



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

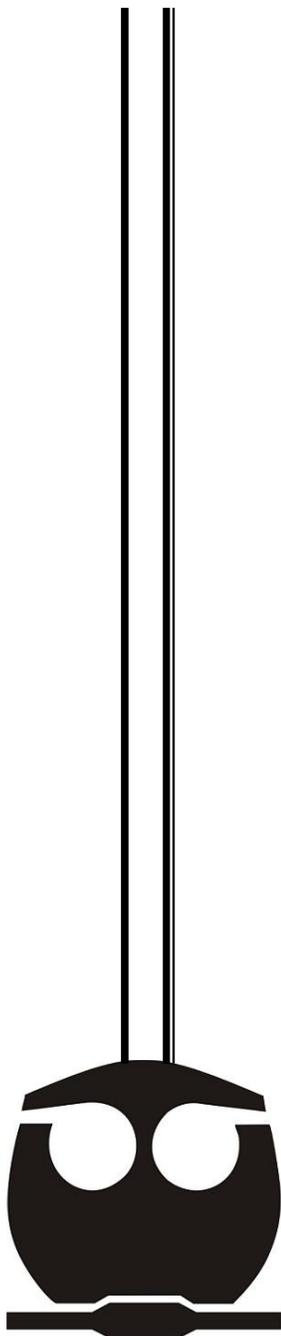
EFFECTO DE LA ALOPREGNANOLONA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE CÉLULAS DERIVADAS DE GLIOMAS
HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CARMEN JANÍN ZAMORA SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F. abril de 2015.



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: Dra. Elena Zambrano González

VOCAL: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SECRETARIO: Dra. Lidia Sumiko Morimoto Martínez

1er. SUPLENTE: Dra. Olivia Tania Hernández Hernández

2° SUPLENTE: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM Y EN DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

SUSTENTANTE: ZAMORA SÁNCHEZ CARMEN JANÍN

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente tesis fue posible gracias al apoyo económico brindado por el programa de *Cátedras Académicas* ofrecidas por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), (Cátedra Magdalena Oliva González), bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

A la Dra. Aliesha Araceli González Arenas del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y a la M. en C. Valeria Hansberg Pastor del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, por su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Ignacio Camacho, la Dra. Sumiko Morimoto y la Dra. Elena Zambrano, por su interés al revisar y comentar esta tesis.

INDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. ANTECEDENTES	7
3.1. Tumores cerebrales.....	7
3.1.1. Generalidades	7
3.1.2. Astrocitomas.....	9
3.2. Alopregnanolona (3 α -THP).....	13
3.2.1. Generalidades	13
3.2.2. Síntesis de la 3 α -THP	15
3.2.3. Mecanismos de acción de la 3 α -THP	18
3.3. Inhibidores de la síntesis de 3 α -THP	20
3.3.1. Generalidades	20
3.3.2. <i>Características de la Finasterida (F)</i>	24
3.4. Papel de la 3 α -THP en diferentes tipos de cáncer	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
5. HIPÓTESIS.....	28
6. OBJETIVOS	28
6.1. Objetivo general.....	28
6.2. Objetivos particulares	28
7. METODOLOGÍA.....	28
7.1. Cultivo celular.....	28
7.2. Conteo celular	29
7.3. Cálculo de la viabilidad celular	29
7.4. Incorporación de BrdU.....	30
7.5. Análisis estadístico	31
8. RESULTADOS	31
8.1. Efectos de la 3 α -THP sobre el crecimiento de la línea celular U87	31
9. DISCUSIÓN.....	35
10. CONCLUSIONES.....	38
11. REFERENCIAS	39

1. RESUMEN

Los gliomas son tumores que tienen características de células gliales; se clasifican de acuerdo a sus características histológicas e inmunohistoquímicas en: astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas.

Los astrocitomas representan el 40-50% de todos los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) y hasta 70% de los tumores gliales. El astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme (astrocitomas de grados III y IV) son las variantes más malignas y frecuentes de los tumores astrocíticos (30 y 50% de frecuencia respectivamente).

Se han encontrado diversos factores asociados con el desarrollo y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas. Existen informes que sugieren que las hormonas sexuales, entre las que se encuentra la progesterona (P_4), pueden participar en el crecimiento de los astrocitomas. La P_4 es metabolizada en el SNC dando lugar a metabolitos cuya acción puede prolongar, incrementar o terminar con los efectos de dicha hormona. Uno de estos metabolitos es la alopregnanolona (3α -THP) que participa en diversos procesos fisiológicos y patológicos del SNC.

En el presente trabajo se determinó el efecto de la 3α -THP sobre el crecimiento y la proliferación de la línea celular U87 derivada de un astrocitoma de grado IV así como el efecto de un inhibidor de la síntesis de la 3α -THP, la finasterida (F), sobre el crecimiento y la proliferación de esta misma línea celular.

Inicialmente, se determinó la concentración de 3α -THP con mayor efecto sobre la línea celular U87, lo cual dio como resultado a la de 1 nM como la más efectiva para aumentar el número de células. El incremento en el número de células inducido por la 3α -THP fue similar al inducido por la P_4 . De manera interesante, la F bloqueó el efecto de la P_4 . Asimismo, la 3α -THP incrementó la proliferación celular evaluada por medio de la técnica de incorporación de BrdU.

Los datos anteriores indican que la 3α -THP induce la proliferación en la línea celular U87 y que el metabolismo de la P_4 podría ser un factor determinante en procesos de crecimiento y proliferación mediados por dicha hormona en gliomas humanos.

2. 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 al año (Furnari 2007). Los astrocitomas representan el 40-50% de todos los tumores primarios del SNC y hasta 70% de los tumores gliales. El astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme (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 cuales se encuentra la progesterona (P_4), pueden participar en el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; González-Agüero *et al.*, 2001;2007). Se sabe que la P_4 es metabolizada en el SNC dando lugar a metabolitos cuya acción puede prolongar, incrementar o terminar con los efectos de dicha hormona. Uno de estos metabolitos es la alopregnanolona (3α -THP), la cual participa en la regeneración neuronal y en la formación de mielina en las células gliales (Brinton R.D., 2013; Schumacher *et al.*, 2014). Estudios recientes han asociado variaciones en los niveles de dicho metabolito con diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer, depresión, ansiedad y epilepsia (Brinton, 2013; Melcangi *et al.*, 2014). En una línea celular de teratocarcinoma se ha visto que protege a las células contra necrosis y apoptosis (Lockhart *et al.*, 2002).

A pesar de que existen diversos estudios acerca de los efectos de la P₄ sobre el desarrollo de tumores cerebrales en los seres humanos, aún no se han realizado estudios sobre la influencia de los metabolitos de la P₄ y en particular de la 3 α -THP sobre los gliomas humanos, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de dicho metabolito sobre el número de células y la proliferación de células U87 derivadas de una línea de glioma humano grado IV.

3. ANTECEDENTES

3.1. Tumores cerebrales

3.1.1. Generalidades

Los tumores cerebrales, como todos los tipos de cáncer, surgen a partir de alteraciones en los controles moleculares de los procesos de proliferación, muerte y diferenciación celular. En la actualidad, los tumores cerebrales se clasifican de acuerdo a un sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual fue desarrollado a partir del trabajo de los pioneros Bailey y Cushing. En este sistema se emplea el uso del sufijo “oma” después del tipo celular más parecido al de las células tumorales. Basándose en estos criterios, los neuropatólogos distinguen a los tumores cerebrales entre gliomas (astrocitomas), oligodendrogliomas y tumores neuronales (Furnari *et al.*, 2007).

Los gliomas se clasifican de acuerdo a sus características histológicas e inmunohistoquímicas en: astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas (Furnari *et al.*, 2007); de los cuales, los astrocitomas son los más frecuentes y se clasifican en cuatro grados de acuerdo a su malignidad y capacidad de invasión y progresión (Kim *et al.*, 1991). Los oligodendrogliomas se subdividen en tumores compuestos solo por células tumorales oligodendrogliales o por una mezcla de células tumorales con características de oligodendrocitos y con apariencia de astrocitos –oligoastrocitomas-. En cuanto a los astrocitomas, la frecuencia de aparición de estos tumores entre hombres y mujeres es de 3:2, la cual se observa

principalmente en los astrocitomas de mayor grado de evolución (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Los tumores neuronales constituyen una gran proporción de tumores que se observan en niños entre los que se incluyen el neurocitoma central, ganglioglioma, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial y meduloblastoma (Read *et al.*, 2006).

La incidencia anual de tumores cerebrales primarios a nivel mundial es de aproximadamente 7 por cada 100 mil individuos (Furnari *et al.*, 2007; Xie, 2009), de los cuales, los gliomas representan el 70% (Schwartzbaum *et al.*, 2006).

Los gliomas son tumores neuroectodérmicos que tienen características de células gliales. Existen diferentes teorías que buscan explicar el origen de estos tumores, una de ellas plantea que existe una ventana de vulnerabilidad neoplásica en la cual ocurren eventos oncogénicos en células fetales en proliferación (Louis *et al.*, 2007). En esta teoría, los tumores neurales son poco comunes ya que sólo pueden ocurrir eventos oncogénicos durante el desarrollo embrionario temprano. En cambio, los tumores gliales son más comunes y surgen a una edad más avanzada, debido a que la proliferación glial ocurre durante la gestación y la vida postnatal (Louis *et al.*, 2007).

Se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se encuentran en el adulto y tienen una alta capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse, por lo que son candidatos potenciales a ser progenitores de tumores gliales (Alcantara Llaguno *et al.*, 2009). También se plantea que existen células neuronales y gliales preneoplásicas, provenientes de distintas regiones del cerebro, que poseen una mayor susceptibilidad a cambios genéticos que, sumados con el microambiente y las señales de las células no neoplásicas, pueden generar un riesgo hacia el desarrollo de gliomas (Chen y Gutmann, 2014). Asimismo, existen reportes que sugieren que las neuronas y los astrocitos maduros pueden sufrir desdiferenciación en respuesta a cambios genéticos asociados a gliomas y crear un estado progenitor suficiente para iniciar la formación de estos tumores. Esta teoría también explicaría la heterogeneidad característica de los gliomas (Friedmann-Morvinski *et al.*, 2012).

3.1.2 Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales que pueden surgir 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 los cuales se presentan principalmente en adultos entre 50 y 70 años y poseen un alto potencial de malignidad (González-Agüero *et al.*, 2001).

La 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 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 agregados de astrocitos bipolares alargados, mientras que las áreas esponjosas consisten de astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos. En ocasiones puede observarse proliferación vascular glomerular; sin embargo, no es considerada como una señal de malignidad. Las células que componen al astrocitoma presentan fuerte inmunopositividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sarkar *et al.*, 2009). Estos tumores usualmente pueden ser eliminados mediante resección quirúrgica (total o parcial) y/o radio/quimioterapia (Bristol, 2009).

❖ *Astrocitoma difuso (grado II)*

Los astrocitomas difusos o infiltrantes afectan comúnmente a adultos entre 30 y 40 años de edad. Estos tumores están caracterizados por un alto grado de diferenciación, lento crecimiento celular y bordes no definidos, pero con una tendencia intrínseca para la progresión a astrocitomas anaplásicos y, en el peor de los casos a glioblastomas. Se presentan comúnmente en los hemisferios cerebrales, seguidos por el tallo cerebral y la médula espinal. Histológicamente, se observa en éstos un moderado incremento celular, astrocitos bien diferenciados y con atipia nuclear ocasional.

En los astrocitomas de grado II se observa una baja proporción de células con actividad mitótica y proliferación endotelial, además de no presentar necrosis. La inmunorreactividad a GFAP 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 anormalidades en la mitosis y positivas a GFAP. 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

sobrevida de los pacientes con esta patología es de 2 a 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 presenta 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 con 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). Dentro de las principales características de estas células son la atipia nuclear y la gran actividad mitótica, así como las formas atípicas. La presencia de proliferación microvascular atípica (debida a la 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 relativamente 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 sobrevida de los pacientes con glioblastomas es corta y generalmente fallecen dentro del primer año después del diagnóstico (Louis *et al.*, 2007). Estos tumores son muy resistentes a la

radioterapia y quimioterapia; 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 sobrevida 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 / ubiquitinaligasa 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) que promueve la angiogénesis y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular (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 sobrevida 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 intra-arterial, inmunoterapia, terapia génica y tratamientos endócrinos (Edward *et al.*, 2005).

En nuestro grupo de trabajo se ha observado que la P_4 tiene un papel fundamental en el desarrollo de este tipo de tumores a través de su mecanismo de acción genómico, en el cual, dicha hormona interactúa con receptores intracelulares (RP) y puede llevar a cabo cambios en la transcripción de genes específicos relacionados con la proliferación, angiogénesis e inhibición de la apoptosis, sucesos claves en el desarrollo y progresión de los tumores (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; González-Agüero *et al.*, 2001, 2007). Sin embargo, poco se sabe del papel que desempeñan los metabolitos de dicha hormona y, en particular, de la 3α -THP sobre el desarrollo de estos tumores.

En la actualidad se sabe que dicho metabolito interactúa con sitios reguladores de cierto tipo de receptores del ácido- γ -amino butírico (GABA), un neurotransmisor inhibitor del SNC (Brinton, 2013), asimismo, se ha observado que puede unirse a receptores membranales de P_4 (mPRs), proteínas de siete dominios transmembranales que pertenecen a la familia de receptores de progestinas y adipoQ (Schumacher. *et al.*, 2014). Debido a estas interacciones, se cree que la 3α -THP puede activar mecanismos de protección y regeneración celular, de ahí que su efecto en células derivadas de gliomas de grado IV pueda arrojar mayor información sobre el papel que ésta juega en el desarrollo tumoral.

3.2 Alopregnanolona (3α -THP)

3.2.1 Generalidades

Durante muchos años, la 3α -THP fue considerada sólo como uno de tantos productos del metabolismo de la P_4 que es sintetizada y secretada por los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), testículos, glándulas adrenales y placenta (Henley *et al.*, 2005), sin embargo, estudios recientes han demostrado que la 3α -THP, juega un papel muy importante en la regulación de diversos efectos de la P_4 , no sólo en condiciones fisiológicas, sino también en diversas patologías (Brinton, 2013; Schumacher *et al.*, 2014; Melcangi *et al.*, 2014).

Además de ser sintetizada a nivel sistémico, la P_4 también es sintetizada en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos por neuronas y células gliales, ya sea *de novo* a partir del colesterol o a partir de la pregnenolona circulante (Baulieu, 1999); participa en la regulación de un amplio número de funciones en los mamíferos: la estimulación de la respiración, conducta sexual, modulación de la masa ósea, regulación del sistema inmune; y fue a partir de la década de 1980 cuando empezó a considerarse que la P_4 era más que un regulador de la reproducción a nivel del SNC (Banks *et al.*, 1980; Barraclough *et al.*, 1986), en la actualidad se ha identificado como un agente importante en la neuroprotección, desarrollo de neuronas y células gliales, reducción de la excitabilidad neuronal, memoria y aprendizaje además de en el crecimiento de diversos tumores cerebrales y de otros órganos (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003), también se ha identificado que los metabolitos de la esta hormona pueden incrementar, prolongar, terminar o bien, proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la misma, en muchos casos, la 3α -THP media las acciones de la P_4 (Camacho-Arroyo *et al.*, 1995; Guerra-Araiza *et al.*, 2007, 2009).

La P_4 y sus metabolitos ejercen diversas acciones protectoras y de modulación en el SNC (Mòdol *et al.*, 2014) a través de su unión con: 1) receptores intracelulares específicos; 2) receptores de membrana; 3) sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores; y 4) canales iónicos (González-Agüero *et al.*, 2007). Las acciones de la 3α -THP podrían deberse a la regulación que ejerce sobre la actividad de los receptores $GABA_A$ a lo largo de diferentes etapas de la vida (Turkmen *et al.*, 2011), también regula la liberación de GABA y glutamato (Giuliani *et al.*, 2013) y podría estar implicada en la regulación de los efectos de la P_4 sobre funciones neuronales al actuar sobre receptores membranales de la P_4 (Pang *et al.*, 2013).

La 3α -THP (o 5α -Pregnan- 3α -ol-20-ona) es un derivado del colesterol de 21 átomos de carbono y tiene un peso molecular de 318.49 g/mol (**Figura 1**); en estudios recientes se ha visto que los niveles de la 3α -THP y de la P_4 se ven modificados en procesos patológicos o de daño al SNC de acuerdo a diversos modelos de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple,

neuropatías periféricas, encefalopatía diabética entre otras (Brinton R.D., 2013; Melcangi *et al.*, 2014) de manera dependiente del sexo y de regiones específicas del cerebro.

Se han propuesto diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de dichas patologías, en los cuales se ha estudiado el papel de ambos neuroesteroides sobre la protección que ejercen ante estímulos excitotóxicos o que provocan muerte celular por apoptosis o necrosis en diferentes tipos celulares. A pesar de que la 3 α -THP ha demostrado ser más efectiva que la P₄ para proteger o disminuir la apoptosis, excitotoxicidad y la pérdida de neuronas o de células gliales (He *et al.*, 2004; VanLandingham *et al.*, 2006, 2008), aún no se han establecido claramente los mecanismos por los cuales ésta ejerce su acción.

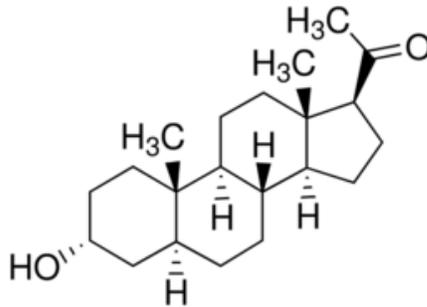


Figura 1. Estructura química de la 3 α -THP

Hasta el momento sigue en discusión el uso de ambos compuestos o de derivados de éstos como coadyuvantes en el tratamiento de diversas patologías del SNC en gran medida por la rapidez de su metabolismo y por los diversas acciones que los metabolitos podrían ejercer sobre el organismo (Hovakimyan *et al.*, 2013; Brinton, 2013).

3.2.2 Síntesis de la 3 α -THP

El proceso por el cual se lleva a cabo la síntesis de la P₄ así como su metabolismo mediante el que se obtiene a la 3 α -THP es altamente

compartimentalizado: Como primer paso en la biosíntesis de la P_4 ocurre la translocación del colesterol citoplasmático hacia el interior de la membrana mitocondrial por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) o por la proteína translocadora de 18kDa (TSPO). Posteriormente, es convertido en pregnenolona por el citocromo P450 (CYP11A1 o P450scc). La pregnenolona es convertida en P_4 por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) que se encuentra en la mitocondria o en la membrana del retículo endoplásmico, dependiendo del tipo de célula esteroidogénica (**Figura 2**).

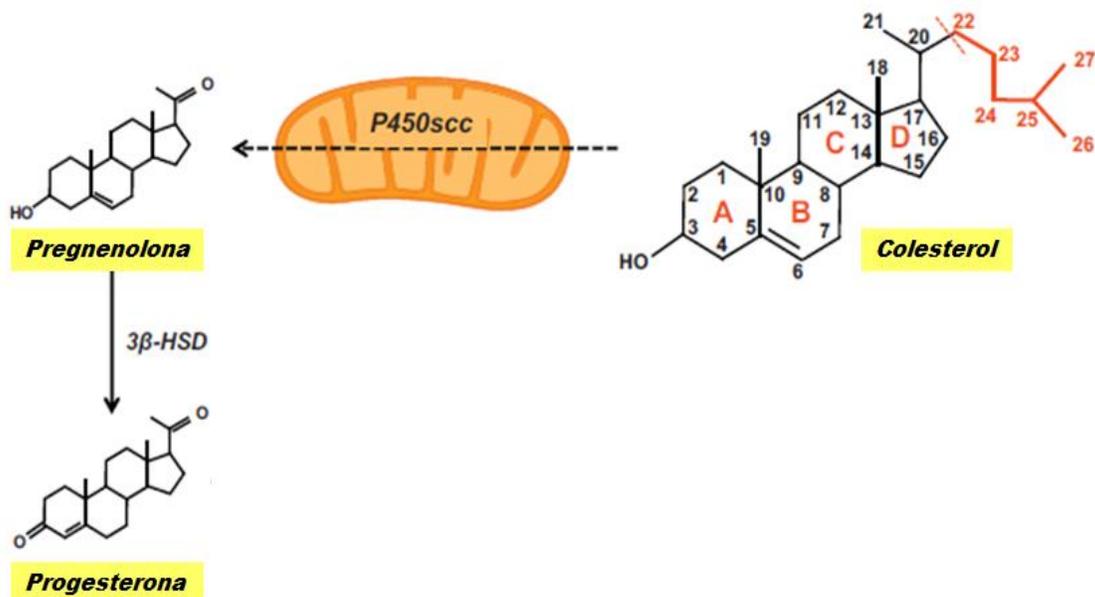


Figura 2. Biosíntesis de la P_4 . Conversión de colesterol a pregnenolona por CYP11A (también llamada colesterol 20,22-desmolasa o P450scc) y de ésta a P_4 por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). La 3 β -HSD cataliza 2 reacciones: la deshidrogenación del grupo OH del carbono (C) 3 y la subsecuente isomerización del doble enlace entre el C5 y C6 a un doble enlace entre el C4 y C5 (Modificado de Schumacher *et al.*, 2014).

En SNC y SNP, las células con las enzimas necesarias para metabolizar a la P_4 son neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. En éstas, la P_4 es reducida por la 5 α -reductasa (5 α -R) (**Figura 3**), enzima que constituye el paso limitante en el metabolismo de la P_4 a 5 α -dihidroprogesterona (5 α -DHP), ésta es convertida a 3 α -THP por la 3 α -hidroxiesteroide oxidoreductasa o a 3 β -THP por la 3 β -hidroxiesteroide oxidoreductasa (Melcangi *et al.*, 2014; Schüle *et al.*, 2014).

La 5 α -R está asociada con diferenciación y maduración de células neuronales y gliales; en células derivadas de gliomas, el AMPc parece causar la activación de dicha enzima (Morita *et al.*, 1999).

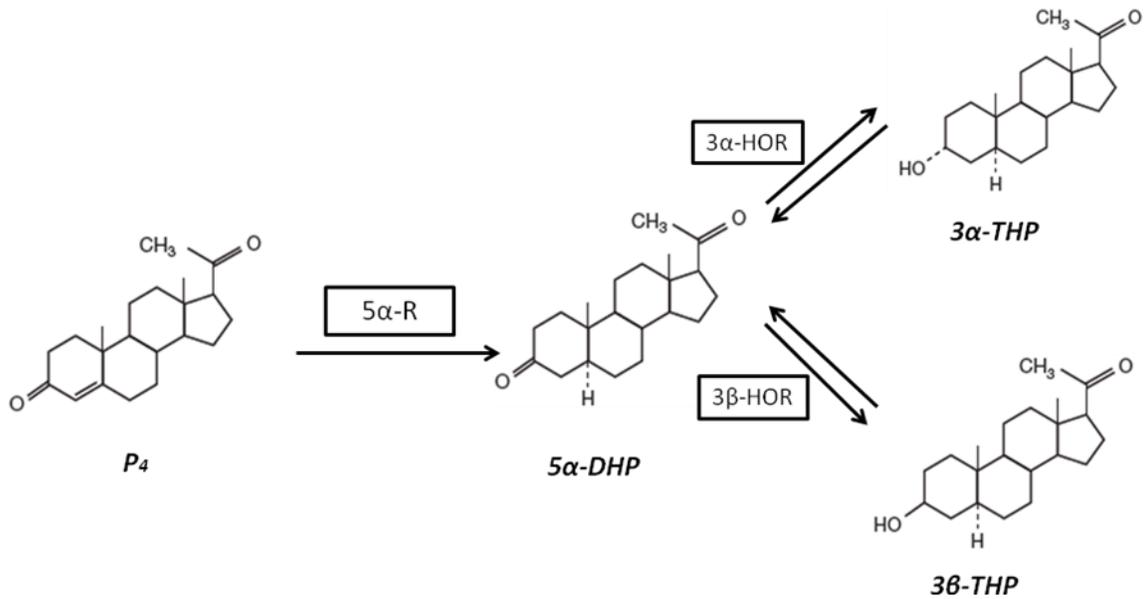


Figura 3. Síntesis de la 3 α -THP. La enzima 5 α -Reductasa (5 α -R) cataliza la conversión de P₄ a 5 α -DHP, mientras que la 3 α -hidroxiesteroide oxidorreductasa (3 α -HOR; también llamada 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa) cataliza la conversión de 5 α -DHP a 3 α -THP (alopregnanolona) y la 3 β -hidroxiesteroide oxidorreductasa (3 β -HOR) cataliza la conversión de 5 α -DHP a 3 β -THP (3 β ,5 α -tetrahydroprogesterona o pregnanolona) (Schumacher *et al.*, 2010).

El proceso metabólico de la P₄ tiene gran impacto sobre la acción de sus metabolitos en el SNC. Solo la P₄ y la 5 α -DHP son capaces de unirse al receptor a P₄ (RP) para activar el mecanismo clásico o genómico de la P₄, mientras que la 3 α -THP es un modulador alostérico del receptor GABA_A. La 3 β -THP no se une directamente al receptor de GABA_A pero es capaz de antagonizar el efecto que la 3 α -THP ejerce sobre ese receptor (Shüle *et al.*, 2014). La 3 α -THP es sintetizada en respuesta al estrés y desempeña un papel importante en la regulación de la función del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) (Evans, 2012).

En la línea celular C6 derivada de un glioma de rata, se determinó que el estradiol, otra hormona sexual, suprime la expresión génica de la 5 α -R así como la síntesis de DHP y de THP (Maayan *et al.*, 2004). Esto muestra que son varias las hormonas sexuales involucradas en la regulación del metabolismo de la P₄ a

nivel de SNC y que las diferentes fluctuaciones de éstas a lo largo de los ciclos reproductivos influye en los niveles de neuroesteroides sintetizados *de novo* por las células gliales y neuronales.

3.2.3 Mecanismos de acción de la 3 α -THP

La 3 α -THP ha sido ampliamente estudiada debido a que induce la generación y sobrevivencia de diversos tipos celulares tanto en el SNC como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Los principales mecanismos que se han identificado como responsables de sus efectos neuroprotectores y que, a su vez, podrían estar relacionados con mecanismos utilizados por las células tumorales para proliferar, son dos: uno a través de la modulación alostérica que ejerce la 3 α -THP sobre receptores GABA_A en neuronas maduras y células progenitoras neurales y su unión a mPRs que se ha estudiado principalmente en células gliales (Schumacher *et al.*, 2013).

En células progenitoras neurales y en células progenitoras de oligodendrocitos la 3 α -THP induce proliferación a partir de la activación de la vía de regeneración mediada por el receptor GABA_A (Wang *et al.*, 2005; Brinton, 2013). Los receptores GABA_A se encuentran en la membrana postsináptica y contienen un canal de iones cloruro (Cl⁻) que se activa en presencia del neurotransmisor inhibitorio GABA (Fox, 2014). La 3 α -THP induce la potenciación y activación del receptor GABA_A a partir de su unión con un sitio transmembranal (Brinton, 2013).

En neuronas maduras, la activación del receptor GABA_A induce un cambio conformacional provocando la apertura del canal de Cl⁻ lo cual aumenta la entrada de éste y, por lo tanto, la hiperpolarización de la membrana, reduciendo la excitabilidad neuronal (Fox, 2014); en células troncales neurales la activación del receptor GABA_A induce la despolarización de la célula. En dichas células, la expresión del cotransportador SLC12A2 provoca una elevación del Cl⁻ intracelular con respecto al exterior de la célula, debido a ello, la activación del receptor GABA_A provoca la salida de Cl⁻ provocando la despolarización de la membrana y la activación del canal de Ca²⁺ tipo L dependiente de voltaje (**Figura 4**).

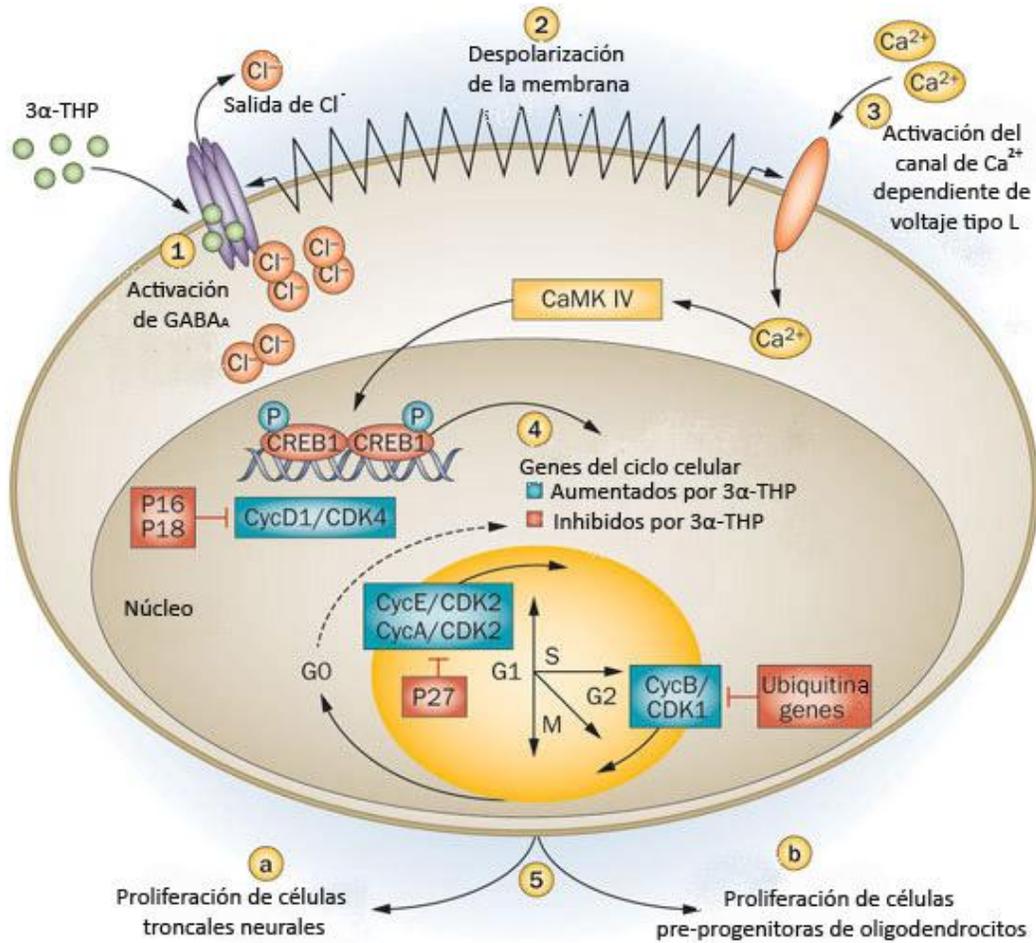


Figura 4. Mecanismo de mitosis inducido por 3α-THP en células troncales neurales y en células pre-progenitoras de oligodendrocitos. La 3α-THP se une al receptor GABA_A; debido a su carácter hidrofóbico, esta unión ocurre a nivel intermembranar. Debido a la expresión del cotransportador SLC12A2 en células progenitoras neurales la concentración de Cl⁻ es más elevada en el interior que en el exterior de la célula por lo que al ocurrir la activación de GABA_A ocurre la salida de dicho ión (1). El eflujo de Cl⁻ del interior de la célula provoca la despolarización de la membrana (2). La salida de iones cargados negativamente y la despolarización de la membrana resultan en la activación de canales de calcio (Ca²⁺) tipo L dependientes de voltaje (3). El aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular activa a la cinasa dependiente de Ca²⁺, CaMK IV, que activa mediante fosforilación al factor de transcripción CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1, por sus siglas en inglés); a través de la activación de CREB1 la 3α-THP aumenta la expresión de genes del ciclo celular necesarios para la transición de la fase G0 a S y M (4). De manera simultánea la 3α-THP regula negativamente la expresión de genes que reprimen la división celular como los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p16 y p18 así como las ubiquitinas. La adecuada transición a través del ciclo celular permite la proliferación de las células troncales neurales en la zona subgranular del giro dentado y de las células pre-progenitoras de oligodendrocitos en la materia blanca (5)(Modificado de Brinton, 2013).

A nivel de la membrana plasmática, tanto la P₄ como la 3α-THP pueden ejercer diversos efectos sobre la inhibición de la apoptosis a través de mPR que están acoplados a proteínas G. Este tipo de receptores solo están presentes en

vertebrados. Se han identificado cinco receptores: mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ y mPR ϵ . Los mPR δ y mPR ϵ activan a proteínas de tipo G estimuladoras (Gs) mientras que los mPR α , mPR β , mPR γ activan proteínas de tipo G inhibitorias (Gi). Estudios recientes han demostrado que estos receptores están altamente distribuidos en el cerebro y que la 3 α -THP es capaz de unirse al mPR δ y a otros mPRs actuando como agonista, activando segundos mensajeros y provocando un decremento en la muerte por apoptosis en células transfectadas con mPR δ y en neuronas hipocampales a concentraciones de orden nanomolar (Pang *et al.*, 2013). Asimismo, la 3 α -THP es un ligando muy efectivo para el mPR α recombinante ya que tiene una afinidad de unión relativa 7.6% mayor que la P₄ por el mismo receptor (Thomas y Pang, 2012).

También se ha visto que la 3 α -THP incrementa la proliferación en forma dosis-dependiente de células neuroprogenitoras de hipocampo de ratón así como de células progenitoras neurales humanas derivadas de la corteza cerebral. Es interesante observar que dicho efecto es dependiente de la estructura del metabolito ya que otros, como la epipregnanolona (5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona) o la epialopregnanolona (5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona), no ejercen el mismo efecto que la 3 α -THP (Wang *et al.*, 2005).

Mediante microarreglos en las células neuroprogenitoras de hipocampo de ratón, se observó que la 3 α -THP (500 nM), después de 24 h de tratamiento, regula la expresión de genes que promueven el ciclo celular tales como la ciclina E (necesaria para la progresión de la fase G₀ a S del ciclo celular), la Cdk1 y ciclina B (promotores de la fase M) así como el marcador de proliferación celular PCNA; de igual forma, el tratamiento con 3 α -THP provocó el decremento de inhibidores del ciclo celular Cdk6, p16 y p18 (Wang *et al.*, 2005).

3.3 Inhibidores de la síntesis de 3 α -THP

3.3.1 Generalidades

En la actualidad para determinar si los efectos de la P₄ se deben a la acción de la hormona *per se* o de sus metabolitos, se emplean compuestos inhibidores de la

enzima 5 α -R, misma que se encarga de reducir el doble enlace en la posición 4-5 de diversos esteroides de 19 y 21 carbonos tales como los corticosteroides y la testosterona. Como ya se mencionó, dicha enzima constituye el paso limitante del metabolismo de la P₄ (Schmidt *et al.*, 2011). Una de las ventajas de éstos es que permiten la inhibición de la 5 α -R con fármacos de poca o nula afinidad por receptores hormonales como el RP o los receptores a andrógenos (Azzouni *et al.*, 2012).

Se han detectado tres isoformas de la 5 α -reductasa en diferentes mamíferos (ratones, ratas, monos y humanos): la I (5 α -RI) que se encuentra expresada predominantemente en el SNC, la II (5 α -RII) que se encuentra de forma más restringida en próstata, vesícula seminal y epidídimo (Finn *et al.*, 2006) y la III (5 α -RIII) que también se encuentra distribuida a lo largo del todo el SNC y a lo largo de todas las etapas de desarrollo (Azzouni *et al.*, 2012).

En humanos estas enzimas son codificadas por la familia de genes SRD5A: los genes SRD5A1 y SRD5A2 codifican para las isoenzimas 5 α -RI y 5 α -RII respectivamente. A pesar de que existen otros dos genes con el mismo acrónimo: SRD5A3 (gen que codifica para la 5 α -RIII) y SRD5A2L2, sus productos proteínicos no poseen la habilidad de metabolizar esteroides y aún se sabe poco de ellos (Stiles y Russell, 2011).

Las 5 α -RI y 5 α -RII están compuestas por 260 y 256 aminoácidos respectivamente y tienen una identidad de secuencia del 47%; a pesar de que poseen la misma función, tienen propiedades diferentes y sus genes están localizados en diferentes cromosomas: la 5 α -RI tiene un pH óptimo cercano al neutro y el gen que codifica para ésta se encuentra en el cromosoma 5, mientras que el pH óptimo de la 5 α -RII es ácido y el gen que codifica para dicha isoforma se encuentra en el cromosoma 2 (Oliveira *et al.*, 2008; Azzouni *et al.*, 2012). El papel de la 5 α -RIII en la reducción de esteroides aún resulta controversial. Hay estudios en los cuales se sugiere que ésta participa en la reducción de esteroides (Celotti *et al.*, 1992; Titus *et al.*, 2014), efecto que no es bloqueado por inhibidores como la finasterida (F) y la dutasterida -fármacos de los que se hablará más adelante- (Titus M. *et al.*, 2014); existen otros estudios en los que se ha visto que

dicha enzima es crucial en la glicosilación de proteínas y no en la reducción de esteroides (Stiles y Russell, 2010; Cantagrel *et al.*, 2010).

Los inhibidores de la 5 α -R son clasificados en dos grandes grupos: los esteroideos y los no esteroideos, de los cuales, el grupo más amplio y más estudiado son los fármacos de tipo esteroideo (Azzouni *et al.*, 2012):

❖ *Inhibidores no esteroideos*

Este tipo de inhibidores ha sido diseñado para uso en la clínica con el fin de evitar los efectos secundarios que conlleva el uso de derivados esteroideos. Dentro de este grupo se incluye a los inhibidores selectivos más potentes de la 5 α -RI, mismos que se clasifican de acuerdo a su estructura química en: benzoquinolonas -como el LY 191704-, derivados del ácido butanoíco -como el ONO-3805-, ácidos arílicos no esteroideos, ácidos grasos insaturados, cationes como el zinc, entre otros (**Figura 5**). Todos fueron diseñados como inhibidores competitivos de la 5 α -R (Aggarwal *et al.*, 2010).

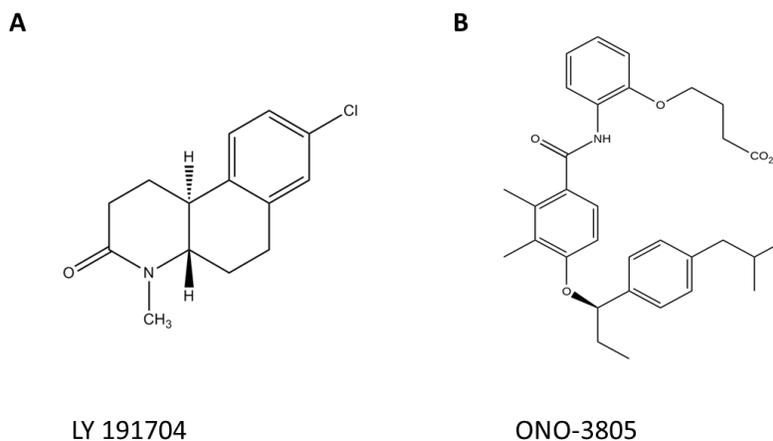


Figura 5. Ejemplos de inhibidores no esteroideos de la 5 α -R. **A** El bexlosteride o LY 191704 es el compuesto más activo dentro de la familia de las benzoquinolonas ($IC_{50}=8$ nM); las benzoquinolonas son compuestos tricíclicos derivados de los 4-azasteroides a partir de la remoción de un anillo, la potencia contra la 5 α -RI aumenta con la sustitución de un grupo halógeno (F, Br y Cl). **B** El ONO-3805 es un derivado del ácido butanoíco selectivo para la 5 α -R, los miembros de esta familia contienen grupos aromáticos (generalmente benzeno o indol).

❖ Inhibidores esteroideos

Los inhibidores esteroideos más ampliamente estudiados son los 4-azasteroides entre los que se encuentran la F y la dutasterida (**Figura 6**), en general, todos los de esta familia son inhibidores potentes de la 5 α -RI. Los 6-azasteroides y los 10-azasteroides son inhibidores competitivos de la 5 α -RI y la 5 α -RII. Otros inhibidores son los esteres de progesterona (Aggarwal *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2011).

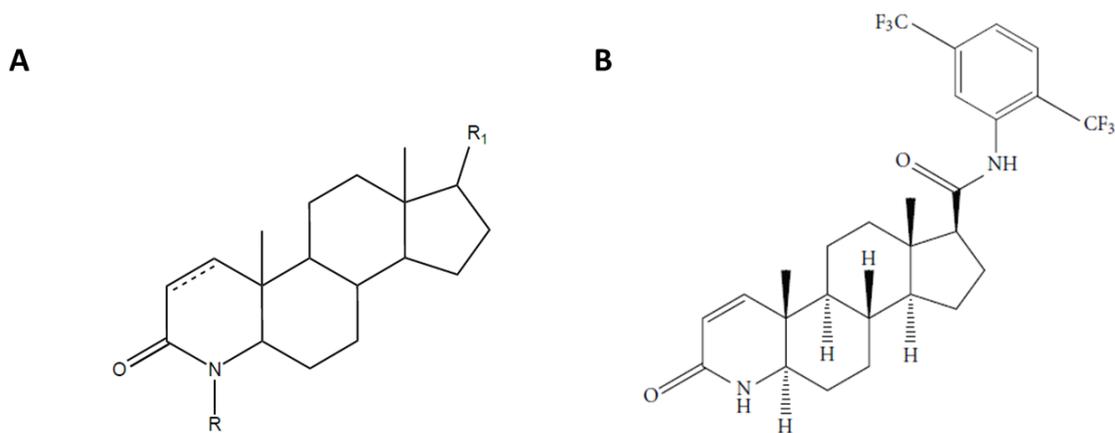


Figura 6. Estructura base de los 4-azasteroides (A) y estructura química de la dutasterida (B).

La 5 α -R requiere de la unión del NADPH a la enzima y luego al sustrato para llevar a cabo su catálisis: el enlace Δ 4,5 del sustrato se rompe y un anión proveniente del NADPH se une al C-5 en la posición α debido a la unión de un protón en la posición β del C-4 produciendo un complejo enzima-NADP⁺ que finalmente deja libre a la enzima. Con base en lo anterior, la inhibición de dicha enzima puede ser (Schmidt *et al.*, 2011):

- Competitiva con el cofactor NADPH y el sustrato: el inhibidor se une a la enzima libre sin que la enzima se una previamente con el NADPH.
- Competitiva con el sustrato: El inhibidor se une al complejo NADPH-enzima.

- No competitiva con el complejo NADP^+ -enzima: una vez formado el producto de la catálisis de la enzima, éste forma un complejo estable con la enzima impidiendo que esta quede libre para iniciar un nuevo ciclo de catálisis (Azzouni *et al.*, 2011).

3.3.2 Características de la Finasterida (F)

La F es un fármaco que pertenece al grupo de los 17β -sustituídos-4-azasteroides. Tiene un peso molecular de 372.54 g/mol y es una de las moléculas más ampliamente estudiadas dentro de los inhibidores de la 5α -R de carácter esteroide (**Figura 7**). Dicho compuesto actúa como un sustrato alternativo de la 5α -RII formando un complejo enzima-sustrato altamente estable: enzima-NADP-dihidrofinasterida, que tiene una constante de inhibición $K_i \leq 1 \times 10^{-13}$ M, de ahí que la F constituya uno de los inhibidores más potentes que se conozcan sin que éste se una de manera covalente a la enzima. Por otro lado, la inhibición de la 5α -RI por la F ocurre por el mismo mecanismo que en el caso de la 5α -RII, aunque con una constante de inhibición mucho menor (Schmidt *et al.*, 2011).

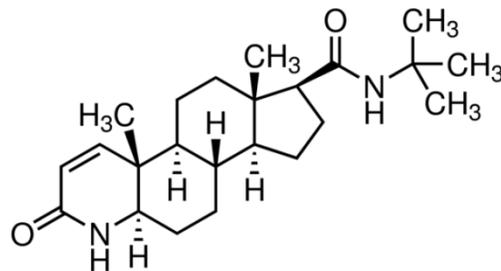


Figura 7. Estructura química de la Finasterida (F).

Ya que la enzima 5α -R participa en el metabolismo de la P_4 , corticosteroides y andrógenos, la F ha sido empleada en el tratamiento de enfermedades como hiperplasia prostática benigna y alopecia en varones, debido a que bloquea la

conversión de testosterona en dihidrotestosterona, el principal metabolito de los andrógenos (Finn *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado que también inhibe la síntesis de esteroides como la P_4 y la testosterona (Caruso *et al.*, 2015) en el cerebro y que también puede inducir vías metabólicas alternativas a las correspondientes al metabolismo de la P_4 , tales como 3α -reducción, 20α -reducción y 21-hidroxilación (Mladenovic *et al.*, 2014); de ahí que sea muy útil como herramienta en investigación básica.

En estudios preclínicos ha sido empleada para examinar la relación entre los cambios en los niveles de esteroides neuroactivos GABAérgicos y comportamientos relacionados con la ansiedad, los síntomas de depresión, susceptibilidad a convulsiones, aspectos de la conducta sexual y ciertos comportamientos relacionados con el alcohol (Finn *et al.*, 2006).

3.4 Papel de la 3α -THP en diferentes tipos de cáncer

Se han empleado diversas líneas celulares derivadas de gliomas como modelos *in vitro* de enfermedades degenerativas y trastornos mentales relacionados con cambios en los niveles de neuroesteroides y para el estudio del metabolismo esteroidogénico de células gliales y neuronales, pero nunca como un modelo para evaluar el papel de los metabolitos de la P_4 en gliomas. En líneas celulares de cáncer de mama se ha empezado a estudiar el papel que tienen los metabolitos de la P_4 sobre el desarrollo tumoral, aunque no propiamente de la 3α -THP (Wiebe *et al.*, 2005).

Se ha observado que la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama es mayor en quienes han sido operadas durante la fase lútea del ciclo menstrual (fase en la que ocurre el mayor pico de P_4 y de 3α -THP) que cuando fueron operadas durante la fase folicular. De ahí que haya surgido la necesidad de estudiar los efectos de los metabolitos de esta hormona y su papel en el desarrollo del cáncer (Wiebe *et al.*, 2005). Hasta el momento se sabe que la P_4 puede metabolizarse en dos tipos de compuestos: aquellos que estimulan y los que inhiben la proliferación celular y la tumorigénesis. A pesar de que los

metabolitos de la P_4 están presentes en el tejido normal y tumoral de mama, se encuentran en diferentes concentraciones: en el tejido normal es mayor la concentración de derivados tipo 4-pregnenos que de 5α -pregnanos (como la 3α -THP) mientras que en el tejido tumoral es mayor la concentración de 5α -pregnanos que de 4-pregnenos (Wiebe *et al.*, 2000; 2013), de ahí la hipótesis de que éstos son importantes en los procesos de crecimiento y diferenciación celular.

En una línea celular tumoral de neuronas NT2, derivadas de un teratocarcinoma y utilizadas en un estudio como un modelo de daño cerebral, se observó que al ser pretratadas con 3α -THP (0-10 μ M), seguida de N-metil-d-aspartato (NMDA) para inducir apoptosis y necrosis, se demostró que la 3α -THP disminuía el porcentaje de células TUNEL-positivas, lo cual sugiere que dicho metabolito actúa como un agente protector ante estímulos de muerte en este tipo de células tumorales (Lockhart *et al.*, 2002).

Dentro de las líneas celulares derivadas de gliomas que han sido empleadas en investigación para determinar la influencia de los metabolitos de la P_4 como modelos de diversas enfermedades se encuentran las células C6 derivadas de un glioma de rata. Éstas han sido utilizadas ampliamente en el estudio del metabolismo de neuroesteroides en células gliales debido a que presentan la ventaja de poseer un fenotipo homogéneo. En estas células se ha visto que las condiciones de cultivo celular influyen en la inmunorreactividad que presenta la línea para la 5α -R; el cultivo con un medio no suplementado con suero parece aumentar la inmunorreactividad de la 5α -R pero no su expresión génica (Morita *et al.*, 1999). Debido a lo anterior es necesario determinar qué factores pueden modificar su abundancia y activación en células del SNC.

Se sabe que las sustancias secretadas por neuronas en cultivo pueden estimular a la 5α -R y a la 3α -HOR en astrocitos y que en células gliales, la 5α -R es estimulada por AMPc. Se ha visto que en la línea celular C6 y en la 1321N1 derivada de un astrocitoma humano grado II, el sustrato preferencial de la 5α -RI es la P_4 y no la testosterona. En las células C6 se aumentó la formación de DHP y de 3α -THP cuando éstas fueron tratadas con el medio de cultivo de neuronas fetales de rata mientras que el medio con el que fueron incubadas las células C6 y

las 1321N1 provocó un decremento en la formación de DHP en astrocitos tipo 1 (Melcangi *et al.*, 1998).

Lo anterior muestra que el microambiente celular influye en la síntesis de neuroesteroides en forma diferente para cada tipo celular, sea tumoral o no. Los productos liberados al medio por las neuronas podrían actuar en las células C6 activando vías de señalización mediadas por AMPc; se sabe que altos niveles de AMPc provocan la activación de la 5 α -RI y aumentan la expresión de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), ésta es una proteína de filamentos intermedios relacionada con el control del crecimiento y diferenciación de astrocitos por lo que altos niveles de AMPc podrían relacionarse con modificaciones en la morfología y función de las células gliales (Melcangi *et al.*, 1998).

También se ha visto que la P4 y sus metabolitos 5 α -reducidos como la DHP podrían estar relacionados con la expresión génica del GFAP, misma que se inhibe con tratamientos de F lo cual indicaría que la 5 α -R, o bien, los metabolitos 5 α -reducidos, pueden estar implicados en la regulación de la expresión génica de GFAP (Morita *et al.*, 2006).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que la P₄ es un agente promotor del crecimiento tumoral debido a su capacidad de inducir la expresión de genes que promueven el ciclo celular en diversos tipos de cáncer, como el de mama y los astrocitomas de grado IV. En la actualidad, se sabe que los astrocitos expresan las enzimas necesarias para la conversión de P₄ a 3 α -THP y que dicho metabolito, capaz de producirse a nivel cerebral, está implicado en diversos estados fisiológicos y patológicos del SNC que podrían estar relacionados con la protección frente a daño celular, crecimiento y diferenciación celular, sin embargo, se desconocen los efectos de dicho metabolito en el crecimiento de astrocitomas de grado IV y en particular, en la línea celular U87.

5. HIPÓTESIS

- ✚ Si la α -THP es un inductor de la proliferación en las gliomas, entonces se espera que el tratamiento con ésta aumente la proliferación de las células U87 derivadas de un glioma humano de grado IV.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Conocer el efecto de la 3α -THP sobre el crecimiento de la línea celular U87 derivada de un glioma humano de grado IV.

6.2 Objetivos particulares

- Determinar la dosis de 3α -THP que tiene un mayor efecto sobre el número de células U87.
- Conocer el efecto de la 3α -THP sobre la proliferación de las células U87.
- Evaluar el efecto de un inhibidor de la síntesis de 3α -THP (finasterida, F) sobre la proliferación de las células U87.

7. METODOLOGÍA

7.1. Cultivo celular

La línea celular U87, derivada de un glioma humano grado IV, se cultivó en medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM) con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato (1 mM) y aminoácidos no esenciales, en condiciones de CO₂ al 5% y a 37°C.

El medio se cambió regularmente (cada 48 horas) hasta obtener una confluencia de 70-80%. Una vez obtenida la confluencia se contó el número de células en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocaron 10,000 por pozo en cajas de 24 pozos con 1 mL de medio DMEM con rojo fenol adicionado

con SFB al 10%, piruvato 1mM y aminoácidos no esenciales durante 24 h. Antes de colocar los tratamientos descritos en la sección de *conteo celular*, el medio fue cambiado por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas y las células se incubaron durante 24 h en las condiciones ya mencionadas.

7.2 Conteo celular

Para la determinación de la concentración de 3 α -THP con mayor efecto sobre el número de células se realizó una curva concentración-respuesta a partir de los cultivos en cajas de 24 pozos con 10,000 células en las condiciones previamente mencionadas. Los cultivos se trataron el día 0 de cada experimento con 3 α -THP (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) o con vehículo (DMSO a una concentración máxima de 0.01% en el medio). El conteo se realizó en una cámara de Neubauer durante 6 días a partir del día 0 para determinar el efecto de la 3 α -THP sobre el número de células empleando azul de tripano, un colorante vital que tiñe a las células muertas de color azul debido a que atraviesa su membrana. Al momento del conteo, se reemplazó el medio de los pozos por 1 mL de PBS-EDTA durante 10 min, posteriormente se adicionaron 20 μ L de azul de tripano a cada pozo y se despegaron las células.

Para la determinación del efecto de la F sobre el número de células U87 se realizó una curva concentración-respuesta a partir de cultivos de 5,000 células U87 en cajas de 24 pozos en las condiciones previamente mencionadas. Los cultivos se trataron el día 0 de cada experimento con 3 α -THP (1 nM), P₄ (10 nM), F (100 nM), P₄+F o vehículo (DMSO a una concentración máxima de 0.01% en el medio). El conteo se realizó de la manera anteriormente descrita.

7.3 Cálculo de la viabilidad celular

Las gráficas del porcentaje de viabilidad se obtuvieron a partir de la sumatoria de las células viables y no viables de cada tratamiento contabilizadas durante cada

día que duró el experimento. A partir de los datos anteriores se obtuvo el porcentaje de células viables para cada uno de los experimentos y se graficó en función de los días de tratamiento.

7.4 Incorporación de BrdU

Para la determinación del efecto de la 3 α -THP sobre la proliferación de las células U87 se empleó la técnica de incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) que se fundamenta en la incorporación de dicho compuesto, un análogo de la timidina, al DNA en el momento de su replicación, proceso que ocurre únicamente durante la fase S del ciclo celular. Inicialmente se sembraron 5000 células por cada pozo de los portaobjetos con cuatro compartimentos con 300 μ L del medio con rojo fenol descrito previamente en la sección del cultivo celular.

24 horas antes de colocar los tratamientos de vehículo, 3 α -THP 1 nM, F 100 nM, P₄ 10 nM y P₄+F, se cambió el medio por 500 μ L de DMEM sin rojo fenol y sin hormonas. Los tratamientos se mantuvieron durante 3 días.

El día 3 se quitaron los tratamientos y se inició el ensayo empleando el kit de Roche para el marcaje y detección de BrdU de acuerdo a la metodología recomendada por el fabricante. Las células fueron incubadas durante 40 min con el medio DMEM sin rojo fenol, sin hormonas y adicionado con BrdU.

Adicionalmente, se empleó el colorante Hoechst para la tinción de todos los núcleos sin importar si éstos incorporaron BrdU o no. Para ello se incubó durante 7 minutos con una solución de 1 μ g/mL de Hoechst 33 342 a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Se montó la muestra con una gota de Antifade (Molecular Probes) por cada dos pozos y se guardó en oscuridad a 4°C antes de observar las muestras en el microscopio de fluorescencia.

La incorporación de BrdU se observó en color verde a un rango de excitación de 450-500 nm y de detección de 515-565 nm. La tinción con Hoechst en color azul a una excitación de 361 nm y a una emisión de 486 nm con el microscopio Olympus Bx43F (Olympus, PA, EU).

El conteo de las células BrdU-positivas y negativas se realizó con el software ImageJ 1.455 (National Institutes of Health, EU). El porcentaje de incorporación de BrdU se obtuvo del promedio de las células que incorporaron BrdU con respecto a las que no lo hicieron considerando por lo menos 3 campos representativos de cada tratamiento.

7.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado para todos los experimentos realizados fue una ANOVA de una sola vía seguido de una prueba Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 Efectos de la 3 α -THP sobre el crecimiento de la línea celular U87

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la 3 α -THP sobre el crecimiento y la proliferación de la línea celular U87 derivada de un glioma humano de grado IV. Inicialmente se realizaron experimentos para determinar el efecto de la 3 α -THP sobre dichas células y para establecer qué concentración ejercía el mayor efecto. Las concentraciones empleadas fueron 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M.

En la **Figura 8** se observa un aumento significativo en el número de células U87 tratadas con 3 α -THP a las concentraciones de 1 nM, 10 nM y 1 μ M con respecto al control a partir del día 1 de tratamiento y hasta el día 5 de cultivo; a la concentración de 100 nM no se observó ninguna diferencia significativa en comparación con el control.

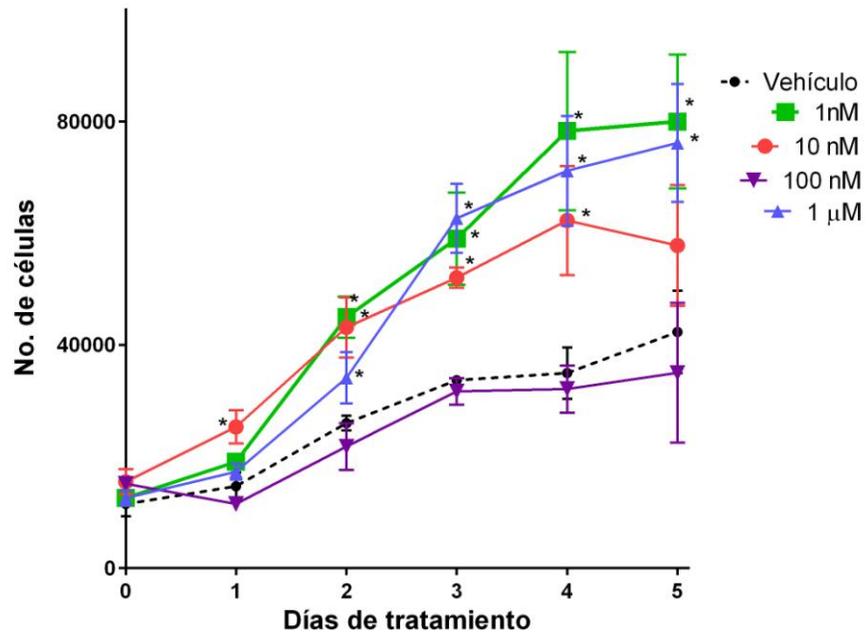


Figura 8. Efectos de la 3 α -THP sobre el número de células U87. Resultados del conteo de células U87 a diferentes concentraciones durante 5 días. A las concentraciones 1 nM, 10 nM y 1 μ M aumentó significativamente el número de células con respecto al control. Cada punto representa la media \pm E.S, n=4. *p < 0.05 vs vehículo.

En la **Figura 9** se observa que la viabilidad de las células U87 se mantuvo constante en todas las concentraciones a lo largo de los 5 días de cultivo con respecto al control.

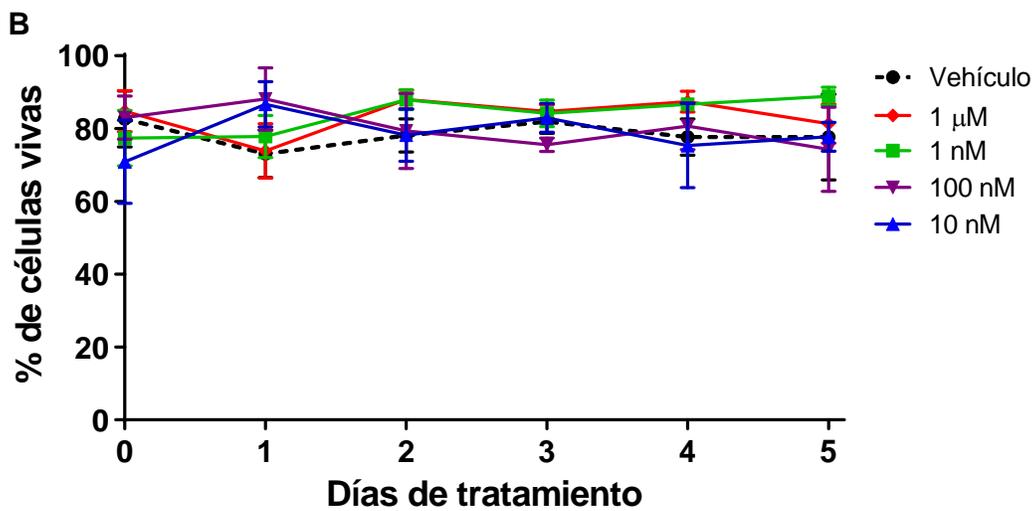


Figura 9. Efectos de la 3 α -THP sobre la viabilidad de las células U87. Cada punto representa la media \pm E.E. con n=4.

A partir de los resultados anteriores se seleccionó la dosis de 1 nM de 3 α -THP para determinar si el efecto de ésta puede inhibirse al bloquear la formación de 3 α -THP a partir de la P₄. Así, se emplearon tratamientos de P₄ 10 nM, F 100 nM y el tratamiento conjunto de P₄+F.

En la **Figura 10** puede observarse que la 3 α -THP tiene un efecto inductor del crecimiento de las células U87 —similar al observado con el tratamiento de P₄— con respecto al vehículo. Sin embargo, a diferencia del tratamiento de P₄, que aumenta el crecimiento celular en forma significativa a partir del día 3, la 3 α -THP lo hace a partir del día 2. La F por sí sola no tuvo un efecto inductor del crecimiento celular ya que no presenta diferencias con respecto al vehículo, sin embargo, bloqueó el efecto de la P₄, como se observa en el tratamiento conjunto, cuyo comportamiento es similar al del vehículo.

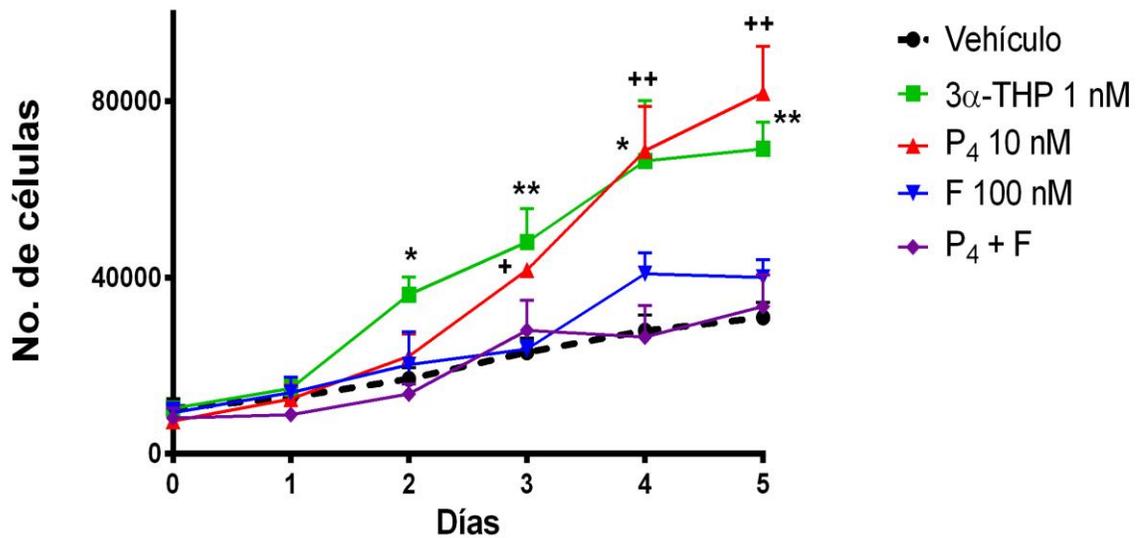


Figura 10. Efecto de la 3 α -THP, P₄, F y P₄+F sobre el crecimiento de las células U87. Resultado del conteo durante 5 días en los que se mantuvieron los tratamientos. Cada punto representa la media \pm E.S, n=7 para los tratamientos con 3 α -THP y vehículo y n=4 para los demás tratamientos. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. *p<0.05 3 α -THP vs. vehículo y P₄+F; **p<0.05 3 α -THP vs. vehículo, F y P₄+F; +p<0.05 P₄ vs. vehículo y P₄+F; ++p<0.05 P₄ vs. vehículo, F y P₄+F.

En la **Figura 11** se muestra que la viabilidad de las células no se modifica en forma significativa con ninguno de los tratamientos a lo largo del tiempo en el que se mantuvieron los experimentos.

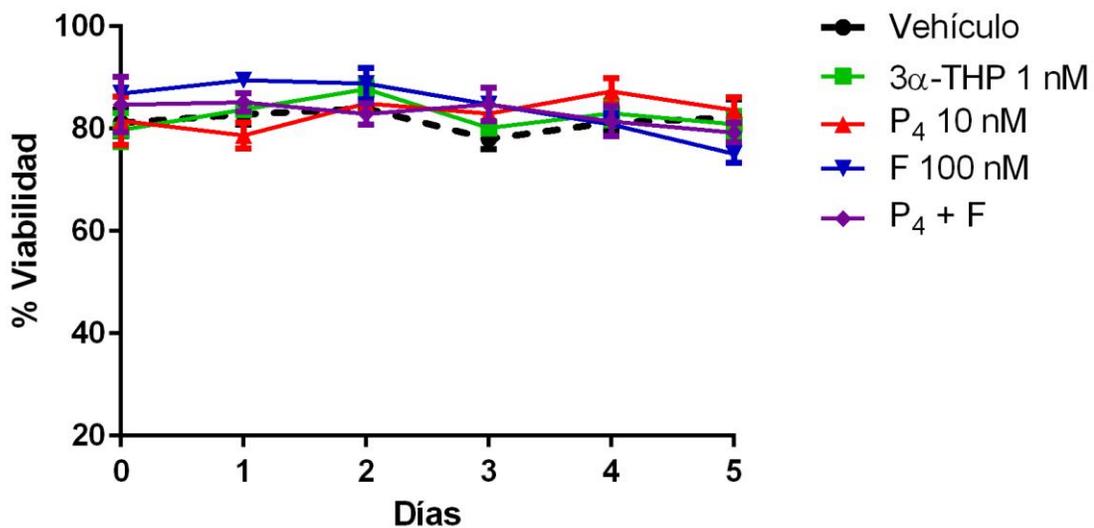


Figura 11. Efectos de 3 α -THP, P₄, F y P₄ + F sobre la viabilidad de las células U87. Resultados obtenidos de la cuantificación de células U87. La viabilidad se mantiene constante a lo largo de los días de tratamiento para todas las concentraciones. Cada punto representa la media \pm E.S con una n=7 para los tratamientos con 3 α -THP y vehículo y n=4 para los demás tratamientos.

A partir de los resultados observados en la **Figura 10**, se pudo establecer que el mejor día de tratamiento para realizar los ensayos de incorporación de BrdU era el día 3 debido a que en éste se observó el aumento del crecimiento celular en forma significativa tanto con el tratamiento de 3 α -THP como con la P₄.

En la **Figura 12** se muestra el porcentaje y las imágenes representativas de los ensayos de incorporación de BrdU. La 3 α -THP tuvo un efecto inductor de la proliferación celular de manera similar al de la P₄ -efecto que ha sido previamente determinado en nuestro grupo de investigación en otra línea celular derivada de un glioma humano de grado III (U373)-. De manera interesante, en estos estudios, la F inhibió en forma total el efecto de la P₄, como se aprecia en el tratamiento de P₄+F. Por otra parte, a F no ejerció ningún efecto significativo.

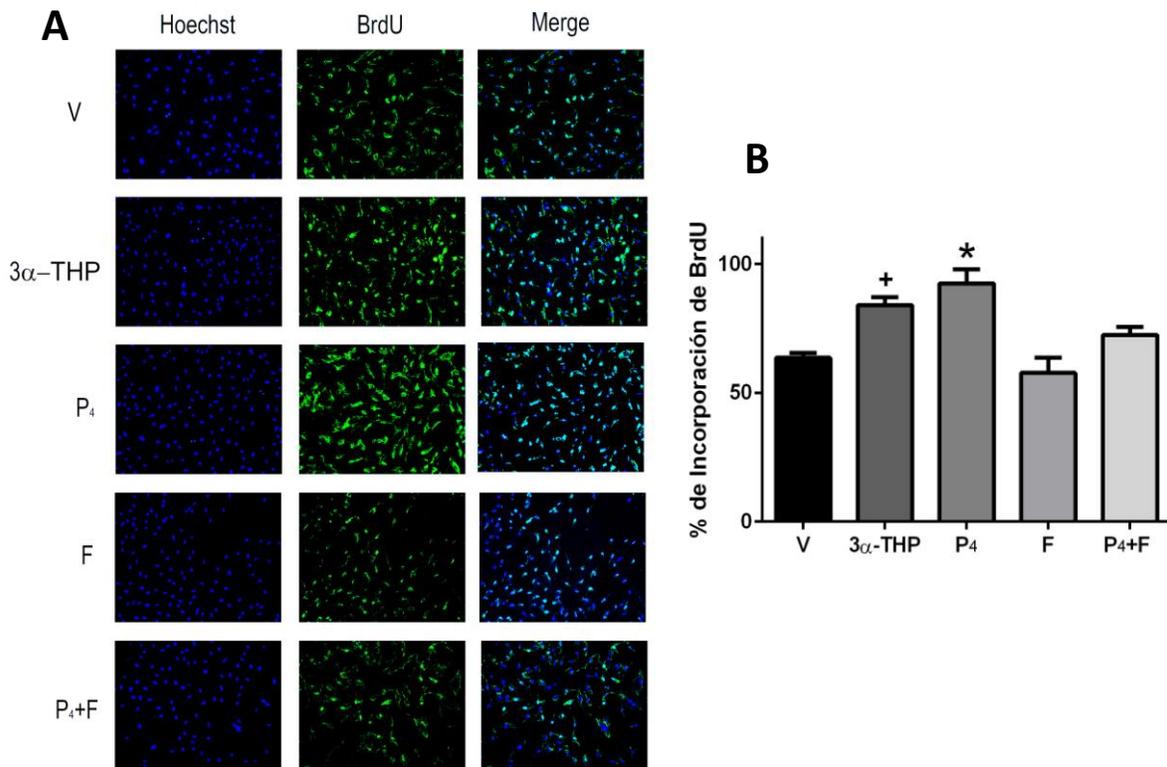


Figura 12. A Incorporación de BrdU en las células U87 con DMSO 0.01% (V), alopregnanolona 1 nM (3 α -THP), progesterona 10 nM (P₄), finasterida 100 nM (F) y el tratamiento conjunto (P₄+F) al tercer día del experimento. Se muestran los núcleos teñidos con Hoechst (azul), la incorporación de BrdU a nivel nuclear (verde) y la colocalización de BrdU y Hoechst (turquesa). **B** Porcentaje de incorporación de BrdU. Cada barra expresa la media \pm E.S., n=3 para P₄; n=5 para C, F y P₄+F; n=6 para 3 α -THP. + p<0.05 3 α -THP ó *P₄ vs. V y F. El análisis estadístico realizado fue ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Tukey.

9. DISCUSIÓN

La P₄ y sus metabolitos, en especial la 3 α -THP son fundamentales para el desarrollo y funcionamiento adecuado del SNC. Éstos regulan la proliferación, diferenciación y comunicación de diversos tipos celulares a partir de mecanismos muy variados dependiendo del tipo de células y de la concentración del compuesto. Como se observa en la **Figura 8**, la concentración de 3 α -THP con mayor efecto inductor del crecimiento celular fue 1 nM. También puede

observarse que con 3 α -THP (1 μ M) hay un aumento significativo en el número de células con respecto al vehículo.

Resultó interesante observar que la concentración más baja y la más alta de 3 α -THP (1 nM y 1 μ M) tuvieron un mayor efecto que las concentraciones intermedias evaluadas. Por lo anterior, es importante mencionar que los efectos de la P₄ y de sus metabolitos implican varios mecanismos de acción y que la capacidad de activar uno u otro depende, entre otros factores, de la afinidad de dichos compuestos hacia sus receptores, así como de la concentración de éstos en el medio de cultivo a lo largo de los días de tratamiento (Melcangi *et al.*, 2014).

En la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, se han realizado ensayos de afinidad de unión a relativa con respecto a la P₄. Particularmente, la 3 α -THP tiene una alta afinidad por el mPR δ (151 \pm 47 nM) y por el mPR α (404 \pm 73 nM) (Pang *et al.*, 2013), dichos receptores están acoplados a proteínas G_s y G_i respectivamente; ambas regulan positiva o negativamente la actividad de la Adenilato Ciclasa (Thomas y Pang, 2012). Lo anterior se traduce en la modulación de la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), un segundo mensajero crucial para la transducción de diversas señales que se traducen en efectos antiapoptóticos o proapoptóticos dependiendo de la concentración de 3 α -THP (Pang *et al.*, 2013), este mismo efecto ha sido observado en otros ensayos con la P₄ (González-Agüero *et al.*, 2007; Fahim Atif *et al.*, 2011)

En los siguientes experimentos (**Figura 10**), pudo observarse que la 3 α -THP promueve el crecimiento de las células U87 de una manera similar a lo que se ha observado con la P₄ en estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación (González Agüero *et al.*, 2007). Esto podría indicar que la 3 α -THP podría activar mecanismos que pueden o no estar ligados al mecanismo clásico o genómico de la P₄, mismo que es el más investigado hasta el momento debido a la activación de genes asociados a proliferación celular e inhibición de la apoptosis (Schumacher M., *et al.*, 2014).

Por otro lado, se observó que la F, por sí misma no ejerce un efecto sobre el crecimiento y la proliferación celular. Sin embargo, bloquea el crecimiento inducido por la P₄ (tratamiento conjunto de la **Figura 10**). Esto plantea la

posibilidad de que los metabolitos de dicha hormona participen en la regulación del crecimiento y la proliferación de la línea celular U87.

Como ya se mencionó, en otros tipos de cáncer, el metabolismo *in situ* de esta hormona puede llevar al tejido canceroso a proliferar e incluso aumentar su malignidad o a retardar el proceso tumorigénico. De ahí que cambios importantes en la expresión y en la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de compuestos como la dihidroprogesterona y la 3 α -THP sean fundamentales en el desarrollo tumoral de los gliomas.

Los experimentos de incorporación de BrdU (**Figura 12**) fueron realizados al tercer día de tratamiento debido a que al día 3 en los experimentos anteriores, tanto la 3 α -THP como la P₄ aumentaron el crecimiento celular en forma significativa. De ahí que se pudiera establecer mejor la comparación entre el efecto de la 3 α -THP con respecto al efecto de la P₄.

En los experimentos de incorporación de BrdU, la F disminuyó ligeramente el efecto de la P₄ –sin ser significativa esta disminución— (**Figura 12**). Por lo anterior, podría pensarse que hay otras enzimas implicadas en el metabolismo de la P₄ que dan origen a otros metabolitos capaces de inducir la proliferación celular y que el efecto ampliamente estudiado de la P₄ sobre la inducción de la proliferación en células derivadas de gliomas humanos, podría deberse no sólo a la hormona *per se*, sino a uno o varios de sus metabolitos.

A pesar de que no se hicieron estudios sobre el papel de la 3 α -THP sobre procesos de muerte celular, no se descarta la posibilidad de que este esteroide inhiba la muerte celular. Hasta el momento se ha estudiado el papel de la 3 α -THP en diversos modelos patológicos. Aunque los resultados de éstos no se han asociado a mecanismos que pudieran ser cruciales en el desarrollo o progresión de cáncer, se sabe que la 3 α -THP aumenta la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular -como las ciclinas E, B y la CDK1- y que disminuye la expresión de genes que inhiben el mismo -tales como p16, p18, CDK4 y CDK6- (Wang *et al.*, 2005). Como ya se mencionó, se ha reportado que la 3 α -THP funciona como un agonista de mPRs a concentraciones de orden nanomolar. de esta forma promueve la activación de segundos mensajeros y

disminuye la muerte celular (Guennoun *et al.*, 2015). En nuestro grupo de investigación se ha visto que las células derivadas de astrocitomas humanos expresan mPRs. Por lo anterior, podría pensarse que el efecto observado en el presente trabajo pudiera deberse a modificaciones en la expresión de estos mismos genes en la línea celular U87 así como del efecto antiapoptótico y protector que posee la 3 α -THP a través de señales moduladas por los mPRs.

Es necesario considerar que la 3 α -THP puede ser nuevamente convertida a 5 α -DHP debido a que en este proyecto no se silenció la expresión de la 3 α -HOR, una enzima no reguladora del metabolismo de la P₄ que podría catalizar la síntesis de 5 α -DHP a partir 3 α -THP (Schumacher *et al.*, 2010). La 5 α -DHP tiene como efector al RP, de manera que la 3 α -THP podría estar actuando indirectamente sobre dicho receptor.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó el efecto de la 3 α -THP sobre el crecimiento y la proliferación de las células U87. Dicho efecto se modifica de acuerdo a la concentración de 3 α -THP empleada; las concentraciones de 1 nM y 1 μ M son las más efectivas para aumentar el crecimiento celular mientras que la concentración de 100 nM no lo modifica.

Además, se pudo determinar que la F, fármaco inhibidor de la 5 α -R, bloquea el efecto de la P₄ sobre el crecimiento celular, por lo que se plantean nuevas investigaciones sobre el efecto y los mecanismos de acción de la 3 α -THP sobre los gliomas humanos.

11. REFERENCIAS

- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., Parada, L. F., *et al.* (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*, 15(1): 45–56.
- Atif, F., Sayeed, I., Yousuf, S., Ishrat, T., Hua, F., Wang, J., *et al.* Stein, D. G. (2011). Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: in vitro and in vivo evidence. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(9-10):1084–94.
- Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., Mohler, J. (2012). The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Advances in Urology*, 2012.
- Badash M (ed),(2009). Astrocitoma, New York University Medical Center DoN, *EBSCO publishing*: 1-4.
- Banks, J. A., Freeman, M. E. (1980). Inhibition of the Daily LH Release Mechanism by Progesterone Acting at the Hypothalamus. *Biology of Reproduction*, 22: 217-222.
- Barraclough C. A., Camp P., Weiland N., Akabori A. (1986). Stimulatory versus Inhibitory Effects of Progesterone on Estrogen-Induced Phasic LH and Prolactin Secretion Correlated with Estrogen Nuclear and Progesterone Cytosol Receptor Concentrations in Brain and Pituitary Gland. *Neuroendocrinology*, 42: 6-14.
- 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 Suppl*, 1 (12): S17-27.
- Brinton, R. D. (2013). Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(4): 241–50.
- 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.

- Camacho-Arroyo, I., González-Agüero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., & Ondarza, R. (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 49(1): 1–7.
- Cantagrel, V., Lefeber, D. J., Ng, B. G., Guan, Z., Silhavy, J. L., Bielas, S. L., et al., Gleeson, J. G. (2010). SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*, 142(2): 203–17.
- Caruso, D., Abbiati, F., Giatti, S., Romano, S., Fusco, L., Cavaletti, G., & Melcangi, R. C. (2015). Patients treated for male pattern hair with finasteride show, after discontinuation of the drug, altered levels of neuroactive steroids in cerebrospinal fluid and plasma. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 146C: 74–79.
- Celotti, F., Melcangi, R. C., & Martini, L. (1992). The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 13(2):163–215.
- Chen, Y.-H., & Gutmann, D. H. (2014). The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene*, 33(16): 2019–26.
- 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. *HARRISON, Principios de Medicina Interna*, 16 edn. México: McGraw-Hill / Interamericana de México. 2804-2820.
- Evans, J., Sun, Y., McGregor, A., Connor, B. (2012). Allopregnanolone regulates neurogenesis and depressive/anxiety-like behaviour in a social isolation rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology*, 63(8): 1315–26.
- Finn D, Beadles-Bohling A, Beckley E, Ford M, Gililand K, Gorin-Meyer R, Wiren K (2006). A New Look at the 5 α -Reductase Inhibitor Finasteride. *CNS Drug Rev*, 12(1): 53-76.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., et al., Verma, I. M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, 338(6110): 1080–4.
- Frye, C. A., Manjarrez, J., Camacho-arroyo, I. (2000). Infusion of 3 α ,5 α -THP to the pontine reticular formation attenuates PTZ-induced seizures. *Brain Research*, 881: 98–102.

- 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. *Fisiología médica*, ed. México: El Manual Moderno. 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.
- González Agüero, G., Gutiérrez, A. A., González Espinosa, D., Solano, J. D., Morales, R., González-Arenas, A., Camacho-Arroyo, I. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, 32(2): 129–35.
- González Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa Domínguez, A., Cerbón, M. A., & Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Research Bulletin*, 56(1): 43–8.
- Guennoun, R., Labombarda, F., Gonzalez Deniselle, M. C., Liere, P., De Nicola, A. F., & Schumacher, M. (2015). Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 146C: 48–61.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, M. A. R., Camacho-Arroyo, I., & Garcia-Segura, L. M. (2007). Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein tau in the rat cerebellum. *Developmental Neurobiology*, 67(4): 510–20.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, M. A. R., Pinto-Almazán, R., González-Arenas, A., Campos, M. G., & Garcia-Segura, L. M. (2009). Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 87(2): 470–81.
- Giuliani, F. A., Escudero, C., Casas, S., Bazzocchini, V., Yunes, R., Laconi, M. R., & Cabrera, R. (2013). Allopregnanolone and puberty: modulatory effect on glutamate and GABA release and expression of 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase in the hypothalamus of female rats. *Neuroscience*, 243: 64–75.

- Hadjipanayis CG, Van Meir EG (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med*, 15(11): 519-530.
- He, J., Evans, C.-O., Hoffman, S. W., Oyesiku, N. M., & Stein, D. G. (2004). Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 189(2): 404–12.
- Henley D, Lindzey J, Korach K (2005). Steroid Hormones. In: Melmed S, Conn P (eds). *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*, 2 edn. New Jersey: Humana Press: 49-65.
- Hovakimyan, M., Maass, F., Petersen, J., Holzmann, C., Witt, M., Lukas, J., Wree, a. (2013). Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice. *Neuroscience*, 252: 201–11.
- Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004). Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol*, 70(2): 137-160.
- Kim, T. S., Halliday, A. L., Hedley-Whyte, E. T., Convery, K. (1991). Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *Journal of Neurosurgery*, 74(1): 27–37.
- Kruse, M. S., Rey, M., Barutta, J., Coirini, H. (2009). Allopregnanolone effects on astrogliosis induced by hypoxia in organotypic cultures of striatum, hippocampus, and neocortex. *Brain Research*, 1303: 1–7.
- Letier, D., Ortiz, P., Eglys, D., Ramos, R., Figueredo, R., Esperanza, D. (2001). Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir*, 40(2): 87–91.
- Lockhart, E. M., Warner, D. S., Pearlstein, R. D., Penning, D. H., Mehrabani, S., Boustany, R. (2002). Allopregnanolone attenuates N -methyl- d -aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture. *Neuroscience Letters*, 328: 33–36.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A, *et al.*, (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2): 97-109.
- Maayan, R., Fisch, B., Galdor, M., Kaplan, B., Shinnar, N., Kinor, N., *et al.*, Weizman, A. (2004). Influence of 17beta-estradiol on the synthesis of reduced neurosteroids in the brain (in vivo) and in glioma cells (in vitro): possible relevance to mental disorders in women. *Brain Research*, 1020(1-2): 167–72.

- Melcangi, R. C., Cavarretta, I., Magnaghi, V., Ballabio, M., Martini, L., & Motta, M. (1998). Crosstalk Between Normal and Tumoral Brain Cells Effect on Sex Steroid Metabolism. *Endocrine*, 1(1): 65–71.
- Melcangi, R. C., Giatti, S., Calabrese, D., Pesaresi, M., Cermenati, G., Mitro, N., Caruso, D. (2014). Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology*, 113: 56–69.
- Mladenović, D., Hrnčić, D., Petronijević, N., Jevtić, G., Radosavljević, T., Rašić-Marković, A. et al., Stanojlović, O. (2014). Finasteride improves motor, EEG, and cellular changes in rat brain in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(9): G931–40.
- Modol, L., Casas, C., Navarro, X., Llidó, A., Vallée, M., Pallarès, M., & Darbra, S. (2014). Neonatal finasteride administration alters hippocampal $\alpha 4$ and δ GABAAR subunits expression and behavioural responses to progesterone in adult rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology (CINP)*, 17(2): 259–73.
- Morita, K., Tsuruo, Y., Ishimura, K., Her, S., & Ann, R. (1999). Influence of serum-free culture conditions on steroid 5 α -reductase mRNA expression in rat C6 glioma cells. *Brain Research*, 830: 179–182.
- Morita, K., Arimochi, H., Itoh, H., & Her, S. (2006). Possible involvement of 5 α -reduced neurosteroids in adrenergic and serotonergic stimulation of GFAP gene expression in rat C6 glioma cells. *Brain Research*, 1085: 49–56.
- Oliveira, O. L. M., Koff, W. J., Muraro, F., Santos, E. B., Gomes Soares, D. F., & Trindade, V. M. T. (2008). Steroid 5- α reductase type 2 activity in biopsies from malignant and normal prostatic tissues. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 391(1-2): 36–40.
- Pang, Y., Dong, J., & Thomas, P. (2013). Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 154(1): 283–95.
- 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.
- Read, T.-A., Hegedus, B., Wechsler-Reya, R., & Gutmann, D. H. (2006). The neurobiology of neurooncology. *Annals of Neurology*, 60(1): 3–11.

- Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, Syrjakoski 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 Journal of Cancer*, 46(2): 108.
- Schmidt, L. J., & Tindall, D. J. (2011). Steroid 5 α -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1-2): 32–8.
- Schüle, C., Nothdurfter, C., & Rupprecht, R. (2014). The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in Neurobiology*, 113: 79–87.
- Schumacher, M., & Guennoun, R. (2010). Progesterone: Synthesis, metabolism, mechanisms of action, and effects in the nervous system: An overview. *Hormones, Brain and Behavior*, Online, 3: 1505–1561.
- Schumacher, M., Mattern, C., Ghoumari, a, Oudinet, J. P., Liere, P., Labombarda, F., *et al.*, Guennoun, R. (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Progress in Neurobiology*, 113: 6–39.
- Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pr Neurol*, 2: 494-503.
- Stiles, A. R., & Russell, D. W. (2010). SRD5A3: A surprising role in glycosylation. *Cell*, 142(2): 196–8.
- Thomas, P., & Pang, Y. (2012). Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*, 96(2): 162–71.
- Titus, M. A., Li, Y., Kozyreva, O. G., Maher, V., Godoy, A., Smith, G. J., & Mohler, J. L. (2014). 5 α -reductase type 3 enzyme in benign and malignant prostate. *The Prostate*, 74(3): 235–49.
- Turkmen, S., Backstrom, T., Wahlstrom, G., Andreen, L., & Johansson, I.-M. (2011). Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor. *British Journal of Pharmacology*, 162(2): 311–27.
- VanLandingham, J. W., Cutler, S. M., Virmani, S., Hoffman, S. W., Covey, D. F., Krishnan, K., *et al.*, Stein, D. G. (2006). The enantiomer of progesterone acts as a molecular neuroprotectant after traumatic brain injury. *Neuropharmacology*, 51(6): 1078–85.

- VanLandingham, J. W., Cekic, M., Cutler, S. M., Hoffman, S. W., Washington, E. R., Johnson, S. J., *et al.*, Stein, D. G. (2008). Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(11): 1786–94.
- Wang, J. M., Johnston, P. B., Ball, B. G., & Brinton, R. D. (2005). The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(19): 4706–18.
- Wiebe, J. P., Muzia, D., Hu, J., Szwajcer, D., Hill, S. A., & Seachrist, J. L. (2000). The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Research*, 60(4): 936–43.
- Wiebe, J. P., Lewis, M. J., Cialacu, V., Pawlak, K. J., & Zhang, G. (2005). The role of progesterone metabolites in breast cancer: potential for new diagnostics and therapeutics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 93(2-5): 201–8.
- Wiebe, J. P., Zhang, G., Welch, I., & Cadieux-Pitre, H.-A. T. (2013). Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors. *Breast Cancer Research: BCR*, 15(3): R38.