaciones contribuyen a la incrementada invasividad de las células tumorales (Nicholas *et al.*, 2006).

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

4.8. Efecto de la P₄ sobre la expresión de VEGF y EGFR

Se conoce que la P₄ regula la expresión de diferentes genes, por ejemplo, se ha reportado que la expresión de VEGF y EGFR es regulada por la P₄, principalmente en líneas celulares y muestras biológicas de cáncer de mama y útero (Kazi *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006).

Se ha determinado que la expresión de VEGF aumenta con P₄ en las líneas celulares de cáncer de mama BT-474 y HCC-1428 (Liang *et al.*, 2005) y en la línea celular de adenocarcinoma endometrial Ishikawa (Mueller *et al.*, 2003). En la línea celular de cáncer de mama T47D, VEGF es inducido de 3 a 4 veces por P₄ de manera dosis dependiente y suprimida por su antagonista RU486.

Las progestinas también inducen la expresión de VEGF en útero de ratón y, al igual que en cáncer de mama, se ha visto que el efecto observado es bloqueado por RU486 (Hyder *et al.*, 2000).

También se ha visto un incremento en la expresión de VEGF causado por progestinas sintéticas (por ejemplo, acetato de medroxiprogesterona, norgestrel y R5020), a nivel de mRNA y de la proteína en la línea celular T47D (Hyder *et al.*, 1998) y del contenido de proteína en cultivos de células epiteliales de endometrio (Classen-Linke *et al.*, 2000).

Además, se ha reportado que en presencia de P₄ aumenta la expresión de VEGF a nivel de la proteína y de una de las isoformas de su mRNA en endometrio de primate (Greb *et al.*, 1997).

Por otro lado, se sabe que las progestinas regulan a la alza muchos de los factores de crecimiento que inician vías de señalización implicadas en cáncer de mama, incluidos los miembros de la familia EGFR y sus ligandos; las células de cáncer de mama tratadas con progestinas son mucho más sensibles a la proliferación inducida por EGF. Así, la P₄ puede actuar principalmente al sensibilizar las células de cáncer de mama a este factor de crecimiento y señales de citocinas (Lange *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que el tratamiento con progestinas sintéticas aumenta la expresión de EGFR a nivel de mRNA, en la línea celular Ishikawa (Zhao *et al.*,

2007) y de manera tiempo y dosis dependiente en la línea celular T47D (Murphy *et al.*, 1988). Asimismo, se ha encontrado que las progestinas potencian los efectos de EGF mediante la regulación a la alta de EGFR en la superficie celular de células de cáncer de mama (Lange *et al.*, 1998).

El contenido de EGFR también se ha visto aumentado de forma dosis dependiente a causa de tratamiento con P₄ en células de adenocarcinoma endometrial (Reynolds *et al.*, 1990).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que VEGF y EGFR, implicados en el crecimiento tumoral, presentan un incremento en su expresión en astrocitomas de grado IV (GBM) comparado con lo reportado para astrocitomas de menor grado de malignidad. Por otro lado, se ha determinado que la P_4 puede regular la expresión de estos genes en cáncer de mama; sin embargo, se desconoce si esta hormona modifica la expresión de VEGF y EGFR en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos, por lo que en este trabajo se determinó la regulación por P_4 de la expresión del mRNA y el contenido de la proteína de VEGF y de EGFR, así como la participación del RP en estos procesos, en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos de grado III (U373) y grado IV (D54) de evolución tumoral.

6. HIPÓTESIS

➤ Si la P_4 participa en la regulación de la expresión de VEGF y EGFR en las líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 y D54 a través de la interacción con su receptor, entonces el tratamiento con esta hormona modificará su expresión y el RU486, antagonista del RP, bloqueará los efectos de la P_4 .

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la P_4 y la participación del RP en la regulación de la expresión de VEGF y EGFR en las líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 (grado III) y D54 (grado IV).

7.2. Objetivos particulares

1) Conocer el efecto de la P_4 sobre la expresión de VEGF y de EGFR a nivel de mRNA en las líneas celulares U373 y D54 derivadas de astrocitomas humanos grado II y grado IV, respectivamente.

2) Analizar el efecto de la P_4 sobre el contenido de la proteína de VEGF y de EGFR en las líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 y D54.

3) Determinar si los efectos de la P_4 y el RU486 sobre la expresión de VEGF y EGFR a nivel del mRNA se reflejan a nivel de la proteína.

4) Establecer la participación del RP en la regulación de la expresión de VEGF y EGFR en las líneas celulares U373 y D54 mediante el tratamiento con RU486.

8. METODOLOGÍA

8.1. Cultivo celular

Las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 (grado III) y D54 (grado IV) se cultivaron en medio DMEM con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubadas a 37°C, 95% aire - 5% CO₂ y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta alcanzar confluencia celular en un 70-80%. Una vez obtenida la confluencia se contó el número de células en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocaron 2,000,000 de células en cajas de Petri de 10 cm con medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10% durante 48 h. Posteriormente se les realizaron tres lavados con PBS pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM), se cambió el medio por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas y se incubaron durante 24 h en las condiciones ya mencionadas.

Posteriormente, para estudiar los efectos de la P₄ y la participación del RP en la expresión de VEGF y EGFR, las células recibieron los siguientes tratamientos durante 6, 12, 24 y 48 h para los estudios de la expresión del mRNA y durante 12 y 24 h para los estudios del contenido de proteína: vehículo (V), ciclodextrina al 0.02% en agua estéril; P₄ (10 nM) acoplada a ciclodextrina; RU486 (10 µM), antagonista de P₄; y tratamiento conjunto de P₄ (10 nM) + RU486 (10 µM) (Gonzalez-Agüero *et al.*, 2007).

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

8.2. Extracción de RNA total

Para determinar el perfil de expresión de VEGF y EGFR a nivel de mRNA, primero se extrajo el RNA total, para lo cual a las células U373 y D54 se les agregó 1 mL de trizol (fenol e isotiocianato de guanidina; Invitrogen) a 4°C, se mantuvieron 5 min en hielo, fueron transferidas a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se homogenizaron en vórtex por 5 segundos. A continuación se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitaron en vórtex, se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se obtuvieron dos fases: una inferior de color rojo compuesta por fenol-cloroformo en la cual quedaron las proteínas y una acuosa incolora en la parte superior, fase en la cual quedó el RNA, mientras que el DNA se mantuvo en la interfase.

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

La cantidad de RNA extraído se cuantificó espectrofotométricamente a 260 y 280 nm. Para conocer las condiciones del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes con formaldehído al 37%. Se utilizaron las muestras en las que el RNA no estuviera degradado y se observaran de forma clara las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S, además de que no se encontrara la presencia de DNA.

8.3. RT-PCR

8.3.1. Oligonucleótidos

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

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

➤ VEGF

Sentido 5' - CTTCGCTTACTCTCACCTGCTT - 3'

Antisentido 5' - CAACCACTCACACACACAAC - 3'

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

➤ EGFR

Sentido 5' - AGCTATGAGATGGAGGAAGACG - 3'

Antisentido 5' - GGATCCAGAGGAGGAGTATGTG - 3'

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

➤ 18S

Sentido 5' - AAACGGCTACCACATCCAAG - 3'

Antisentido 5' - CCTCCAATGGATCCTCGTTA - 3'

Tamaño del producto amplificado: 150 pb

8.3.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

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

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

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

8.3.3. PCR

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

Para una reacción de amplificación se utilizaron los siguientes componentes:

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

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

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

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

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

8.4. Extracción de proteínas totales

Con la finalidad de determinar el contenido de la proteína de VEGF y de EGFR se realizó primeramente la extracción de proteínas a partir de las células U373 y D54, para lo cual, se les agregaron 400 μ L de buffer RIPA con una mezcla de inhibidores de proteasas (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40/Tritón 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, AEBSF (amino etil bencenil sulfonil fluoruro) 2 mM, aprotinina 0.3 μ M, bestatina 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M y PMSF 100 μ g/mL) a 4°C y se incubaron durante 1 hora en hielo. Para asegurar el lisado de las células, las muestras se hicieron pasar a través de una aguja de 21G x 32 mm. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C, se separó el sobrenadante y fue almacenado a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior cuantificación y separación de las proteínas mediante electroforesis.

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

8.5. Western blot

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

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

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti-VEGF (anticuerpo policlonal de conejo; Santa Cruz sc-152) o anti-EGFR (anticuerpo policlonal de conejo; Santa Cruz sc-03) en una dilución 1:250 (0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente fueron lavadas con PBS-Tween (Tween al 0.05%) 3 veces por 5 minutos y después incubadas a temperatura ambiente durante 45 min con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2357) en una dilución de 1:5000 (0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol junto con un activador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, los cuales, al reaccionar generan una señal de quimioluminiscencia la cual es detectada al exponer las membranas a placas autoradiográficas (Kodak BioMax light film).

Con la finalidad de corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo de los geles se realizó la determinación de α -tubulina,

para lo cual, las membranas se bloquearon 2 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 10% en PBS, se incubaron con un anticuerpo primario anti- α -tubulina (Sigma T9026, Saint Louis, MO) en una dilución de 1:10,000 durante toda la noche a 4°C, a continuación fueron lavadas con PBS-Tween 3 veces por 5 minutos y se incubaron 1 h con un anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2033) acoplado a peroxidasa en una dilución de 1:10,000 (0.04 μ g/mL). Posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

8.6. Análisis densitométrico y estadístico

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

A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico a través de la prueba de ANOVA de una vía, seguida por una prueba de Tukey para la comparación entre grupos. Se utilizó el programa SPSS 13.0 para calcular los valores de probabilidad.

9. RESULTADOS

En el presente trabajo se estudió el efecto de la P_4 sobre los niveles de mRNA y proteína de VEGF y de EGFR en las líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 (grado III) y D54 (grado IV).

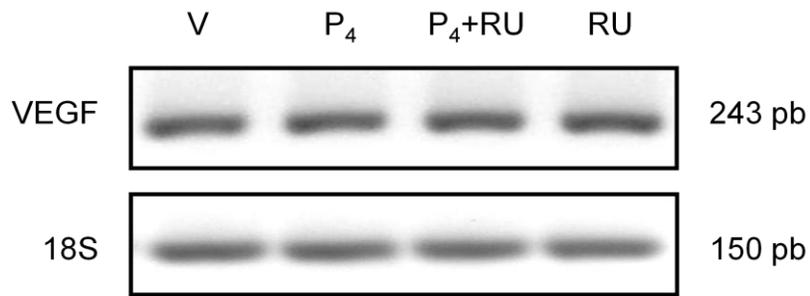
La expresión de VEGF y EGFR y su regulación por P_4 en las líneas celulares U373 y D54 tratadas con V (ciclodextrina al 0.02%), P_4 (10 nM), P_4 (10 nM) + RU486 (10 μ M) y RU486 (10 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h fue determinada a nivel de mRNA mediante la técnica de RT-PCR y durante 12 y 24 h a nivel de proteína por medio de la técnica de Western blot.

En la Figura 15 se muestra que en la línea celular U373 la expresión del mRNA de VEGF no se modifica a las 6, 12, 24 y 48 h después de haber administrado los diferentes tratamientos. Debido a que no se encontraron diferencias significativas a nivel de mRNA en esta línea celular, no se realizó la determinación de la expresión de VEGF a nivel de proteína.

En la Figura 16 se muestra que los niveles del mRNA de VEGF en la línea celular D54 aumentaron significativamente con el tratamiento de P_4 durante 12 h y que este efecto fue bloqueado cuando se administró RU486 en conjunto con P_4 . Además, en la línea celular D54 el contenido de la proteína de VEGF aumentó significativamente con el tratamiento de P_4 a las 24 h, efecto que resultó bloqueado con la administración conjunta de P_4 + RU486 (Figura 17).

En la línea celular U373 se determinó que, al igual que ocurre con VEGF, la P_4 no regula la expresión del mRNA de EGFR en ninguno de los tiempos a los que se administraron los distintos tratamientos (Figura 18). Sin embargo, en la línea celular D54 se encontró que la P_4 incrementó significativamente la expresión del RNAm de EGFR a las 12 h y este efecto fue bloqueado con el tratamiento de RU486 (Figura 19). Se demostró además que después de 24 h de tratamiento con P_4 , la proteína de EGFR aumentó significativamente y disminuyó con el tratamiento de RU486 en conjunto con P_4 (Figura 20).

A.



B.

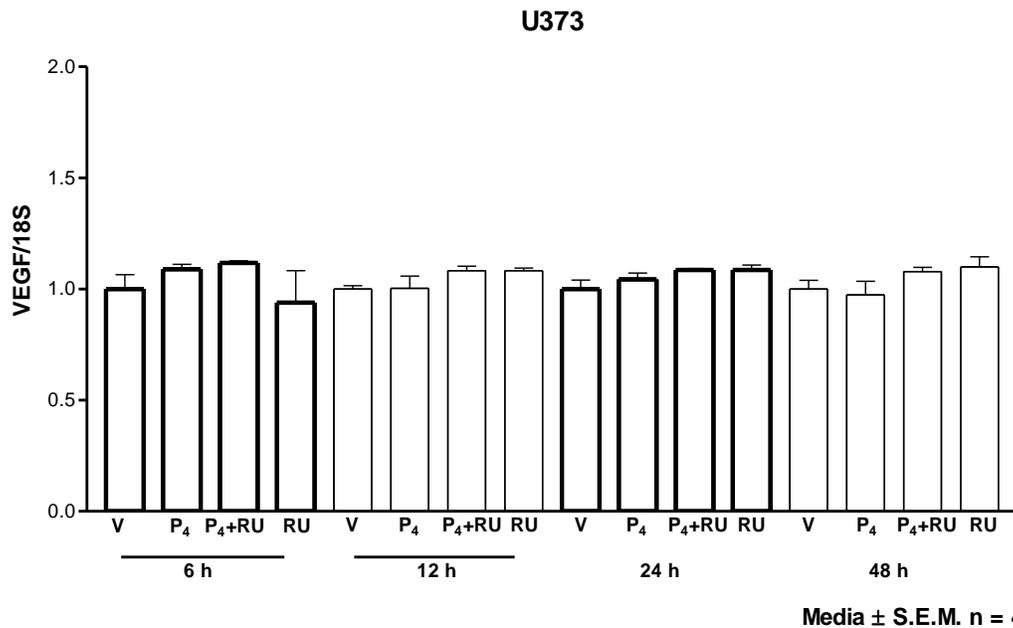
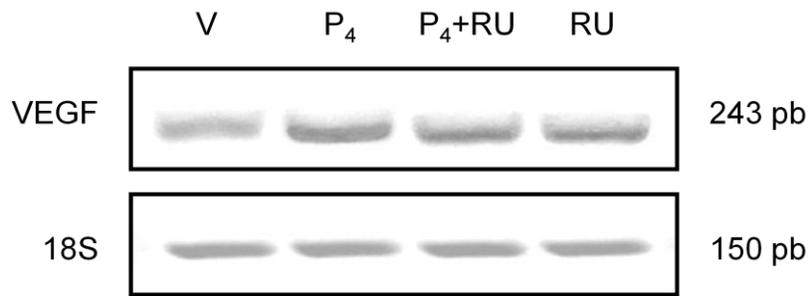


Figura 15. Expresión del mRNA de VEGF en la línea celular U373 a las 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento. A) Amplificación del mRNA de VEGF y rRNA 18S. Se presentan dos bandas, una de 243 pb que corresponde al mRNA del gen de VEGF y una segunda banda de 150 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de VEGF. Imagen representativa de un experimento (12 h) realizado mediante la técnica de RT-PCR. B) Análisis densitométrico del efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión del mRNA de VEGF. Los resultados son expresados como media ± S.E.M.

A.



B.

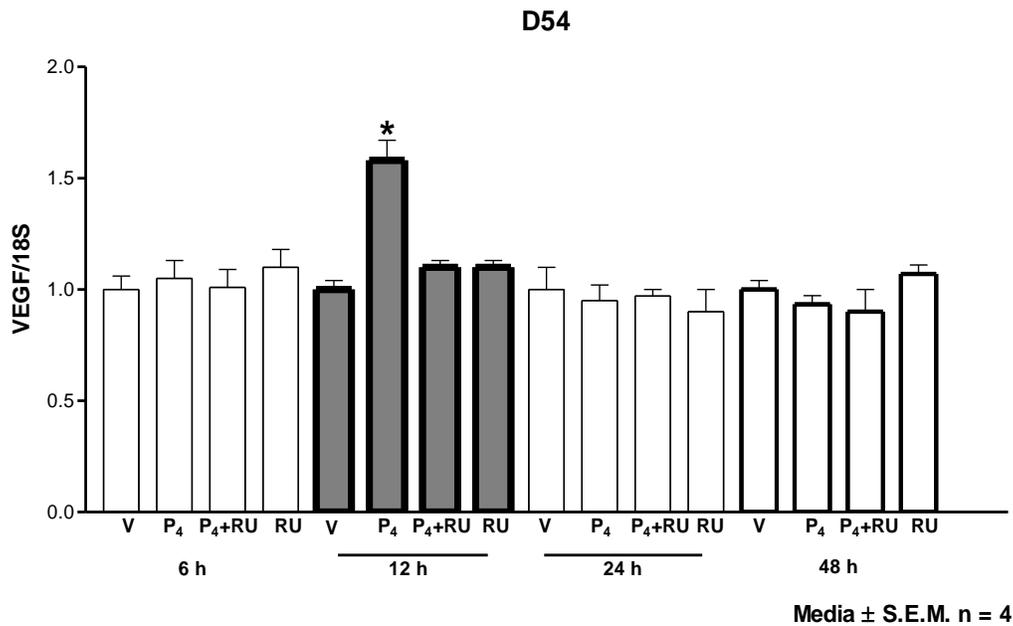
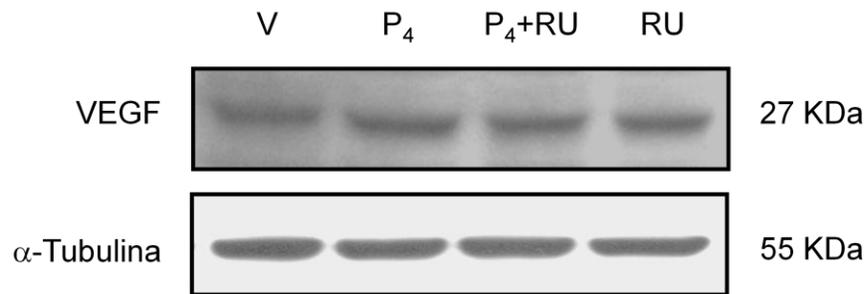


Figura 16. Expresión del mRNA de VEGF en la línea celular D54 a las 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento. A) Amplificación del mRNA de VEGF y rRNA 18S. Se presentan dos bandas, una de 243 pb que corresponde al mRNA del gen de VEGF y una segunda banda de 150 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de VEGF. Imagen representativa de un experimento (12 h) realizado mediante la técnica de RT-PCR. B) Análisis densitométrico del efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión del mRNA de VEGF. Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ comparado con V, P₄+RU y RU.

A.



B.

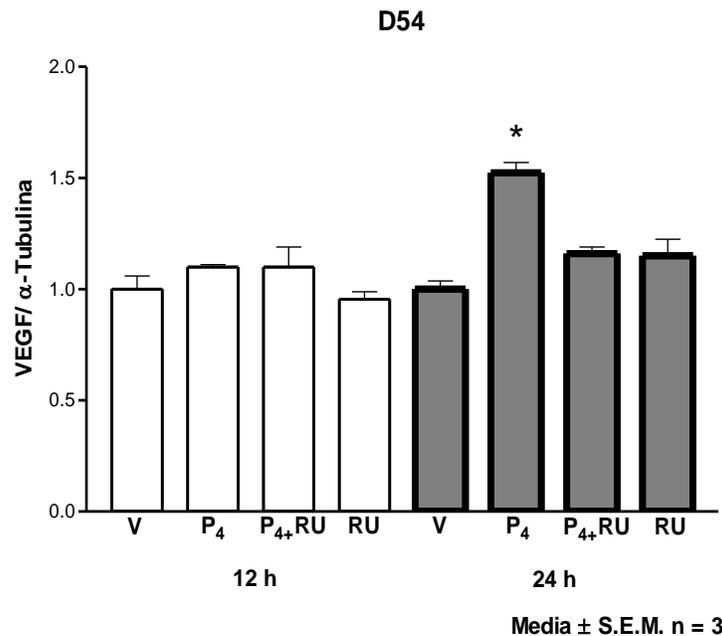
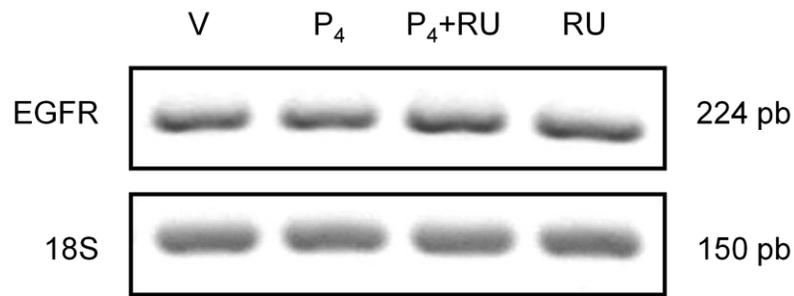


Figura 17. Contenido de la proteína de VEGF en la línea celular D54 a las 12 y 24 h de tratamiento. A) Cantidad de proteína de VEGF y α -tubulina. Se presentan dos bandas, una de 27 kDa que corresponde a la proteína de VEGF y una segunda banda de 55 kDa que corresponde a la proteína α -tubulina. Imagen representativa de un experimento a las 24 h realizado mediante la técnica de Western blot. B) Análisis densitométrico del contenido de la proteína de VEGF de acuerdo a los distintos tratamientos administrados. Los datos obtenidos del análisis fueron normalizados respecto a los obtenidos para α -tubulina. Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ comparado con V, P₄+RU y RU.

A.



B.

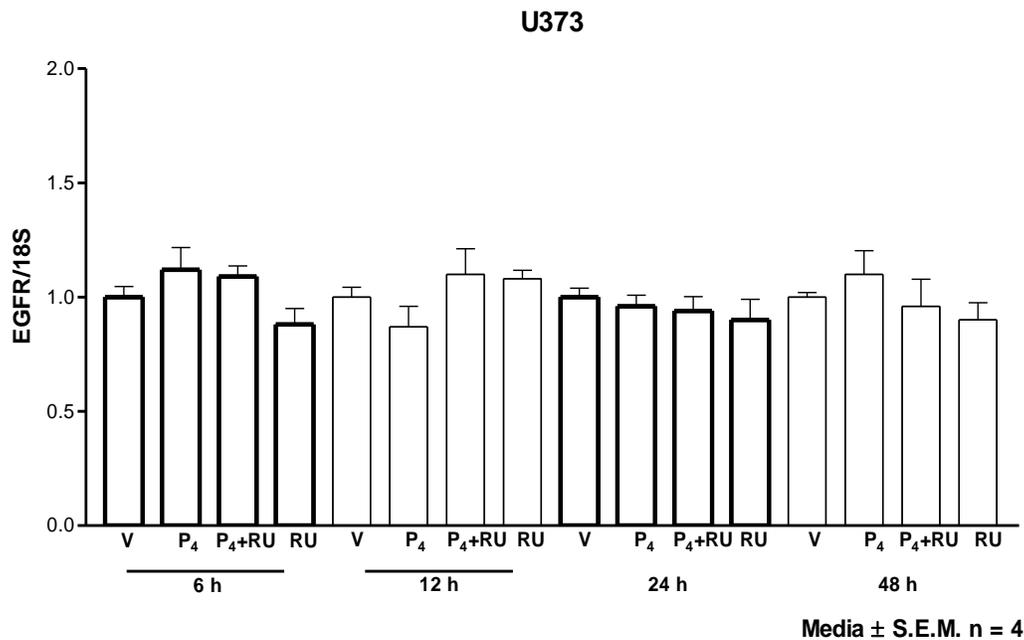
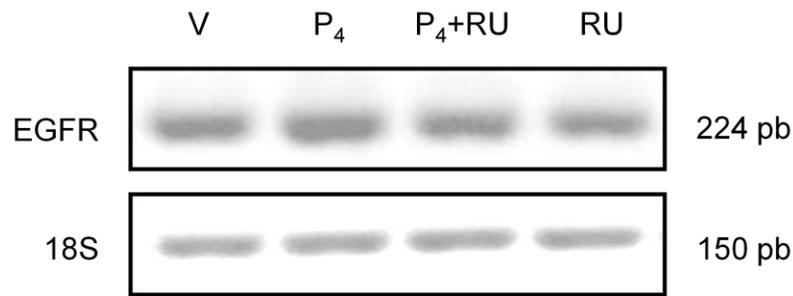


Figura 18. Expresión del mRNA de EGFR en la línea celular U373 a las 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento. A) Amplificación del mRNA de EGFR y rRNA 18S. Se presentan dos bandas, una de 224 pb que corresponde al mRNA del gen de EGFR y una segunda banda de 150 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de EGFR. Imagen representativa de un experimento (12 h) realizado mediante la técnica de RT-PCR. B) Análisis densitométrico del efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión del mRNA de EGFR. Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. n = 4.

A.



B.

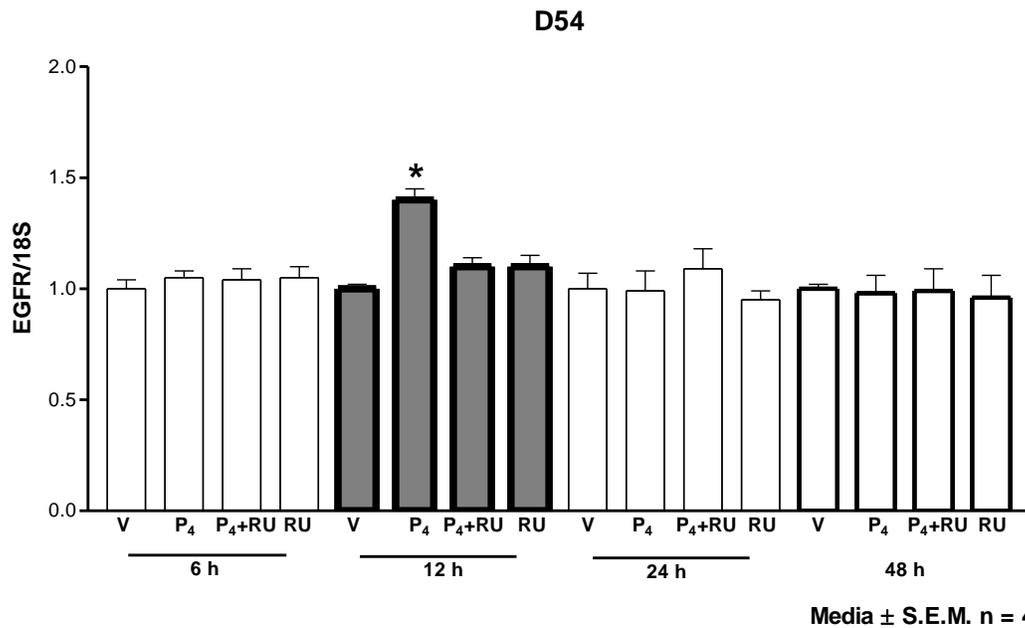
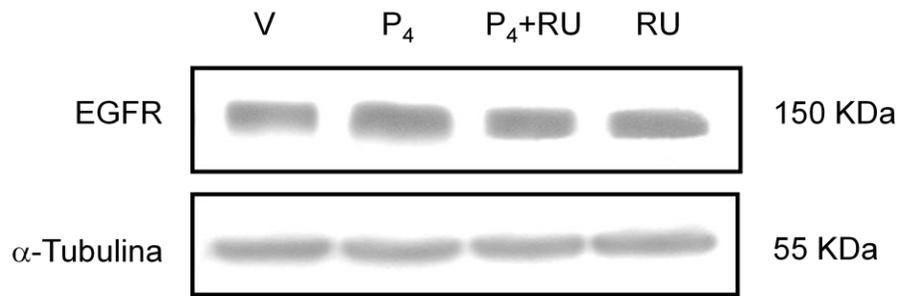


Figura 19. Expresión del mRNA de EGFR en la línea celular D54 a las 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento. A) Amplificación del mRNA de EGFR y rRNA 18S. Se presentan dos bandas, una de 224 pb que corresponde al mRNA del gen de EGFR y una segunda banda de 150 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de EGFR. Imagen representativa de un experimento (12 h) realizado mediante la técnica de RT-PCR. B) Análisis densitométrico del efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión del mRNA de EGFR. Los resultados son expresados como media ± S.E.M. * $p < 0.05$ comparado con V, P₄+RU y RU.

A.



B.

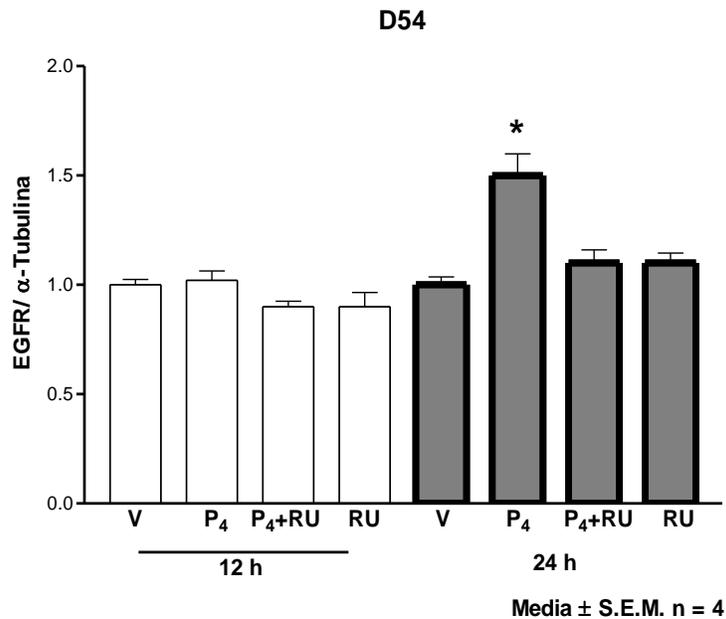


Figura 20. Contenido de la proteína de EGFR en la línea celular D54 a las 12 y 24 h de tratamiento. A) Cantidad de proteína de EGFR y α -tubulina. Se presentan dos bandas, una de 150 kDa que corresponde a la proteína de EGFR y una segunda banda de 55 kDa que corresponde a la proteína α -tubulina. Imagen representativa de un experimento a las 24 h realizado mediante la técnica de Western blot. B) Análisis densitométrico del contenido de la proteína de EGFR de acuerdo a los distintos tratamientos administrados. Los datos obtenidos del análisis fueron normalizados respecto a los obtenidos para α -tubulina. Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ comparado con V, P₄+RU y RU.

Los efectos de la P₄ encontrados sobre la expresión de VEGF y EGFR en las dos líneas celulares de astrocitomas son resumidos en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de P₄ a nivel de mRNA y a nivel de la proteína de VEGF y EGFR en las líneas celulares U373 y D54.

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

10. DISCUSIÓN

Las hormonas esteroides pueden regular muchos procesos biológicos a través de la unión con sus receptores intracelulares (Henley *et al.*, 2005), los cuales, mediante la activación de vías de señalización o mediante su función de factores de transcripción pueden causar el aumento o disminución de la expresión de genes blanco (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008; Misiti *et al.*, 1998). Cuando los receptores actúan como factores de transcripción, para mediar los efectos transcripcionales de las hormonas esteroides, se unen a secuencias específicas en el DNA e interactúan con la maquinaria de transcripción basal al igual que con otras proteínas como son los correguladores (Beato *et al.*, 1996).

Se sabe que las hormonas esteroides como la P_4 , además de estar involucradas en procesos fisiológicos, participan en procesos patológicos como la tumorigénesis (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000). Por otro lado, es conocido que los factores de crecimiento también pueden inducir proliferación en células normales y cancerosas, el mecanismo preciso por el cual se da el desarrollo de cáncer es desconocido. Sin embargo, existe evidencia de que el cáncer es resultado de cambios genéticos graduales que resultan en la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de protooncogenes. Estos últimos, una vez transformados resultan en oncogenes que codifican para diversas proteínas con diferentes funciones dentro de la célula; entre éstas, se encuentran factores de crecimiento o sus receptores como EGF o EGFR, que pueden encontrarse sobreexpresados en tumores celulares lo que deriva en la pérdida de importantes mecanismos de control celular. Dada su influencia en el fenotipo de muchos tipos celulares malignos, el conocimiento de los factores de crecimiento, sus receptores y su regulación, es importante para su establecimiento como blancos terapéuticos (Hernández *et al.*, 1999; Nussey, 2001).

Entre los tipos de tumores malignos de los cuales se ha propuesto que su desarrollo se encuentra influenciado por el ambiente hormonal, están los astrocitomas. Se ha sugerido que la P_4 participa en el desarrollo de estos últimos y que los efectos de la hormona pueden estar mediados por el RP (Carroll *et al.*,

1993; Gonzalez-Agüero *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la P_4 aumenta la proliferación celular en las líneas celulares U373 (grado III) y D54 (grado IV) derivadas de astrocitomas humanos, mientras que el tratamiento con un antagonista, RU486, bloquea el efecto de P_4 (Gonzalez-Agüero *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se determinó el efecto de la P_4 y de su antagonista RU486 sobre la regulación de la expresión de VEGF y EGFR en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 y D54 mediante las técnicas de RT-PCR y Western blot.

Los resultados obtenidos muestran que, en la línea D54, la P_4 regula positivamente la expresión de VEGF. Se observó un aumento significativo de su mRNA a las 12 h de tratamiento, mientras que la administración de RU486 bloqueó este efecto, por lo que se puede sugerir que la regulación por P_4 está mediada por el RP. Este efecto se vio reflejado a nivel de la proteína, ya que se observó un aumento significativo de su contenido a las 24 h de tratamiento con P_4 y de la misma forma que para el mRNA, el RU486 bloqueó su efecto. Existen varios reportes en los que, de manera similar a este trabajo, se observa que la P_4 incrementa la expresión del mRNA y/o de la proteína de VEGF en útero de ratón (Hyder *et al.*, 2000) y en las líneas celulares de cáncer de mama BT-474 HCC-1428 y T47D (aumento de 3 a 4 veces), efecto que es bloqueado por RU486 (Liang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004). También, en células de adenocarcinoma endometrial Ishikawa se ha reportado que la tasa de transcripción del gen de VEGF aumenta significativamente con el tratamiento de la progestina R5020, mientras que, con el tratamiento conjunto de P_4 con antagonistas como RU486 o ZK299 no se observa un incremento en la transcripción del gen (Mueller *et al.*, 2003). Asimismo, se ha determinado que la P_4 induce la expresión de VEGF en endometrio de primate (Greb *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que una posible forma mediante la cual la P_4 regula la expresión de VEGF es a través de un mecanismo de acción genómico o clásico en donde el RP, activado por P_4 , se une directamente al promotor del gen de VEGF ya que se han identificado tres ERP; el primero, en la región que va de -1865 a -

1860; el segundo, de -716 a -711 y el tercero, de +679 a +684 (Mueller *et al.*, 2003) (Figura 21).

Del mismo modo, en la línea celular D54, se determinó que la expresión de EGFR está regulada positivamente por P_4 , ya que el tratamiento con esta hormona incrementó significativamente su mRNA a las 12 h y este efecto se observó bloqueado por RU486. Al igual que en VEGF, el contenido de la proteína de EGFR aumentó de forma significativa a las 24 h de tratamiento con P_4 , efecto que fue bloqueado por RU486, lo que sugiere que su regulación por P_4 se lleva a cabo por medio del RP. Este aumento de la proteína a las 24 h de tratamiento refleja los cambios observados a nivel del mRNA de EGFR a las 12 h. Estos resultados coinciden con otros reportes en los cuales se ha descrito que, en la línea celular T47D y en células estromales de endometrio, la P_4 incrementa la expresión a nivel del mRNA y del contenido de EGFR, además de haberse demostrado que la inducción observada es bloqueada por RU486 (Faivre *et al.*, 2008; Musgrove *et al.*, 1991). Se ha reportado también, que progestinas sintéticas, como el acetato de medroxiprogesterona, aumentan la expresión de EGFR en células de adenocarcinoma endometrial (Zhao *et al.*, 2007).

Se sabe que el RP activado por su ligando puede unirse directamente al DNA para la regulación de la transcripción de genes blanco de P_4 que presentan ERP en su secuencia promotora, o puede unirse indirectamente al DNA mediante su asociación con otros factores de transcripción que se unen de forma directa, incluyendo a Sp1 y a la proteína activadora (AP1), para regular la transcripción de genes blanco de P_4 que carecen de ERP en su región promotora (Jacobsen *et al.*, 2005; Lockwood *et al.*, 2000).

Se ha sugerido un mecanismo de acción a través del cual la P_4 puede regular la expresión de EGFR. En éste, se considera el hecho de que, aunque el promotor de EGFR no contiene ERP, sí presenta sitios de unión a Sp1 donde el RP puede asociarse. La P_4 unida al RP que se encuentra en citoplasma activa la vía de señalización de c-Src y MAPK y a su vez se induce fosforilación de la isoforma B del RP nuclear (en la serina 345). Una vez fosforilada, se promueve su activación

y unión con el factor Sp1 en la región promotora del gen de EGFR, lo cual finalmente aumenta la transcripción de este gen (Figura 21).

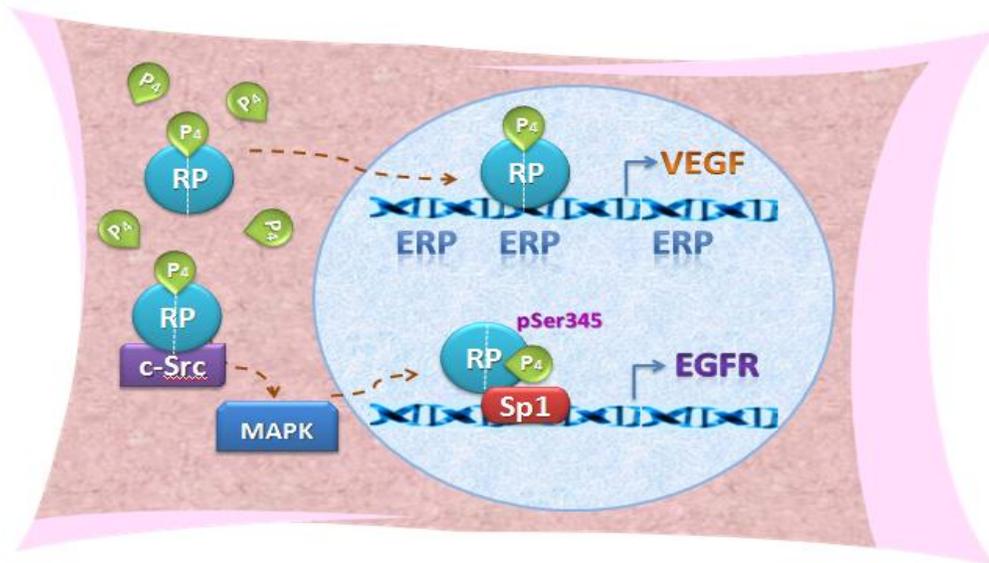


Figura 21. Mecanismos de acción propuestos para la regulación de P_4 sobre la expresión VEGF y EGFR (Favre *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2003).

De forma contraria a lo ocurrido en la línea celular D54, los resultados obtenidos en la línea celular U373 mostraron que no se lleva a cabo regulación de la expresión del mRNA ni de la proteína de VEGF y de EGFR por P_4 a los diferentes tiempos de estudio utilizados.

El hecho de que VEGF y EGFR puedan regularse de manera positiva por P_4 en la línea celular de grado IV, pero no en la de grado III, puede ser correlacionado con varios factores. Inicialmente, se debe recordar que el grado histológico de un tumor se refiere a su grado de diferenciación o semejanza que tengan o no las células del tumor con las células normales del mismo tipo de tejido, además de que a mayor grado de evolución las células presentan mayor desdiferenciación y por consiguiente, una expresión diferencial de proteínas que conllevan a una malignidad mayor (American-Joint-Committee-on-Cancer, 2010). Asimismo, se puede correlacionar con la expresión de las isoformas del RP y de coactivadores en líneas celulares de astrocitomas humanos. Se ha determinado que en la línea celular U373 la isoforma B del RP es la predominante (RPB:RPA

3:1), mientras que en la línea celular D54 la isoforma predominante es la A (RPB:RPA 0.66:1) y se sabe también que el RP-B es un mayor activador de la transcripción comparado con RP-A (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009). Lo anterior es importante porque las isoformas pueden regular diferentes genes blanco de P₄ y esto podría estar involucrado en la regulación diferencial de VEGF y EGFR por P₄ en estas líneas celulares. De igual forma, esta regulación diferencial podría verse influenciada por la expresión del coactivador SRC-1 ya que éste interviene en la remodelación de la estructura de la cromatina para favorecer la actividad transcripcional del RP (Tung *et al.*, 2006) y en la línea celular D54 se ha determinado que la P₄ aumenta significativamente la expresión de SRC-1 (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2010); esto es relevante porque el coactivador podría también aumentar la transcripción de genes blanco de P₄.

Finalmente, es importante mencionar que tanto la angiogénesis como la proliferación celular son procesos esenciales en el desarrollo de un tumor, que entre sus mediadores clave se encuentran VEGF y EGFR y que estos procesos están implicados en el aumento del grado de evolución tumoral (Willett *et al.*, 2004). Específicamente para el caso de la angiogénesis, etapa limitante en el crecimiento de las células cancerosas y metástasis, ésta permite que el tumor tenga acceso al oxígeno y los nutrientes esenciales. Sin vasculatura, un tumor no puede crecer más allá de 1 a 3 mm, ya que la única manera mediante la que puede acceder al oxígeno y los nutrientes es por difusión (Bergers *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha visto que cuando hay un aumento en la expresión de EGFR, se presenta una incontrolada proliferación celular, lo cual es característico del cáncer. Además, EGFR puede participar también en la angiogénesis, invasión y metástasis (Woodburn, 1999) debido a la capacidad de este receptor para activar vías de señalización que derivan en la transcripción de genes, por ejemplo, de metaloproteinasas o de algunos que controlan ciclo celular (Cascales *et al.*, 2010; Quezada, 2007). Por todo lo anterior mencionado, es muy frecuente encontrar sobreexpresados a estos genes en líneas celulares de alto grado de evolución tumoral respecto a otras de menor grado.

11. CONCLUSIONES

- La P_4 regula positivamente la expresión del mRNA y de la proteína de VEGF y EGFR en la línea celular D54 derivada de astrocitomas humanos de grado IV, pero no en la línea celular U373, de grado III.
- El efecto de la P_4 sobre la regulación de la expresión de VEGF y EGFR está mediado por el RP.
- El incremento en la expresión de VEGF y EGFR mediado por la activación del RP ocurre a nivel transcripcional y se refleja a nivel traduccional.

12. REFERENCIAS

- American-Joint-Committee-on-Cancer (2010). What is Cancer Staging? Vol. 2010. Chicago.
- Badash M (2009). Astrocitoma, New York University Medical Center DoN (ed), pp 1-4: EBSCO publishing.
- Baulieu EE (1999). Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr Suppl* **88**(433): 78-80.
- Bazley LA, Gullick WJ (2005). The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* **12 Suppl 1**: S17-27.
- Beato M, Sanchez-Pacheco A (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* **17**(6): 587-609.
- Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**(6): 401-410.
- Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* **73**(9-10): 922-928.
- Bramley T (2003). Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* **125**(1): 3-15.
- Bristol RE (2009). Low-grade glial tumors: are they all the same? *Semin Pediatr Neurol* **16**(1): 23-26.
- Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH (2007). Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* **82**(10): 1271-1286.
- Cabrera-Muñoz E, Gonzalez-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, Garcia-Becerra R, et al. (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* **113**(1-2): 80-84.
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Aguero G, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Ondarza R (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* **49**(1): 1-7.

- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A, Gonzalez-Aguero G, Guerra-Araiza C, Gonzalez-Moran G (2003). Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **136**(2): 447-452.
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A, Gonzalez-Moran G (2007). Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**(4): 644-652.
- Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M (2006). Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In: (ed)^(eds). *Molecular Endocrinology*, edn. Kerala India: Research Signpost. p^pp 25-38.
- Carr B, Bradshaw K (2005). Enfermedades del ovario y del aparato reproductor femenino. In: Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Isselbacher K (ed)^(eds). *HARRISON, Principios de Medicina Interna*, 16 edn. México: McGraw-Hill / Interamericana de México. p^pp 11566-11580.
- Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993). Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* **53**(6): 1312-1316.
- Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM (1995). Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* **37**(3): 496-503.
- Cascales A, Álvarez-Gómez J (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **76**(1): 59-84.
- Classen-Linke I, Alfer J, Krusche CA, Chwalisz K, Rath W, Beier HM (2000). Progestins, progesterone receptor modulators, and progesterone antagonists change VEGF release of endometrial cells in culture. *Steroids* **65**(10-11): 763-771.
- Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonnell DP (1995). Definition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**(1-6): 487-495.
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988). Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* **62**(10): 2152-2165.

- Edward A, Longo D (2005). Principios del tratamiento del cáncer: cirugía, quimioterapia y tratamiento biológico. In: Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Isselbacher K (ed)^(eds). *HARRISON, Principios de Medicina Interna*, 16 edn. México: McGraw-Hill / Interamericana de México. p[^]pp 2804-2820.
- Faivre EJ, Daniel AR, Hillard CJ, Lange CA (2008). Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol Endocrinol* **22**(4): 823-837.
- Ferrara N (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**(4): 581-611.
- Folkman J (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**(1): 27-31.
- Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* **60**(5): 1383-1387.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**(21): 2683-2710.
- Ganong W (2006). Las gónadas: desarrollo y función del sistema reproductor. In: (ed)^(eds). *Fisiología médica*, edn. México: El Manual Moderno. p[^]pp 387-425.
- Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, *et al.* (2003). Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* **63**(20): 6613-6625.
- Gonzalez-Agüero G, Gutierrez AA, Gonzalez-Espinosa D, Solano JD, Morales R, Gonzalez-Arenas A, *et al.* (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **32**(2): 129-135.
- Gonzalez-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Camacho-Arroyo I (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* **56**(1): 43-48.

- Graham JD, Clarke CL (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* **18**(4): 502-519.
- Greb RR, Heikinheimo O, Williams RF, Hodgen GD, Goodman AL (1997). Vascular endothelial growth factor in primate endometrium is regulated by oestrogen-receptor and progesterone-receptor ligands in vivo. *Hum Reprod* **12**(6): 1280-1292.
- Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I (2000). [Progesterone receptor isoforms: function and regulation]. *Rev Invest Clin* **52**(6): 686-691.
- Hadjipanayis CG, Van Meir EG (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* **15**(11): 519-530.
- Haley J, Whittle N, Bennet P, Kinchington D, Ullrich A, Waterfield M (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* **1**(4): 375-396.
- Henley D, Lindzey J, Korach K (2005). Steroid Hormones. In: Melmed S, Conn P (ed)^(eds). *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*, 2 edn. New Jersey: Humana Press. p^pp 49-65.
- Henn W, Blin N, Zang KD (1986). Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet* **74**(1): 104-106.
- Hernandez-Hernandez OT, Rodriguez-Dorantes M, Gonzalez-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2010). Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **37**(1): 194-200.
- Hernández M, Ríos H (1999). Oncogenes y cáncer. *Rev Cubana Oncol* **15**(2): 131-139.
- Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Makela S, Chiappetta C, et al. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 5**: 785-790.
- Hyder SM, Murthy L, Stancel GM (1998). Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res* **58**(3): 392-395.

- Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004). Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* **70**(2): 137-160.
- Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK, Horwitz KB (2005). Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* **19**(3): 574-587.
- Johnson AC, Ishii S, Jinno Y, Pastan I, Merlino GT (1988). Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem* **263**(12): 5693-5699.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, *et al.* (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* **9**(5): 1603-1614.
- Kazi AA, Koos RD (2007). Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* **148**(5): 2363-2374.
- Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T (1997). Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* **80**(11): 2133-2140.
- Klein TE, Chang JT, Cho MK, Easton KL, Fergerson R, Hewett M, *et al.* (2001). Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the PharmGKB Project Vol. 1, pp 167-170: The Pharmacogenomics Journal.
- Kondo I, Shimizu N (1983). Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* **35**(1): 9-14.
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1993). Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* **7**(12): 1603-1616.

- Krieg J, Hunter T (1992). Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem* **267**(27): 19258-19265.
- Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD (2001). EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **8**(2): 83-96.
- Lange CA, Richer JK, Shen T, Horwitz KB (1998). Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* **273**(47): 31308-31316.
- Lange CA, Yee D (2009). Progesterona y cáncer de mama. *Revista del climaterio* **12**(71): 153-165.
- Leonhardt SA, Altmann M, Edwards DP (1998). Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol* **12**(12): 1914-1930.
- Leonhardt SA, Edwards DP (2002). Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**(11): 969-980.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**(4935): 1306-1309.
- Liang Y, Hyder SM (2005). Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* **146**(8): 3632-3641.
- Lockwood CJ, Krikun G, Runic R, Schwartz LB, Mesia AF, Schatz F (2000). Progestin-epidermal growth factor regulation of tissue factor expression during decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(1): 297-301.
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, *et al.* (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 9045-9049.

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109.
- Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D, O'Rourke DM (2000). Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* **60**(20): 5879-5886.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* **20**(3): 321-344.
- McKinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA, Plunkett RJ (2000). The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg* **93**(6): 932-939.
- McKusick-Nathans, Hopkins J, Information NCfB (2010). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM): National Library of Medicine (Bethesda, MD).
- Misiti S, Schomburg L, Yen PM, Chin WW (1998). Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* **139**(5): 2493-2500.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* **1216**(2): 289-292.
- Mueller MD, Vigne JL, Pritts EA, Chao V, Dreher E, Taylor RN (2003). Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil Steril* **79**(2): 386-392.
- Murphy LC, Murphy LJ, Shiu RP (1988). Progestin regulation of EGF-receptor mRNA accumulation in T-47D human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **150**(1): 192-196.
- Musgrove EA, Lee CS, Sutherland RL (1991). Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* **11**(10): 5032-5043.

- Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R (2006). Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* **12**(24): 7261-7270.
- Nussey SW, S. (2001). Principles of endocrinology. In: *Endocrinology. An Integrated Approach*. London: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**(5): 1445-1453.
- Peles E, Lidar Z, Simon AJ, Grossman R, Nass D, Ram Z (2004). Angiogenic factors in the cerebrospinal fluid of patients with astrocytic brain tumors. *Neurosurgery* **55**(3): 562-567.
- Pérez OL, Rodríguez RE, Figueredo RR, Barroso GE (2001). Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir* **40**(2): 87-91.
- Plouët J, Schilling J, Gospodarowicz D (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* **8**(12): 3801-3806.
- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, *et al.* (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* **272**(11): 7151-7158.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007). NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins Vol. 35, pp D61-65: *Nucleic Acids Res*.
- Quezada R (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y cómo es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS* **65**: 5-12.
- Raaijmakers HC, Versteegh JE, Uitdehaag JC (2009). The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *J Biol Chem* **284**(29): 19572-19579.
- Reiter JL, Maihle NJ (1996). A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res* **24**(20): 4050-4056.

- Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, *et al.* (2001). Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* **71**(1): 1-20.
- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, *et al.* (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* **57**(5): 963-969.
- Reynolds RK, Talavera F, Roberts JA, Hopkins MP, Menon KM (1990). Regulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I receptors by estradiol and progesterone in normal and neoplastic endometrial cell cultures. *Gynecol Oncol* **38**(3): 396-406.
- Rosen LS (2005). VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist* **10**(6): 382-391.
- Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, Syrjäkoski KM, Nupponen NN, Rantala IS, *et al.* (1999). Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J Pathol* **188**(3): 289-293.
- Sarkar C, Jain A, Suri V (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* **46**(2): 108-119.
- Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB (1994). A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* **8**(10): 1347-1360.
- Schumacher M, Guennoun R (2009). Progesterone: Synthesis, Metabolism, Mechanisms of Action, and Effects in the Nervous System. An Overview. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (ed)^(eds). *Hormones, Brain and Behavior*, 2 edn. USA: Academic Press. p^pp 1506-1523.
- Spitz IM (2003). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids* **68**(10-13): 981-993.

- Takano S, Yoshii Y, Kondo S, Suzuki H, Maruno T, Shirai S, *et al.* (1996). Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res* **56**(9): 2185-2190.
- Tetel MJ, Lange CA (2009). Molecular Genomics of Progestin Actions. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (ed)^(eds). *Hormones, Brain and Behavior*, edn. USA: Academic Press. p[^]pp 1439-1465.
- The-UniProt-Consortium (2010). The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010 Vol. 38, pp D142-148: *Nucleic Acids Res.*
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E (1987). Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature* **329**(6134): 79-81.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, *et al.* (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266**(18): 11947-11954.
- Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DM, Nitao LK, Richer JK, *et al.* (2006). Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* **20**(11): 2656-2670.
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB (1993). Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol* **7**(10): 1256-1265.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* **7**(10): 1244-1255.
- Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, Milanezi F, Basto D, Pardal F, *et al.* (2008). Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res* **28**(2A): 913-920.

- Wang K, Yamamoto H, Chin JR, Werb Z, Vu TH (2004). Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. *J Biol Chem* **279**(51): 53848-53856.
- Westphal U, Harding GB (1973). Steroid-protein interactions. XXVII. Progesterone binding to polymers of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* **310**(2): 518-527.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, *et al.* (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med* **10**(2): 145-147.
- Woodburn JR (1999). The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **82**(2-3): 241-250.
- Wu J, Richer J, Horwitz KB, Hyder SM (2004). Progesterone-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: preferential regulation by progesterone receptor B. *Cancer Res* **64**(6): 2238-2244.
- Xu Q, Ohara N, Chen W, Liu J, Sasaki H, Morikawa A, *et al.* (2006). Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod* **21**(9): 2408-2416.
- Yang EB, Wang DF, Mack P, Cheng LY (1996). Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, reduces EGF-induced EGF receptor internalization and degradation in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **224**(2): 309-317.
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**(6): 1137-1149.
- Zhao S, Chen X, Lu X, Yu Y, Feng Y (2007). Epidermal growth factor receptor signaling enhanced by long-term medroxyprogesterone acetate treatment in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* **105**(1): 45-54.

13. ANEXO

13.1. Estandarización de condiciones para PCR

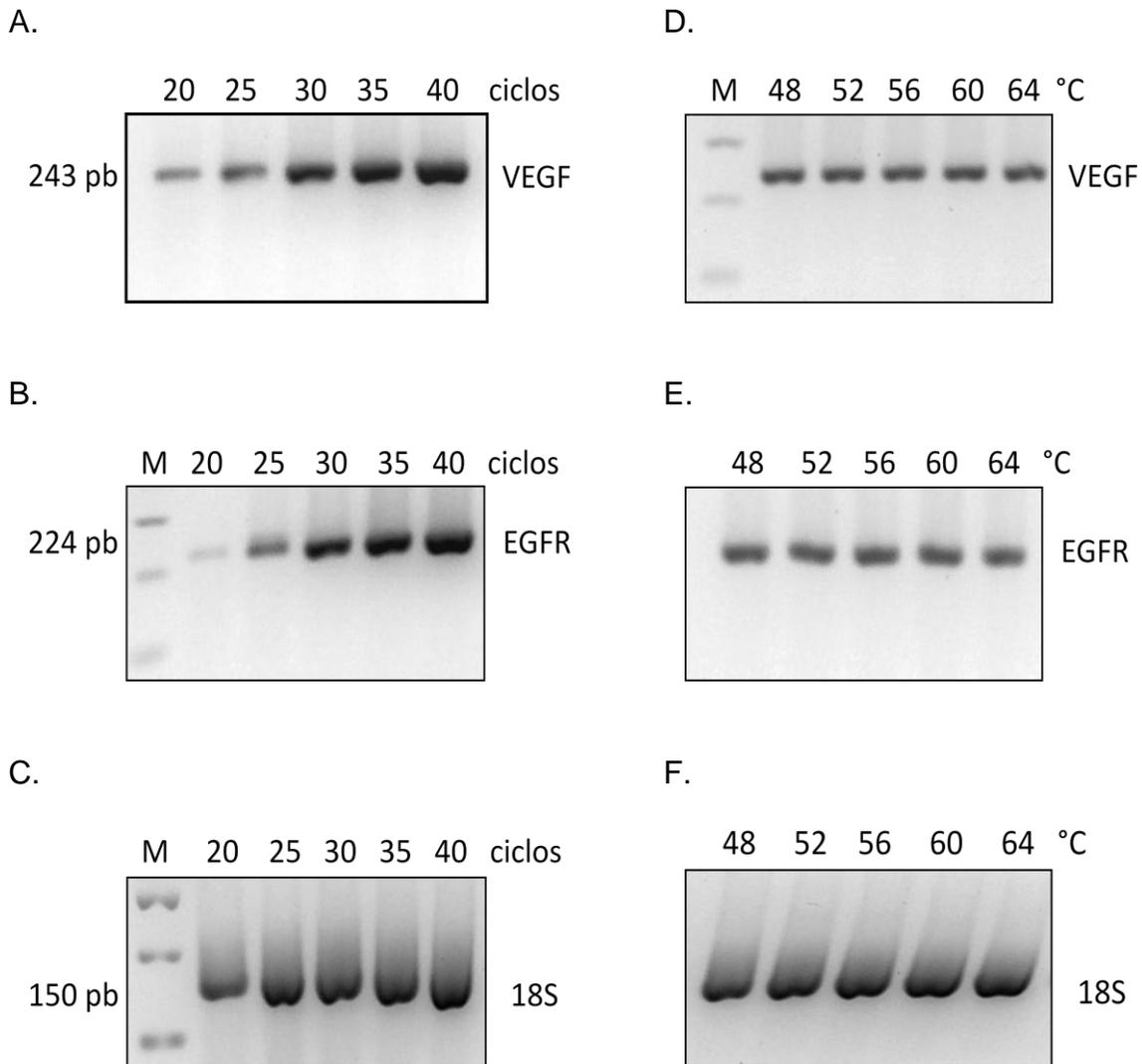
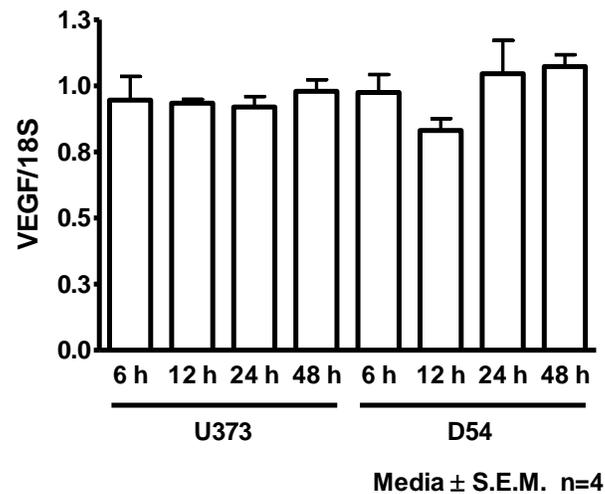


Figura 22. Curvas de calibración de ciclos y de temperaturas para la amplificación de VEGF, EGFR y 18S. A)-C). Curvas de 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos. D)-F) Curvas de calibración de temperaturas a 48, 52, 56, 60 y 64 °C. Para la amplificación de VEGF se observó una banda de 243 pb, para la amplificación de EGFR una banda de 224 pb y para la amplificación de 18S una banda de 150 pb.

13.2. Niveles basales de mRNA de VEGF y EGFR en líneas celulares U373 y D54

A.



B.

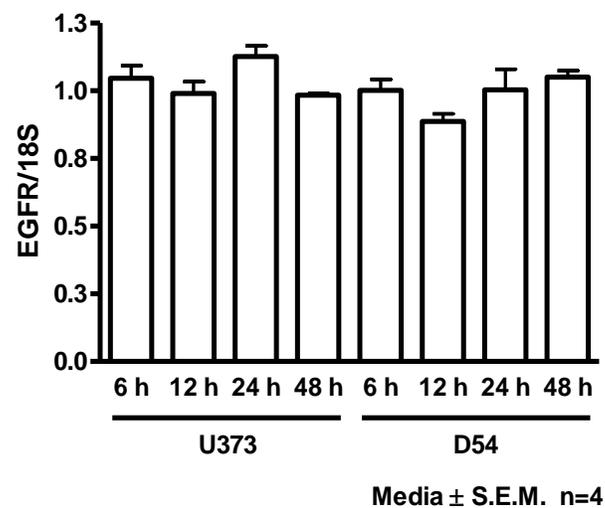


Figura 23. Expresión del mRNA de VEGF y EGFR en las líneas celulares U373 y D54 a 6, 12, 24 y 48 h sin tratamiento. A) Análisis densitométrico de la expresión de VEGF. B) Análisis densitométrico de la expresión de EGFR. Los resultados son expresados como media \pm S.E.M.