



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Papel de las isoformas del receptor a progesterona en el
crecimiento e infiltración de un glioblastoma humano en un
modelo *in vivo***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B Liliana Germán Castelán

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F. junio, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo económico de CONACyT número 355739.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, proyecto PAPIIT IN201414.

A la Dra. Aliesha Araceli González Arenas del Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez por el apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Valeria Hansberg Pastor de la Facultad de Química, UNAM y a los miembros del comité tutorial, Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Progesterona.....	3
2.1.1. Estructura y función de la progesterona.....	3
2.1.2. Mecanismo de acción.....	5
2.2. Receptores intracelulares a progesterona.....	7
2.2.1. Características.....	7
2.2.2. Isoformas.....	9
2.3. La progesterona en el cerebro.....	10
2.4. Tumores cerebrales.....	11
2.4.1. Astrocitomas.....	11
2.5. Progesterona y astrocitomas.....	14
3. Planteamiento del problema.....	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	18
5.1. Objetivo general.....	18
5.2. Objetivos particulares.....	18
6. Metodología.....	19
6.1. Cultivo celular.....	19
6.2. Silenciamiento <i>in vitro</i> del RP-B y RP total mediante oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido.....	19
6.3. Western blot.....	19
6.4. Evaluación de la proliferación celular <i>in vitro</i>	21
6.5. Microinyección de las células U87 en el cerebro de la rata.....	21
6.6. Tratamientos.....	22
6.6.1. ODNs.....	22
6.6.2. Progesterona.....	22
6.7. Análisis histológicos.....	23
6.7.1. Tinción de Nissl.....	23
6.7.2. Inmunofluorescencia.....	24
6.8. Análisis estadístico.....	24

7. Resultados	25
7.1. Evaluación de la proliferación celular <i>in vitro</i>	25
7.2. Silenciamiento del RP total <i>in vitro</i>	26
7.3. Silenciamiento del RP total <i>in vivo</i> . Evaluación del área e infiltración de los tumores.....	27
7.4. Silenciamiento del RP-B <i>in vitro</i>	32
7.5. Silenciamiento del RP-B <i>in vivo</i> . Evaluación del área e infiltración de los tumores.....	36
8. Discusión	37
9. Conclusiones	41
10. Abreviaturas	42
11. Referencias	43

1. RESUMEN

Los astrocitomas son tumores cerebrales derivados de astrocitos, progenitores gliales o células troncales cancerosas que constituyen las neoplasias cerebrales primarias más comunes y agresivas en el ser humano y representan el 45% de todos los tumores del Sistema Nervioso Central. La incidencia de este tipo de tumores es 50% mayor en hombres que en mujeres, lo que sugiere la participación de un componente hormonal en su desarrollo.

Se ha reportado que la progesterona (P_4) promueve la proliferación celular en líneas derivadas de astrocitomas humanos grados III y IV (glioblastomas) y que este efecto ocurre a través de la interacción con su receptor intracelular (RP) el cual es un factor de transcripción activado por su ligando que está involucrado en la regulación de genes relacionados con el ciclo celular y la metástasis. Existen dos isoformas del RP, RP-A y RP-B, cada una con diferente regulación y patrón de expresión. Las isoformas del RP tienen diversas funciones dependiendo del tejido, el tipo de célula y el gen blanco. Generalmente RP-B es un potente activador transcripcional, mientras que RP-A actúa como un inhibidor de la transcripción mediada por RP-B.

En este trabajo se estudiaron los efectos de la P_4 en el desarrollo e infiltración de un tumor provocado por el implante de células U87 (derivadas de un astrocitoma humano grado IV) en la corteza cerebral motora de ratas macho, así como la participación de las isoformas del RP en la mediación de estos efectos. Para ello, se implantaron 250,000 células U87 en la corteza cerebral de la rata y 8 semanas después se administraron oligodeoxinucleótidos (ODNs) sentido y antisentido para silenciar la expresión del RP total (RP-A + RP-B), así como del RP-B (0.5 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 1.0 $\mu\text{g}/\text{día}$, respectivamente) durante 15 días por vía intracerebral a través de una bomba osmótica Alzet. Asimismo, se administró vehículo (propilenglicol) o P_4 (400 $\mu\text{g}/100$ g de peso) a las ratas durante 14 días, por vía subcutánea comenzando un día después de la primera administración de los ODNs. Un día después de finalizar los tratamientos los animales fueron eutanizados, se extrajeron los cerebros y se realizaron análisis histológicos (tinción de Nissl e

inmunofluorescencia para identificar a las células del glioblastoma y células en proliferación).

Al analizar los cortes histológicos se observó que la P₄ provocó un incremento tanto en el área como en la distancia de infiltración del tumor y que estos efectos fueron bloqueados al silenciar la expresión del RP total, lo que sugiere que la P₄ ejerce estos efectos a través de la interacción con su receptor intracelular.

Asimismo, se observó que la P₄ incrementó de manera significativa el área del tumor en las ratas tratadas tanto con ODNs sentido como antisentido para RP-B. La administración de ODNs antisentido no solo no disminuyó el efecto de la P₄, sino que contrario a lo que se esperaba, lo aumentó, lo que sugiere que el cambio en la proporción RP-A/RP-B modifica significativamente la respuesta de este tipo de tumores ante la administración de P₄, y que el aumento de RP-A en esta proporción ocasiona un mayor desarrollo del tumor.

Estos datos sugieren que la P₄, a través de su receptor intracelular aumenta el desarrollo e infiltración de un tumor cerebral formado a partir del implante de células derivadas de un glioblastoma humano y que la proporción de las isoformas del RP desempeña un papel importante en la mediación de dichos efectos, siendo la isoforma RP-A la principalmente involucrada.

2. ANTECEDENTES

2.1. Progesterona (P₄)

2.1.1. Estructura y función de la P₄

La P₄ (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol. Es sintetizada en las células del cuerpo lúteo, la corteza adrenal, la placenta y en neuronas y células gliales del sistema nervioso central (SNC) [1, 2]. Su síntesis comienza con la conversión de colesterol en pregnenolona por el citocromo P450_{scc}, localizado en la membrana interna de la mitocondria. Posteriormente la pregnenolona se transporta al retículo endoplásmico liso donde es convertida a P₄ por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) [2] (**Figura 1**).

En el cuerpo lúteo, la síntesis y secreción de la P₄ se encuentra regulada por diversas hormonas, entre las que se encuentran la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), prostaglandinas y agentes β adrenérgicos [1].

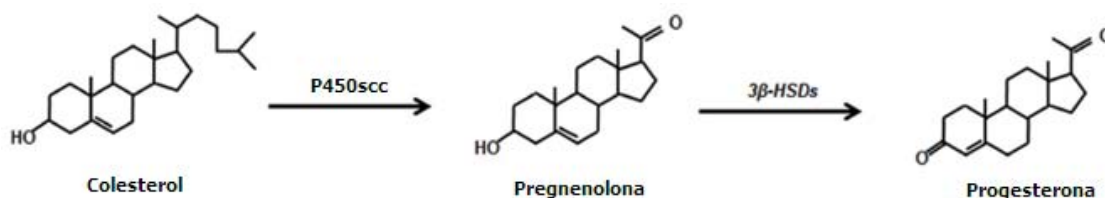


Figura 1. Biosíntesis de la P₄. El colesterol es convertido en pregnenolona en una reacción catalizada por el citocromo P450_{scc}, en la que pierde un fragmento de 6 átomos de carbono de su cadena lateral. La pregnenolona se convierte en P₄ después de la oxidación del grupo alcohol en C-3 y del movimiento del doble enlace de C-5 hacia C-4, mediante la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) (Modificado de [2]).

La P₄ es metabolizada a 5α-dihidroprogesterona (5α-DPH), la cual puede transformarse en alopregnanolona o en epialopregnanolona (**Figura 2**). Estos

metabolitos tienen actividad biológica, siendo la alopregnanolona un modulador alostérico positivo de los receptores GABA_A en el cerebro, mientras que la epialopregnanolona presenta un efecto inhibitor sobre los mismos [2].

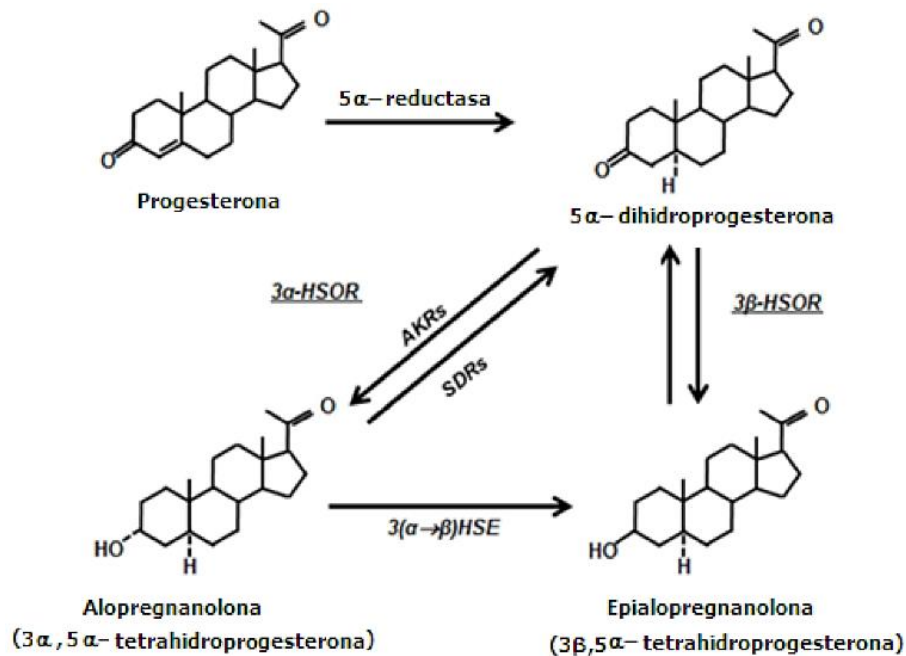


Figura 2. Metabolismo de la P₄. La conversión de P₄ a 5α-dihidroprogesterona (5α-DPH) es catalizada por dos isoformas de la enzima 5α-reductasa. La 5α-DPH puede ser metabolizada a alopregnanolona por la 3α-hidroxiesteroide oxidorreductasa (3α-HSOR), involucrando aldo-ceto reductasas (AKRs) para la conversión a alopregnanolona, y deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs) para regresar de ésta a la 5α-DPH, la cual también puede convertirse en epialopregnanolona mediante la 3β-hidroxiesteroide reductasa (3β-HSOR). La 3(α→β)hidroxiesteroide epimerasa (HSE) cataliza la epimerización de alopregnanolona en epialopregnanolona (Tomado de [2]).

Aproximadamente el 2% de la P₄ circula de manera libre en el torrente sanguíneo, en tanto que el 80% está unida a la albúmina y el 18% a la globulina fijadora de corticosteroides [1]. La P₄ tiene una vida media de 36.5 horas (h) [3].

La P₄ participa en un amplio rango de funciones biológicas en diferentes tejidos, como ejemplo de ellas se encuentra la liberación e implantación del óvulo fecundado, el mantenimiento del embarazo y el desarrollo de la glándula mamaria. En el cerebro regula la conducta sexual, la excitabilidad neuronal y el sueño, además de presentar efectos neuroprotectores [1, 4, 5]. Esta hormona también está involucrada en la regulación del ciclo celular y particularmente en la entrada a la fase S. Se ha reportado que al tratar con P₄ a la línea celular T47-D, derivada de cáncer de mama, se observa un aumento en la progresión del ciclo celular, el cual está relacionado con la inducción de la expresión de genes asociados a este proceso, como la ciclina D1 [6, 7], el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformante α y β (TGF- α , TGF- β) [6, 8] y los protooncogenes asociados con la actividad proliferativa c-myc y c-fos [6, 9]. Este efecto puede ser bloqueado por el antagonista de la P₄, el RU486 [10].

2.1.2. Mecanismo de acción

La P₄ actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales denominados clásico (o genómico) y no clásico (o no genómico). El primero involucra la interacción de la P₄ con su receptor intracelular, el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la P₄ con receptores membranales [11], lo cual modifica la conductancia a iones [12], induce la formación de segundos mensajeros como el AMPc, así como la fosforilación de proteínas [13] **(Figura 3)**.

La vía clásica es la más estudiada, su mecanismo general consiste en que la P₄ atraviesa la membrana celular por difusión simple, ya que tiene carácter lipofílico, y en el núcleo o en el citoplasma se une a su receptor. Dicha unión provoca un cambio estructural en este último que le permite disociarse de las proteínas de choque térmico (Hsp70, 90 y 56), exponiendo la región que le permite fosforilarse y dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el ADN llamadas elementos de respuesta a P₄ (ERP), las cuales se encuentran en los promotores de los genes blanco de la P₄ [14]. 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 como el factor de crecimiento vascular endotelial

(VEGF) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [15] (**Figura 4**). El RP interactúa con correguladores (coactivadores o correpresores) que tienen actividad de histona acetiltransferasa, por lo que pueden modificar la estructura de la cromatina al provocar cambios en el patrón de acetilación de las histonas y favorecer o impedir de manera indirecta la interacción del receptor con los factores generales de transcripción. [16–19].

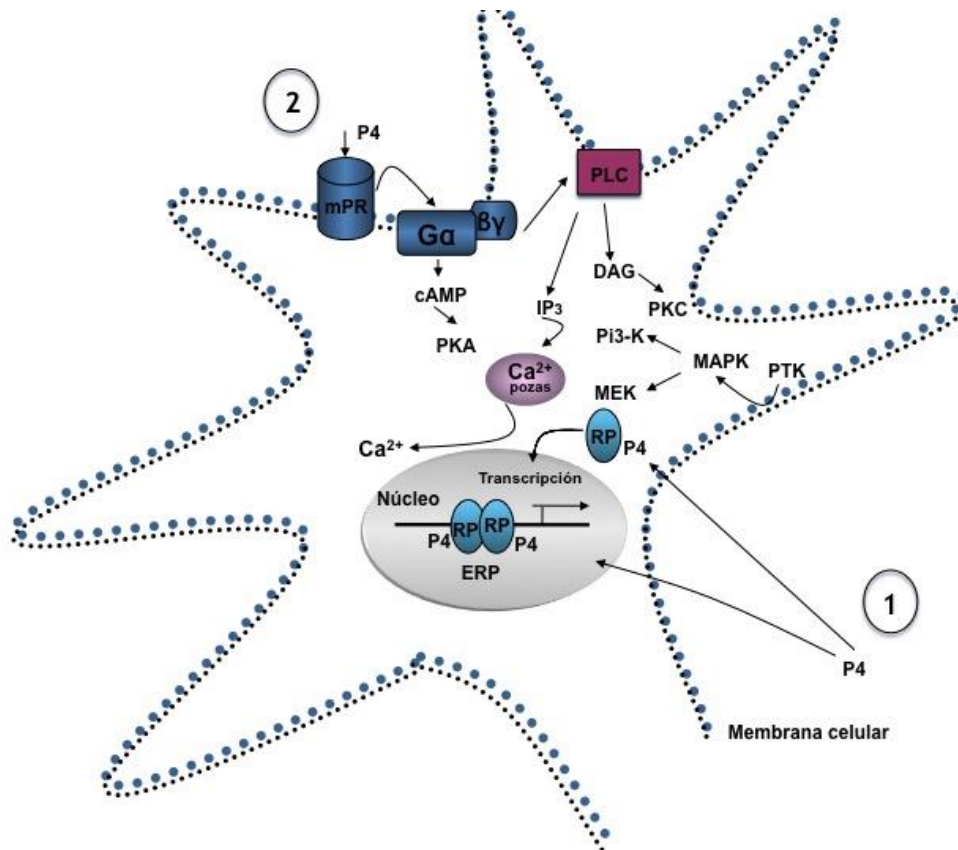


Figura 3. Esquema de los mecanismos de acción de la P₄. Los efectos de la P₄ ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1.- clásico, en el que el complejo hormona-receptor (P₄-RP) se une con ERP ubicados en las regiones promotoras de los genes blanco de la P₄, y así se modula directamente la expresión génica. 2.- no clásico, que incluye receptores membranales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP: Receptor membranar a P₄, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Kinasa A, Ca²⁺: Calcio, PTK: Proteína Tirosina Kinasa, MAPK: Proteína Kinasa Activada por Mitógenos, MEK: Kinasa de MAPK, PI3-K: Kinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Kinasa C, IP₃: Inositol Trifosfato. (Modificado de [20]).

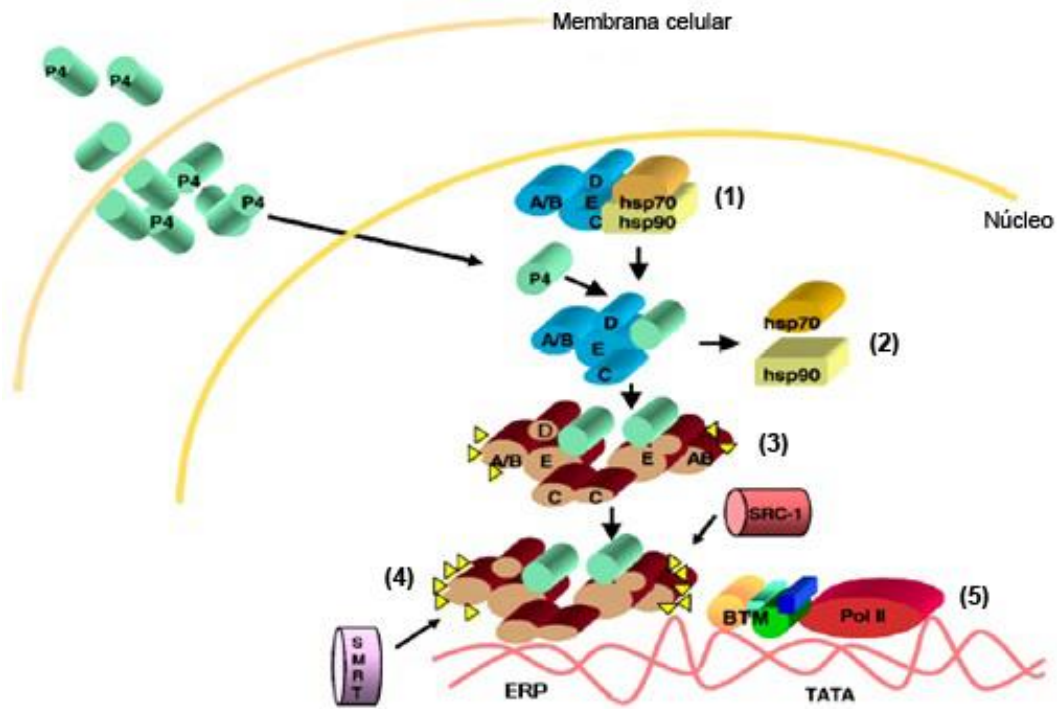


Figura 4. Mecanismo de acción clásico de la P₄. En estado basal, el RP (A/B, C, D y E) está asociado con proteínas chaperonas como las de choque térmico hsp90 y hsp70 (1). Después de la unión de la P₄ el RP se disocia de las proteínas chaperonas (2) y se dimeriza con otra molécula de RP (3). El receptor es fosforilado y forma complejos con correguladores como el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT (4). El RP interactúa con el ERP en la región promotora de los genes blanco de la P₄, lo cual también induce fosforilación del RP y la maquinaria de transcripción basal es reclutada (5). A/B, C, D y E son dominios del RP (Tomado de [21]).

2.2. Receptores intracelulares a P₄

2.2.1. Características

Muchas de las acciones de la P₄ están mediadas por el RP, el cual se encuentra localizado en el citoplasma y en el núcleo [15]. El RP es miembro de una superfamilia de factores de transcripción activados por su ligando, que incluye receptores para hormonas esteroides, hormonas tiroideas, ácido retinóico, así como receptores huérfanos cuyo ligando endógeno no ha sido identificado. El gen que codifica al RP presenta una sola copia compuesta por 8

exones (**Figura 5**). En el humano se localiza en el cromosoma 11q22-q23 [22, 23].

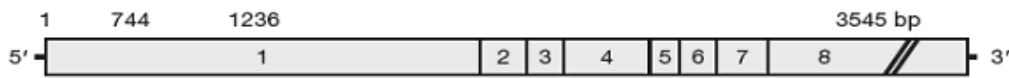


Figura 5. Representación esquemática del gen del RP humano. Se señalan sus 8 exones. El exón 1 codifica el extremo N-terminal del receptor, los exones 2 y 3 codifican el dominio de unión a DNA y cada uno de ellos, además, codifica un dedo de zinc, y los exones 4 – 8 codifican el dominio de unión al ligando (Modificado de [24]).

Existen tres dominios característicos de todos los receptores esteroides, que son la región N-terminal, el dominio de unión a ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD) (**Figura 6**). Cabe resaltar que el LBD es un dominio multifuncional que une a la hsp90 y participa en la dimerización del receptor así como en la modulación de la transcripción. Además, se han identificado secuencias específicas a las cuales se pueden unir las proteínas reguladoras y que desempeñan funciones de activación (FA) o inhibición (FI) [25].

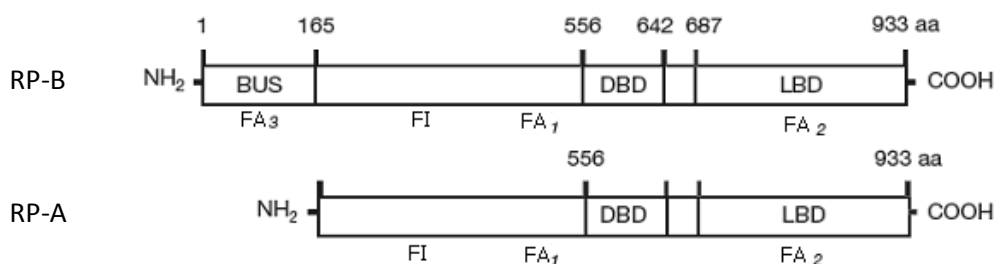


Figura 6. Representación esquemática de las proteínas del RP-A y RP-B. FA₁–FA₃ indica la localización de funciones activadoras y FI indica funciones inhibitoras. El segmento de 164 aminoácidos del extremo N-terminal del RP-B es conocido como BUS (Modificado de [24]).

Se ha observado que el RP es regulado de manera positiva por estrógenos, ya que el gen del RP contiene elementos de respuesta a esta hormona. Además, el RP es regulado negativamente por P₄ debido a que la unión de su ligando induce su degradación por el proteosoma 26S en diferentes tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo [1, 26, 27]. Esta regulación también se ha reportado en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos grados III y IV [28].

2.2.2. Isoformas del RP

Se han descrito dos isoformas principales del RP, las cuales se denominan RP-A (94 kDa) y RP-B (114 kDa). La isoforma RP-A es una forma truncada de la isoforma RP-B, ya que carece de 164 aminoácidos en la región amino terminal denominados BUS. El RP-A posee solamente dos regiones con funciones de activación (FA_{1, 2}), mientras que el RP-B contiene además una tercera región (FA₃) presente en el extremo amino terminal (**Figura 6**). Ambas isoformas presentan una región con función inhibidora (FI) localizada en la región adyacente a FA₁ que sólo es funcional en RP-A [29]. De hecho, la remoción del dominio FI convierte a RP-A en un fuerte activador de la transcripción [30], mientras que la mutación de FA₃ inhibe completamente la regulación RP-B-específica, ya que se elimina el sinergismo de FA₃ con FA₁ y FA₂ [31]. Estudios cinéticos indican que la constante de unión de la P₄ por RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente [32].

Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas que dan lugar a diferentes mRNAs. Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor [33]. En muchos sistemas celulares RP-B actúa como un potente activador transcripcional, mientras que RP-A funciona como un represor de la transcripción mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides [33–35]. Lo anterior se debe a que, en general, RP-A tiene mayor afinidad por correpresores como SMRT y RP-B por coactivadores como SRC-1 [36]. Las diferencias funcionales entre ambas isoformas se han estudiado mediante experimentos de knockout en ratones, en los cuales se ha observado que cada isoforma participa en

procesos fisiológicos específicos. De esta manera se ha descubierto que RP-B participa en el desarrollo de la glándula mamaria, mientras que RP-A desempeña una función crítica en el desarrollo del ovario y el útero [37]. También se ha reportado que la isoforma más importante en el despliegue de la conducta sexual femenina en ratas es RP-B [38] y que en células T47D, la sobre-expresión de RP-A conlleva a cambios en la morfología celular que ocasionan pérdida de propiedades adherentes [39]. De igual manera, se ha observado en experimentos *in vitro* que en células derivadas de astrocitoma humano grado III la sobre-expresión de RP-A inhibe la proliferación celular inducida por P₄ [28].

En cuanto a la regulación génica, se ha encontrado que en células T47D existen 94 genes regulados por RP, de los cuales 65 son regulados exclusivamente por RP-B, 25 por ambas isoformas y sólo 4 genes por RP-A [40].

2.3. La P₄ en el cerebro

La P₄ es bien conocida por ser una hormona sexual femenina y en particular por su papel en la receptividad sexual, implantación del óvulo fecundado y mantenimiento del embarazo, sin embargo, en las últimas décadas se ha establecido que esta hormona desempeña múltiples funciones que van más allá de la reproducción.

La P₄ forma parte de los esteroides neuroactivos, los cuales son moléculas derivadas del colesterol capaces de regular diversas funciones en el SNC. Éstos pueden ser sintetizados en las neuronas y células gliales, así como en glándulas periféricas como los ovarios, las glándulas adrenales y la placenta [41]. Se ha demostrado que la síntesis de P₄ ocurre en el cerebro de diversas especies y que las enzimas requeridas para su producción se encuentran ampliamente distribuidas en este órgano [2, 42–45]. Asimismo, se ha reportado que es posible detectar niveles significativos de esteroides neuroactivos en el SNC de roedores incluso después de la remoción de las glándulas esteroideogénicas periféricas, lo que sugiere que los niveles de dichas hormonas en el cerebro son independientes de los niveles séricos de las mismas [46]. De igual manera, se ha observado que los niveles de P₄

incrementan de manera significativa en el SNC de ratas macho (castradas y adrenalectomizadas) como respuesta ante un daño [47]. Los niveles de P₄ en el cerebro también aumentan después de lesiones cerebrales traumáticas en ratas y después de lesiones isquémicas cerebrales en el ratón [48, 49].

La P₄ también participa en procesos de mielinización y en el desarrollo del SNC [2, 50] y junto con las isoformas de su receptor influye en el desarrollo y crecimiento de diversos tipos de cáncer, por lo cual el entendimiento de la dependencia hormonal de este padecimiento puede brindar herramientas para la elaboración de nuevas terapias [51].

2.4. Tumores cerebrales

2.4.1. Astrocitomas

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes, representando aproximadamente el 50% de todos los tumores del SNC y el 80% de los tumores malignos en este sistema [52]. Se ha reportado que la incidencia de gliomas en adultos es 50% mayor en hombres que en mujeres [53], lo que sugiere la participación de un componente hormonal en su desarrollo. Los astrocitomas son el tipo más común de glioma, representando aproximadamente el 76% de estos tumores [52], y pueden originarse a partir de astrocitos, progenitores gliales o células troncales cancerosas [54–58].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado una clasificación que establece una escala de progresión de acuerdo a las características histológicas del tumor [59].

- **Astrocitoma pilocítico (grado I):**

Es un tumor bien delimitado, de crecimiento lento, que suele ser quístico y se presenta generalmente en niños y adultos jóvenes. Histológicamente está compuesto por proporciones variables de células bipolares compactas y células multipolares laxas, con microquistes y cuerpos granulares. Afecta más comúnmente al nervio y quiasma ópticos, hipotálamo, tálamo, ganglios basales, hemisferios cerebrales, cerebelo y tallo cerebral. La resección quirúrgica total de un astrocitoma pilocítico solamente está limitada por la

proximidad del tumor a alguna estructura crítica, por lo cual es la principal estrategia terapéutica. En la mayoría de los casos donde el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las probabilidades de una sobrevida mayor a 20 años son de más del 85% [60].

- Astrocitoma difuso (grado II)

Se caracteriza por un crecimiento lento e infiltración a estructuras cerebrales vecinas. Generalmente afecta a adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años y tiende a evolucionar en forma maligna a astrocitoma anaplásico y glioblastoma. Histológicamente está compuesto por astrocitos fibrilares bien diferenciados. Las células tumorales se pueden acumular bajo la piamadre o alrededor de neuronas dañadas (satelitosis). Se localiza en cualquier región del SNC pero con más frecuencia se encuentra en los hemisferios cerebrales, tallo cerebral y médula espinal. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia y la media de sobrevida después de la intervención quirúrgica va de 6 a 8 años [61].

- Astrocitoma anaplásico (grado III)

Este tipo de tumor puede surgir a partir de un astrocitoma difuso o manifestarse de novo sin la presencia de un precursor. Es el grado más común de astrocitoma y tienden a progresar a glioblastoma. Se caracteriza por presentar una alta actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones difusamente infiltrantes [60]. Se localiza preferentemente en los hemisferios cerebrales y el promedio de edad de los pacientes que lo presentan es de 40 años. La media de sobrevida es de 2 a 3 años y generalmente está determinado por el tiempo requerido para la progresión a un tumor de grado IV [61].

- Glioblastoma (grado IV)

Se puede generar a partir de un astrocitoma difuso o anaplásico, sin embargo, lo más frecuente es que aparezca de novo. Se caracteriza por presentar astrocitos poco diferenciados, atipia nuclear, mitosis elevada, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis. Es altamente

infiltrante. La incidencia pico se presenta entre las edades de 45 a 70 años y afecta principalmente a los hemisferios cerebrales. El tratamiento consiste principalmente en la resección quirúrgica del tumor, así como radio y/o quimioterapia, sin embargo, dada su capacidad infiltrante, es prácticamente imposible la extracción total del tumor por lo cual el tiempo de sobrevida es menor a 1 año [62].

Los síntomas más comunes ocasionados por este grupo de tumores son: déficit neurológico progresivo, debilidad motora, dolor de cabeza y convulsiones [62].

Las alteraciones encontradas en los astrocitomas son resultado de la acumulación de anormalidades genéticas, incluyendo aberraciones cromosómicas y mutaciones tales como amplificaciones y rearrreglos génicos. Un gen particularmente susceptible a sufrir modificaciones es el gen supresor de tumores p53, que juega un papel fundamental en la respuesta celular ante daños al DNA (apoptosis y arresto del ciclo celular) y en la neovascularización. También se han encontrado alteraciones en la proteína del retinoblastoma (pRB) y defectos en cascadas de señalización desencadenadas por factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y EGF [63].

El tratamiento de los gliomas depende de su tamaño, localización, alcance de resección y grado histológico, sin embargo, en los astrocitomas de grados III y IV no se ofrece una perspectiva de curación a largo plazo, es por ello que el entendimiento de los factores y mecanismos que participan en su desarrollo es de vital importancia en la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento que sean eficaces y mejoren la sobrevida de los pacientes.

Se ha reportado que las hormonas sexuales, particularmente la P₄, están involucradas en el desarrollo y progresión los astrocitomas, por lo cual éstas podrían ser de utilidad en la búsqueda de alternativas terapéuticas contra este tipo de tumores.

2.5. P₄ y astrocitomas

La P₄ participa en la regulación del crecimiento de tumores cerebrales. Se ha reportado que la administración de esta hormona incrementa la proliferación en las líneas celulares U373 y D54 (derivadas de astrocitomas humanos grados III y IV, respectivamente), mientras que su antagonista, el RU486 bloquea los efectos de la P₄ [64]. Dichos resultados también se observaron en un modelo *in vivo*, donde se implantaron células U373 en la corteza cerebral de ratas macho y se estudiaron los efectos de la P₄ y del RU486 bajo dos esquemas de tratamiento. En el primero, 15 días después del implante de las células, las ratas se trataron diariamente de manera subcutánea con vehículo (propilenglicol), 1 mg de P₄, 5 mg de RU486 o el tratamiento conjunto P₄ + RU486 durante 21 días. En el segundo, el tratamiento comenzó 8 semanas después del implante de las células y duró 14 días.

En ambos esquemas se observó que la P₄ incrementó significativamente el área de los tumores comparado con el resto de los tratamientos, mientras que el RU486 bloqueó los efectos de la misma. De igual manera, se observó que todas las ratas tratadas con P₄ presentaron infiltración del tumor, mientras que solo el 28.6% y el 42.9% de los animales tratados con RU486 y P₄ + RU486, respectivamente, la mostraron [65]. Cabe mencionar que ambas isoformas del RP se expresan en distintas regiones del cerebro de la rata, incluyendo la corteza cerebral [66, 67].

En cuanto a migración, existen estudios recientes de nuestro laboratorio que muestran que la P₄ incrementa de manera significativa la migración de células D54, que el RU486 bloquea este efecto, y que el tratamiento sólo con el antagonista disminuye significativamente el número de células que migran comparado con el vehículo. Resultados similares se observaron en ensayos de invasión, donde la P₄ aumentó de manera significativa las células invasivas y el RU486 bloqueó este efecto [68].

El mecanismo molecular a través del cual el RU486 ejerce sus efectos en las líneas celulares de astrocitomas humanos aún no está completamente explicado, sin embargo, se ha observado que la disminución del número de células posterior a la administración de dicho compuesto está asociada a un

retraso en la replicación del DNA, inhibiendo de esta manera el avance del ciclo celular [64].

El RU486 ya ha sido utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de mama, miomas uterinos y meningiomas con alguna respuesta positiva en aproximadamente 40-50% de los pacientes tratados [69–72]. También se evaluó en modelos *in vitro* en otros tipos de cáncer como fibroides uterinos y cáncer de próstata, donde se encontró que inhibe la proliferación celular [73, 74]. Además, estudios recientes indican que la administración de RU486 mejoró la respuesta a la radio y quimioterapia en xenoinjertos de glioblastoma en ratones atímicos [75].

Asimismo, se han realizado experimentos *in vitro* con células derivadas de endometriosis, en los cuales también se observó que el RU486 presenta actividad antiproliferativa. En este estudio se sugiere que la actividad de este antagonista podría estar relacionada con las propiedades antioxidantes de dicho compuesto, ya que inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales pueden activar algunas vías de señalización involucradas en proliferación celular, por ejemplo, aumentando la actividad de la proteína cinasa C, así como la expresión de ciertos protooncogenes [76, 77].

Por otro lado, Klijn y colaboradores elaboraron una lista con los posibles mecanismos de acción de las antiprogestinas en el cáncer de mama, padecimiento en el cual también se ha reportado que inhiben la proliferación celular. Entre dichos mecanismos se mencionan los siguientes:

- Bloqueo del ciclo celular en la fase G₀/G₁
- Inducción de la fragmentación del DNA
- Regulación a la baja de bcl-2 (proteínas que regulan la apoptosis)
- Inducción de la síntesis de TGF-β (proteína que participa en el control del crecimiento celular, proliferación celular, diferenciación y apoptosis).
- Bloqueo de la secreción de VEGF inducida por P₄

Éstos generalmente ocurren por vía del RP ya que se ha observado que existe una relación directa entre la concentración del receptor y el efecto antitumoral que ejercen las antiprogestinas [78].

En diversos tipos celulares, el RP se encuentra regulado tanto por estradiol (E_2) como por P_4 , observándose que el contenido de RP en células U373 aumenta después de tratarlas con E_2 , lo cual no se observa en las células D54. Esto último podría estar relacionado con los cambios génicos y metabólicos que ocurren en el grado de evolución más avanzado de los astrocitomas. Mientras tanto, la P_4 actúa como un regulador a la baja del RP por un mecanismo de proteólisis dependiente de ligando, ya que cuando la P_4 se une a su receptor induce su fosforilación, lo cual es una señal para la degradación por la vía ubiquitina-proteosoma [79–81].

Se ha reportado que los astrocitomas expresan el RP de manera diferencial dependiendo de su grado de evolución, observándose una relación directa entre el contenido de RP y el grado del tumor, lo que sugiere que los tumores que expresan RP presentan un alto índice de proliferación celular [82–84]. También se encontró que aunque la mayoría de los astrocitomas expresan ambas isoformas del RP, la isoforma predominante en astrocitomas grados III y IV obtenidos de biopsias de pacientes mexicanos es RP-B [83].

De igual manera, se ha observado que al sobre-expresar la isoforma RP-A en células U373 *in vitro* se reduce significativamente la proliferación de las mismas al ser tratadas con P_4 , lo cual sugiere que en esta línea celular, RP-A tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de las mismas cuando es activado por su ligando [28].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que la P₄ induce la proliferación, infiltración, migración e invasión de líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* y que estos efectos son bloqueados por el antagonista RU486, lo que sugiere que el mecanismo de acción de la P₄ ocurre a través de la interacción con el RP, sin embargo, se desconoce el papel que desempeñan las isoformas de este receptor en dichos procesos, por lo cual en este trabajo se estudiaron los efectos de la P₄ en el desarrollo e infiltración de un tumor formado a partir del implante de células U87 (derivadas de un astrocitoma humano grado IV) en la corteza cerebral de la rata, así como la participación de las isoformas del RP en dichos efectos.

4. HIPÓTESIS

I. Si la P₄ promueve el desarrollo de un tumor formado a partir del implante de células U87 en la corteza cerebral de la rata, entonces su administración incrementará el área y la infiltración del tumor.

II. Si el desarrollo e infiltración provocados por la P₄ ocurren a través de la interacción con el RP, entonces al silenciar su expresión disminuirán dichos efectos.

III. Si la isoforma RP-B, la cual es un mejor activador transcripcional que RP-A, participa en la mediación de los efectos de la P₄ en el desarrollo tumoral, entonces al silenciar su expresión disminuirán el área y la distancia de infiltración del tumor.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Estudiar los efectos de la P₄ y la participación del RP y sus isoformas en el desarrollo de un tumor formado a partir de células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata.

5.2. Objetivos particulares

- Inducir la formación de un tumor mediante el implante de células U87 en la corteza cerebral de la rata.
- Evaluar los efectos de la administración de P₄ en el desarrollo del tumor.
- Silenciar la expresión del RP A+B o RP-B en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata (previos estudios *in vitro*), y evaluar el silenciamiento mediante inmunofluorescencia.
- Identificar las células implantadas a través de inmunofluorescencia mediante el uso de marcadores de células de glioma (SOX-2) [85, 86] y de proliferación (Ki-67).
- Establecer la participación de las isoformas del RP en el desarrollo de células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata inducido por P₄ mediante el silenciamiento de una o ambas isoformas bajo el tratamiento con P₄ a través de análisis histológicos: medición del área y distancia de infiltración del tumor.

6. METODOLOGÍA

6.1. Cultivo celular

La línea celular U87, derivada de astrocitomas humanos grado IV, se cultivó en medio DMEM con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% y se incubó a 37°C en una atmósfera 95% aire / 5% CO₂ y 95% de humedad. El medio se cambió cada 48 h hasta alcanzar una confluencia celular de 70 – 80%.

6.2. Silenciamiento *in vitro* del RP-B y RP total mediante oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido

Las células U87 cultivadas en las condiciones anteriormente descritas se trataron con 0.5 µg o 1 µg de ODNs sentido y antisentido del RP-B y del RP total utilizando el reactivo de transfección “X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent” (Roche). Para ello, se diluyó el reactivo de transfección en medio DMEM sin rojo fenol, sin SFB y sin antibióticos en una relación de 3 µL del reactivo por cada 100 µL de medio. Se agitó con suavidad y posteriormente se mezcló con el ODN correspondiente, manteniendo una relación de 1 µg de ODN por cada 3 µL del reactivo diluido previamente. Como control se utilizó una solución (mock) que se preparó de la misma manera, excepto que no se le agregó ningún ODN. Estas mezclas se dejaron reposar durante 30 min a 25°C y se agregaron a 1,200,000 células U87 en medio DMEM con rojo fenol, SFB 10% y sin antibióticos. Las células se incubaron a 37°C durante 72 h y pasado este tiempo se realizó un Western Blot para evaluar el silenciamiento de las isoformas del RP.

6.3. Western Blot

Las células fueron lisadas con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, tritón X-100 1%, aprotinina 22 µg/mL y PMSF 1 mM) con el fin de extraer las proteínas totales, las cuales se separaron por centrifugación a

14,000 rpm a 4°C durante 15 min y se cuantificaron en el NanoDrop (Thermo Scientific). Posteriormente, se mezclaron 70 µg de proteínas totales con amortiguador de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol, glicerol 10% y β-mercaptoetanol 5%) y se separaron en un gel de poliacrilamida 7.5% con SDS a 80 volts. Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos para determinar el tamaño de las proteínas. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semihúmeda durante 7 h a 35 mA por gel. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada 2%/albúmina 3% en TBS–Tween 0.1% durante 3 h a 37°C y se incubaron con anticuerpo anti-RP total durante toda la noche a 4°C. Concluida la incubación se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min con TBS–Tween 0.1%. La identificación de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el sustrato “SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity” (Thermo Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las membranas se incubaron con el sustrato durante 1 min antes de la autoradiografía con placas para quimioluminiscencia “Carestream Kodak Biomax” (Kodak, distribuido por Sigma-Aldrich) y se realizó la detección. Posteriormente, las membranas fueron tratadas con glicina a pH ácido durante 30 min a 50°C para remover el anticuerpo anti-RP, después se lavaron con TBS durante 20 min y fueron bloqueadas de la manera antes mencionada. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo policlonal de ratón contra α-tubulina, la cual fue utilizada como control de carga, durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa durante 1 h. Después se realizaron los lavados y se llevó a cabo la identificación de las proteínas de la manera antes mencionada. Las bandas obtenidas se analizaron mediante un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health) y se mostraron como porcentaje de expresión, normalizando al 100% con respecto al Mock.

6.4. Evaluación de la proliferación celular *in vitro*

Las células U87 se sembraron en una caja de 24 pozos (10,000 células/pozo) en las condiciones descritas en el apartado 5.1. “*Cultivo celular*” durante 24 h. Posteriormente, se les cambió el medio a DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB libre de hormonas y 24 h después se administraron los tratamientos de P₄ (10 nM), RU486 (10 μM), P₄ (10 nM) + RU486 (10 μM) o vehículo (ciclodextrina 0.02%). Pasadas 24 h, las células se colectaron cada día durante 6 días consecutivos con PBS + EDTA 1 mM, se les agregaron 5 μL de azul tripán y se contaron (por duplicado) utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se determinó por el método de exclusión de dicho colorante.

6.5. Microinyección de las células U87 en el cerebro de la rata

Se trabajó con ratas macho adultas de la cepa Wistar de 250 – 300 g de peso mantenidas en un ciclo 12:12 de luz/oscuridad y con alimento y agua *ad libitum*. Cada rata se anestesió con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (30 mg/kg) y se colocó en el aparato estereotáxico. Se desinfectó la parte superior de la cabeza del animal con una gasa empapada en Isodine® y se rasuró el área. Posteriormente, se realizó una incisión en dirección anteroposterior y se retrajo el tejido. Se goteó un poco de agua oxigenada sobre el cráneo y se raspó con un bisturí para retirar el tejido conectivo del mismo. En el aparato estereotáxico se localizaron las coordenadas 1.6 mm anterior y 3 mm lateral izquierdo con respecto a Bregma correspondientes a la corteza cerebral motora y se realizó un trépano en ese sitio. Posteriormente se insertó una cánula, la cual estaba conectada a una microjeringa que contenía 250,000 células U87 en un volumen de 2 μL de DMEM y éstas se inyectaron a lo largo de 2 min a través de la cánula. El sistema de inyección se mantuvo en posición durante 5 min adicionales para permitir el asentamiento de las células inyectadas y posteriormente se extrajo la cánula. Se colocó cera para hueso suficiente para cubrir el sitio de trepanación, se goteó gentamicina sobre la superficie craneal y se suturó la

piel. Las ratas se dejaron en recuperación y se agregó enrofloxacina (10 mg/kg) al agua de beber durante las siguientes 48 h.

6.6. Tratamientos

6.6.1. ODNs

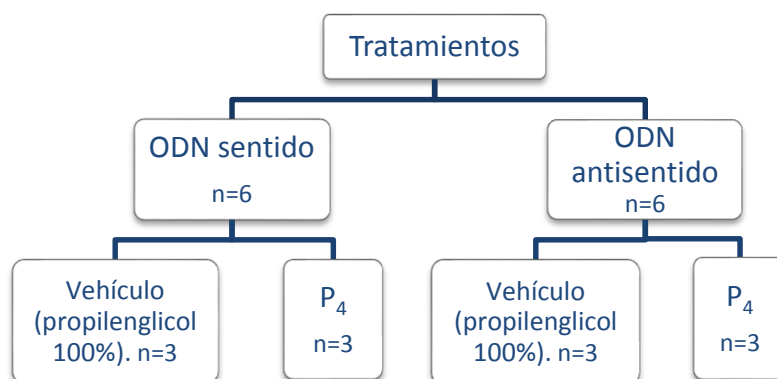
De manera aleatoria se formaron 2 grupos experimentales con 6 ratas cada uno para ser tratadas con ODNs fosforotiolados. Se utilizaron: a) ODNs contra RP total (RP A + B) sentido (S) y antisentido (As) y b) ODNs contra RP-B S y As. La secuencia de cada uno fue la siguiente:

RP A + B S: 5'-CAA GAT CCT GGC GGG CAT GGT G-3'
RP A + B As: 5'-CAC CAT GCC CGC CAG GAT CTT G-3'
RP B S: 5'-AAA ATC AGC AGT CGC TGT CCG-3'
RP B As: 5'-CGG ACA GCG ACT GCT GAT TTT-3'

La administración de los ODNs (0.5 µg/día para RP total y 1.0 µg/día para RP-B) se realizó durante 15 días, por vía intracerebral a través de una bomba osmótica Alzet® utilizando las mismas coordenadas del sitio del implante. Las dosis de los ODN se obtuvieron a partir de los experimentos *in vitro* y la administración inició 8 semanas después del implante de las células.

6.6.2. Progesterona

A partir de los 2 grupos de animales formados anteriormente se establecieron 2 subgrupos en cada uno (3 ratas por subgrupo) para trabajar con el siguiente esquema de tratamiento, el cual se utilizó para el RP-total y para el RP-B.



La administración de los tratamientos se realizó diariamente, durante 14 días, por vía subcutánea e inició un día después de la primera administración de ODNs.

La P₄ (400 µg/100 g de peso) se disolvió en 80 µL de propilenglicol puro.

6.7. Análisis histológicos

El día siguiente a la última administración de ODNs y P₄, las ratas fueron eutanizadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (80 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Cada rata fue perfundida con 500 mL de solución salina y 500 mL de paraformaldehído 4% en solución salina y posteriormente se les extrajo el cerebro, el cual se mantuvo en concentraciones crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%) a temperatura ambiente durante 24 h cada una.

Se realizaron cortes de 16 µm de grosor a la altura del sitio de implante con un criostato (Leica CM1850) a -20°C.

6.7.1. Tinción de Nissl

La mitad de los cortes obtenidos se tiñeron con el método de Nissl, para ello, los cortes montados en portaobjetos se colocaron de manera secuencial en:

- 1.- Etanol 70% durante 2.5 min
- 2.- Etanol 80% durante 2.5 min
- 3.- Etanol 95% durante 2.5 min
- 4.- Agua destilada durante 2.5 min
- 5.- Violeta de cresilo 0.1% durante 15 min
- 6.- Etanol 95% durante 10 segundos (s) con agitación
- 7.- Etanol 95% con 20 gotas de ácido acético 10% durante 10 s con agitación
- 8.- Etanol absoluto durante 2.5 min
- 9.- Xilol durante 2.5 min

- Finalmente, se colocó un cubreobjetos sobre los cortes con la resina PolyMount (Polysciences, Inc.) y se dejaron secar durante 24 h a temperatura ambiente.

6.7.2. Inmunofluorescencia

El resto de los cortes se incubaron en solución de bloqueo (suero normal de cabra 10% en PBS-tween 0.05%) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubados con los anticuerpos primarios anti SOX-2, anti Ki-67 o anti RP total en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se removieron y los cortes se lavaron 3 veces con TBS-tween 0.05% durante 10 min. Posteriormente, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes. Los núcleos se tiñeron con Hoestch. Finalmente, los cortes, cubiertos de la luz, se lavaron, montaron y observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus Bx43, donde se cuantificó el área del tumor y su distancia de infiltración con el uso del programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics).

6.8. Análisis estadístico

Los datos del silenciamiento del RP-B y RP total *in vitro* se analizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. Los datos de proliferación celular *in vitro* se analizaron a través de una prueba t de student. Los datos correspondientes al área, distancia de infiltración del tumor y colocalización de marcadores se analizaron con un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos. El programa Prisma 5.01 (GraphPad, San Diego, CA) se utilizó para calcular los valores de probabilidad.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de la proliferación celular *in vitro*

Para determinar el efecto de la P₄ sobre la proliferación de la línea celular U87 se realizaron 2 experimentos independientes donde 10,000 células fueron tratadas con vehículo (ciclodextrina 0.02%), P₄ (10 nM), RU486 (10 μM) ó P₄ (10 nM) + RU486 (10 μM) y se cuantificó el número de células diariamente durante 6 días. Se observó que la P₄ incrementó de manera significativa el número de células a partir del cuarto día del estudio y que el efecto se mantuvo hasta el sexto día, mientras que el RU486 bloqueó el efecto de la P₄ en los días mencionados. Asimismo, se observó una disminución significativa en el número de células en el tratamiento únicamente con RU486 en los días 2 y 5 del estudio (**Figura 7**).

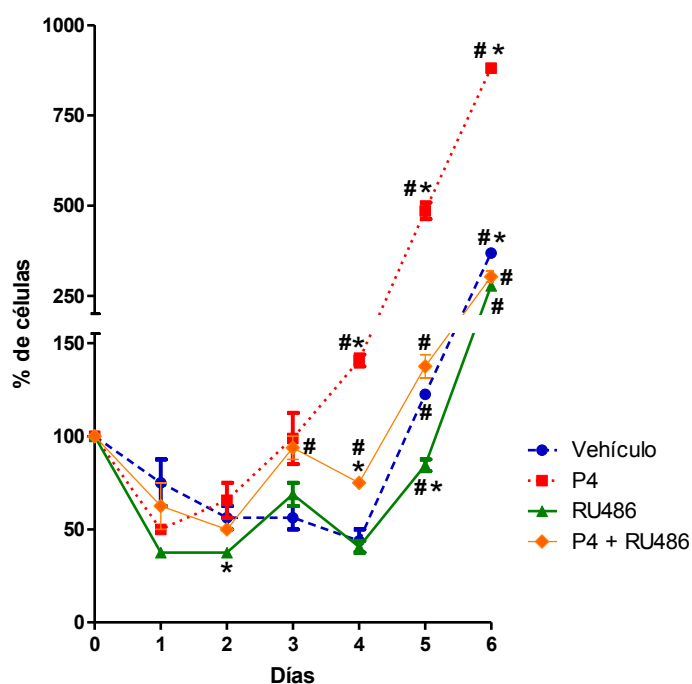


Figura 7. Efecto de la administración de P₄ sobre el crecimiento celular de la línea U87. Las células fueron tratadas con vehículo (ciclodextrina 0.02%), P₄ (10 nM), RU486 (10 μM) ó P₄ (10 nM) + RU486 (10 μM). El número de células se cuantificó diariamente durante 6 días. Los resultados se muestran como media ± S.E.M. *p<0.05 vs el resto los tratamientos del mismo día. #p<0.05 vs el mismo tratamiento del día anterior.

7.2. Silenciamiento *in vitro* del RP total mediante ODNs antisentido

Con el fin de evaluar la capacidad de silenciamiento de los ODNs, se realizaron 4 experimentos independientes en los cuales se trató a las células U87 con 0.5 y 1.0 μg de ODNs sentido y antisentido para el RP total (RP A+B). Se utilizó la técnica de Western Blot para determinar la mejor dosis de ODNs para silenciar al RP. Con los ODNs antisentido se obtuvo un silenciamiento (media \pm S.E.M) de $86.67 \pm 13.33\%$ para 0.5 μg y $37.46 \pm 5.54\%$ para 1.0 μg en el caso de la isoforma RP-A y de $39.22 \pm 6.62\%$ para 0.5 μg y $29.91 \pm 9.48\%$ para 1.0 μg en la isoforma RP-B. Utilizando los ODNs sentido, la expresión de RP-A ó RP-B no disminuyó más allá de 21% con respecto al Mock (**Figura 8**). Con estos resultados se decidió usar la cantidad de 0.5 μg de ODNs en los siguientes tratamientos.

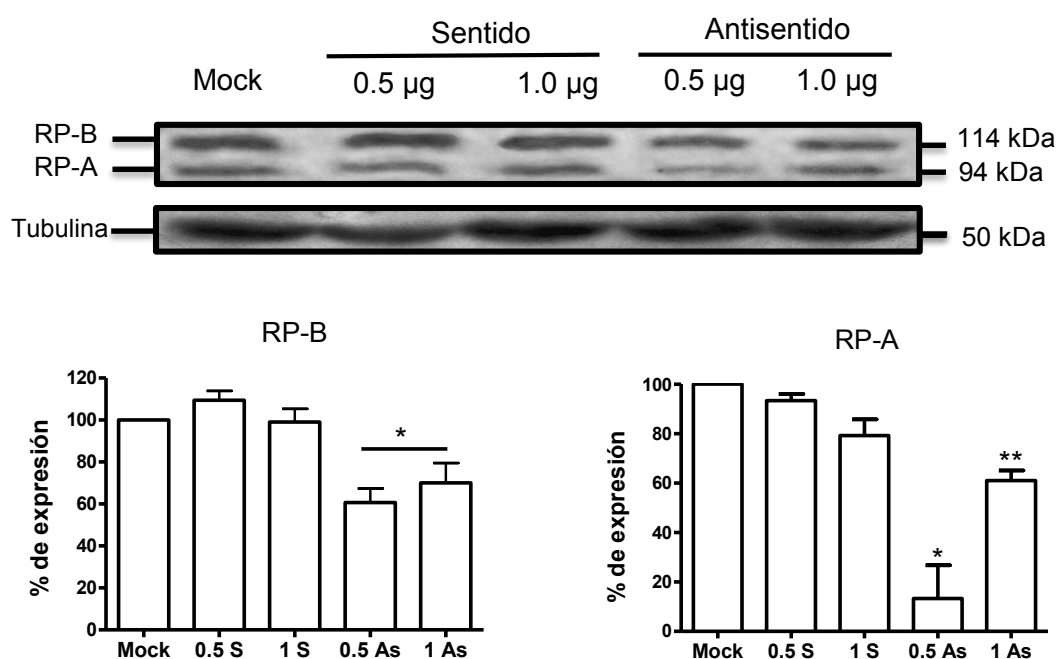


Figura 8. Silenciamiento *in vitro* del RP total (RP A+B) en células U87 derivadas de astrocitoma humano grado IV. *Panel superior.* Blot representativo de 4 experimentos independientes con α tubulina como control de carga. Mock: células tratadas con el reactivo de transfección, sin ODNs. *Panel inferior.* Análisis densitométrico que muestra el silenciamiento logrado con el uso de ODNs antisentido para las isoformas RP-B y RP-A normalizado al 100% con respecto al Mock. 0.5 y 1 indican la cantidad de ODN utilizada (μg). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. *p<0.001 vs el resto de los grupos. **p<0.001 vs el mock.

7.3. Silenciamiento del RP total *in vivo*. Evaluación del área e infiltración de los tumores

Una vez cumplidas las 2 semanas de tratamientos posteriores a las 8 semanas de desarrollo de las células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata, los animales fueron eutanizados y se extrajeron los cerebros, los cuales se cortaron en secciones de 16 μm de grosor y fueron teñidos por el método de Nissl o mediante inmunofluorescencia para detectar SOX-2, Ki-67 o RP.

En los cortes teñidos con el método de Nissl se observó que en las ratas tratadas con vehículo y ODNs sentido y antisentido contra el RP total las células U87 permanecieron alrededor del sitio del implante y mostraron un área de tumor similar (**Figuras 9 A, B**), mientras que aquellas tratadas con P₄ presentaron infiltración hacia regiones más internas del cerebro. De manera interesante, se observó que en el caso de las ratas tratadas con ODN antisentido, la distancia de infiltración fue significativamente menor comparada con el tratamiento con ODN sentido (**Figuras 9 C, D**).

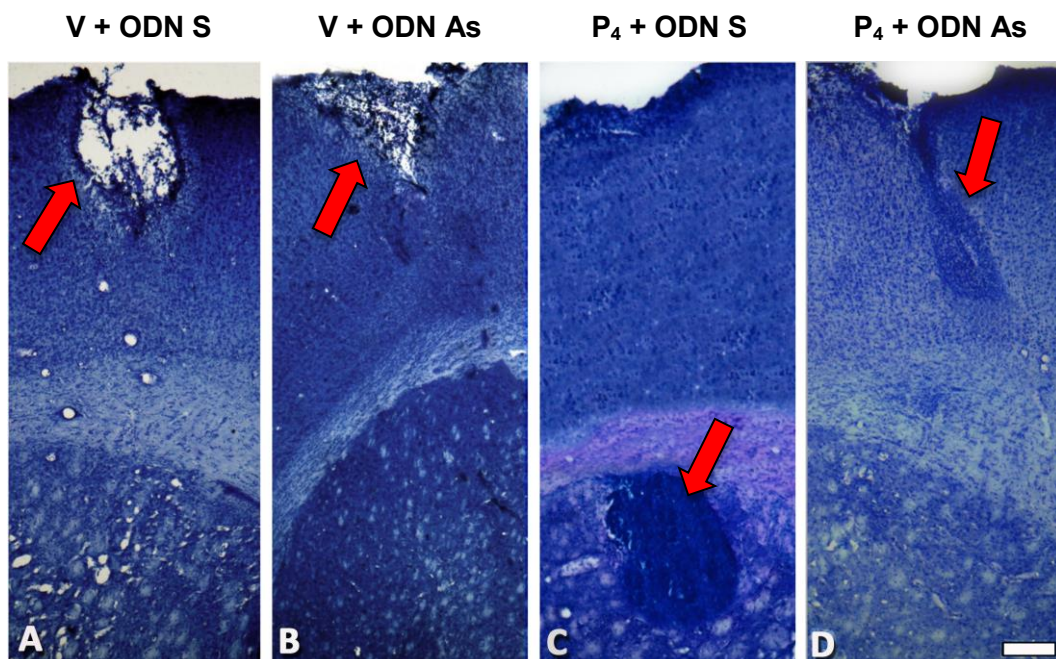


Figura 9. Efectos de los ODNs antisentido contra el RP total sobre el crecimiento e infiltración inducidos por P₄ en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata. A. ODN sentido + vehículo. B. ODN antisentido + vehículo. C. ODN sentido + P₄. D. ODN antisentido + P₄. El aumento está representado por una escala de 200 μm .

Con el fin de identificar a las células tumorales implantadas, se realizó una tinción de inmunofluorescencia para detectar a SOX-2 (marcador de células de glioma) y Ki-67 (marcador de proliferación) en el tejido cerebral de las ratas (**Figura 10**).

En los cortes teñidos mediante este método se comprobó que las células U87 se encontraban en el tejido cerebral y que éstas continuaban en proliferación. En las ratas tratadas con ODN sentido + vehículo la colocalización Ki-67/SOX-2 fue de $80.07 \pm 6.62\%$ (media \pm SEM), mientras que en aquellas con tratamiento de P₄ fue de $47.93 \pm 5.55\%$. Las ratas tratadas con ODN antisentido y vehículo presentaron una colocalización de $60.55 \pm 2.12\%$ y con P₄ de $34.82 \pm 2.81\%$. Tanto en el caso de los ODN sentido como antisentido, las ratas tratadas con P₄ presentaron una colocalización significativamente menor comparadas con el vehículo.

Asimismo, la P₄ incrementó de manera significativa tanto el área del tumor (**Figura 11B**) como la distancia de infiltración (**Figura 11A**) de las células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata, dichos efectos fueron bloqueados por el ODN antisentido contra el RP total (**Figura 11**), lo cual sugiere que ambos procesos ocurren a través de la interacción de la P₄ con el RP.

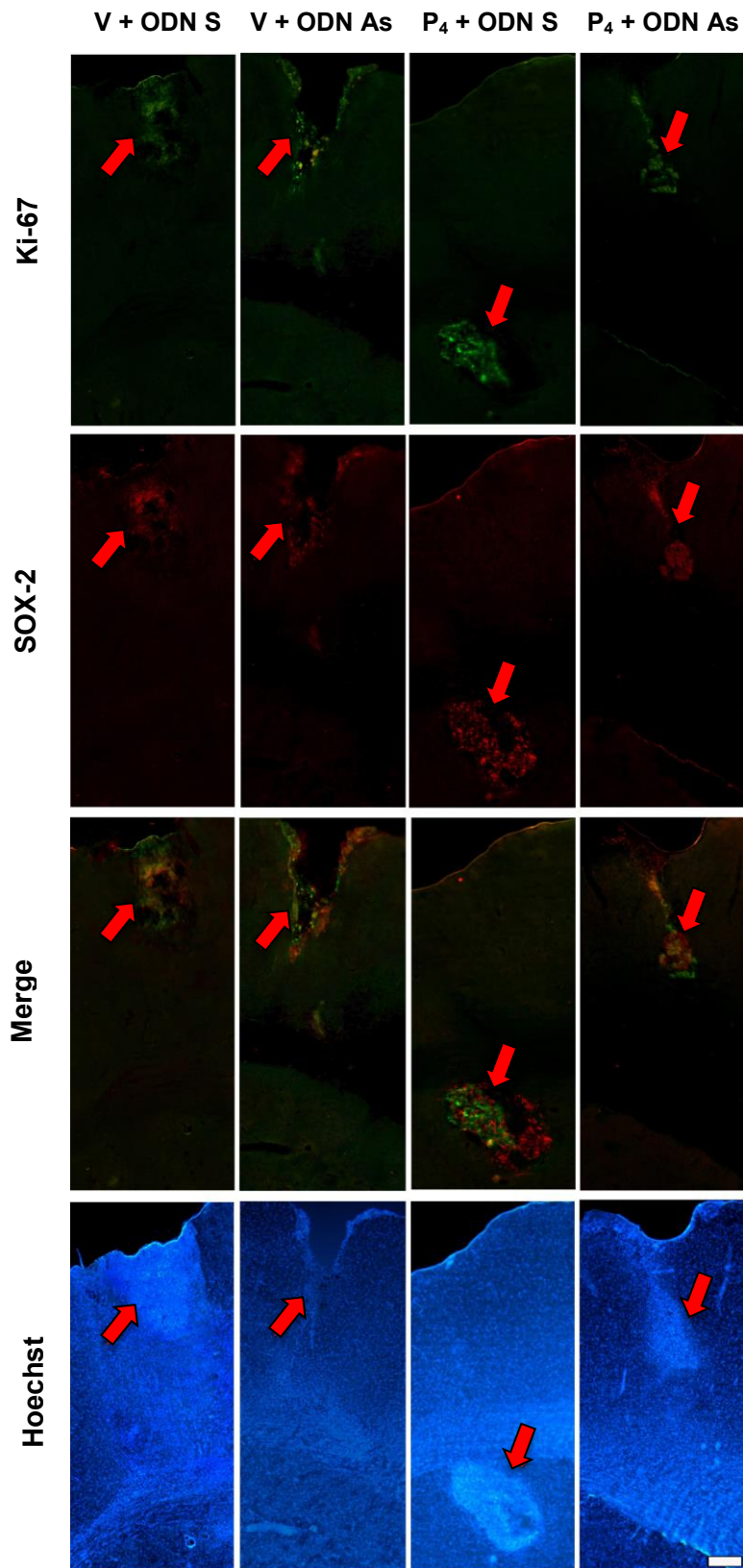


Figura 10. Expresión de SOX-2 y Ki-67 en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata bajo tratamientos con P₄ y ODNs sentido y antisentido contra RP total. Los núcleos se encuentran teñidos con Hoechst en azul, Ki-67 en verde, SOX-2 en rojo y el merge Ki-67/SOX-2 en naranja. El aumento está representado por una escala de 200 μ m.

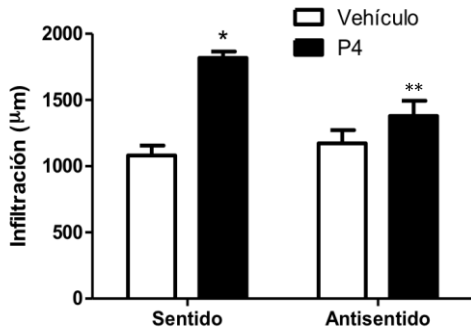
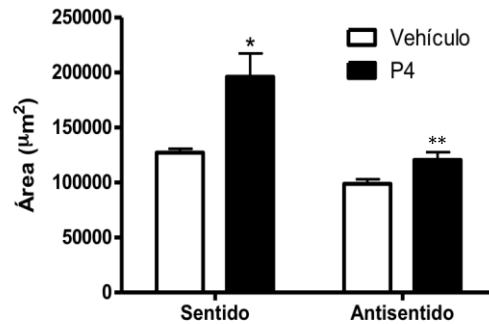
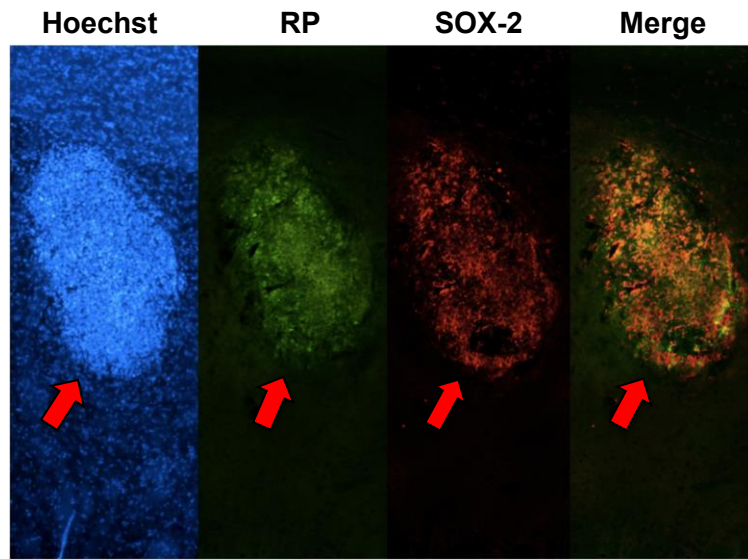
A.**B.**

Figura 11. Efectos de los ODNs antisentido contra RP total en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata bajo el tratamiento con P₄. A. Distancia de infiltración. B. Área del tumor. Los datos representan media \pm SEM. n= 3. *p<0.05 vs el resto de los tratamientos. **p<0.05 vs Sentido + P₄.

De igual manera, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para evaluar la expresión del RP en las células implantadas. En la **Figura 12** se muestra la expresión de RP y SOX-2 en ratas tratadas con P₄ y ODN sentido (A) y antisentido (B). En los cortes del panel A, el RP se expresa en un $92.90 \pm 2.45\%$ y el porcentaje de colocalización RP/SOX-2 es de $88.90 \pm 2.7\%$, mientras que en el panel B, la expresión del RP es de $33.87 \pm 4.27\%$ y la colocalización RP/SOX-2 de $21.85 \pm 2.06\%$. El porcentaje de expresión del RP se obtuvo con base en el total de células que expresan SOX-2, ya que nos interesa conocer la expresión de las células cancerosas, identificadas con dicho marcador. Los resultados indican que la administración del ODN antisentido, logró silenciar de manera significativa la expresión del RP en las células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata.

A.



B.

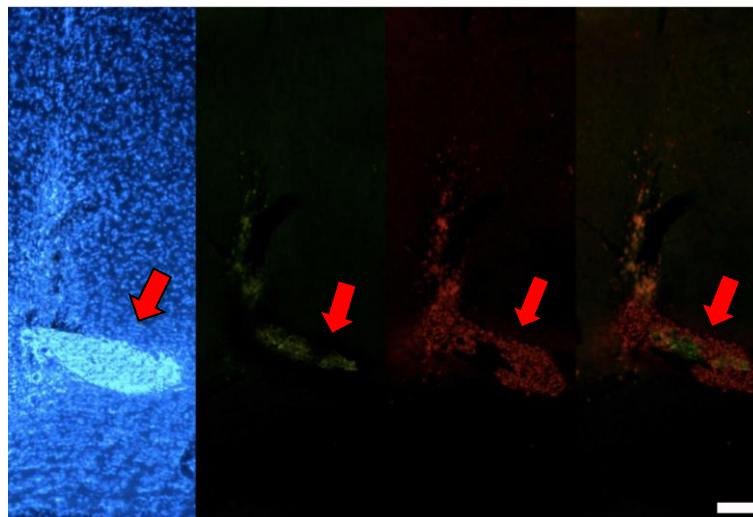


Figura 12. Expresión del RP y SOX-2 en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata. Los núcleos se encuentran teñidos con Hoechst en azul, RP en verde, SOX-2 en rojo y el merge RP/SOX-2 en naranja. A. ODN sentido + P₄. B. ODN antisentido + P₄. El aumento está representado por una escala de 100 μ m.

7.4. Silenciamiento *in vitro* del RP-B mediante ODNs antisentido

Una vez obtenidos los datos del silenciamiento del RP total, se procedió con la evaluación del silenciamiento de la isoforma B del RP. Para ello se realizaron 3 experimentos independientes en los cuales se trató a las células U87 con 0.5 y 1.0 μg de ODNs sentido y antisentido para RP-B. Se utilizó la técnica de Western Blot para determinar la dosis de los ODNs que se usaría en los experimentos *in vivo*. Con los ODNs antisentido se obtuvo un silenciamiento (media \pm S.E.M) de $47.87 \pm 4.84\%$ para 0.5 μg y $63.44 \pm 5.35\%$ para 1.0 μg en la isoforma RP-B, mientras que en el caso de los ODN sentido la expresión de RP-B no disminuyó más del 23%. Para la isoforma A en ninguno de los tratamientos la expresión disminuyó de manera significativa con respecto al mock (**Figura 13**). Con estos resultados se decidió usar la cantidad de 1.0 μg de ODNs en los tratamientos *in vivo*.

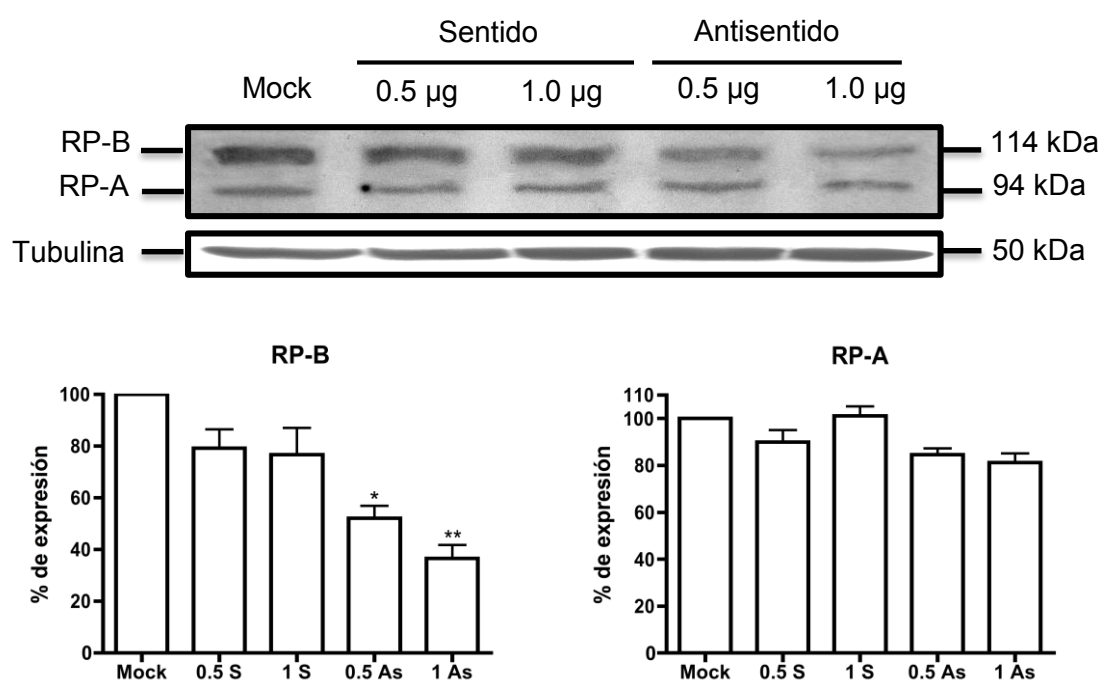


Figura 13. Silenciamiento *in vitro* del RP-B en células U87 derivadas de astrocitoma humano grado IV. *Panel superior.* Blot representativo de 3 experimentos independientes con α tubulina como control de carga. Mock: células tratadas con el reactivo de transfección, sin ODNs. *Panel inferior.* Análisis densitométrico que muestra el silenciamiento logrado con el uso de ODNs antisentido para RP-B y RP-A normalizado al 100% con respecto al Mock. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs Mock. ** $p < 0.05$ vs Mock, 0.5 S y 1 S.

7.5. Silenciamiento del RP-B *in vivo*. Evaluación del área e infiltración de los tumores

Una vez cumplido el esquema de tratamiento, las ratas se eutanizaron, se extrajeron los cerebros que posteriormente se cortaron en secciones de 16 μm y se tiñeron mediante el método de Nissl o con inmunofluorescencia para detectar los marcadores SOX-2 y Ki-67.

En los cortes teñidos con Nissl se observó que el área del tumor en las ratas tratadas con vehículo fue menor en comparación con las ratas tratadas con P_4 , ya sea con ODN sentido o antisentido. Incluso, de manera inesperada, el área del tumor de las ratas tratadas con P_4 + ODN antisentido fue mayor que en aquellas tratadas con la hormona + ODN sentido (**Figura 14**).

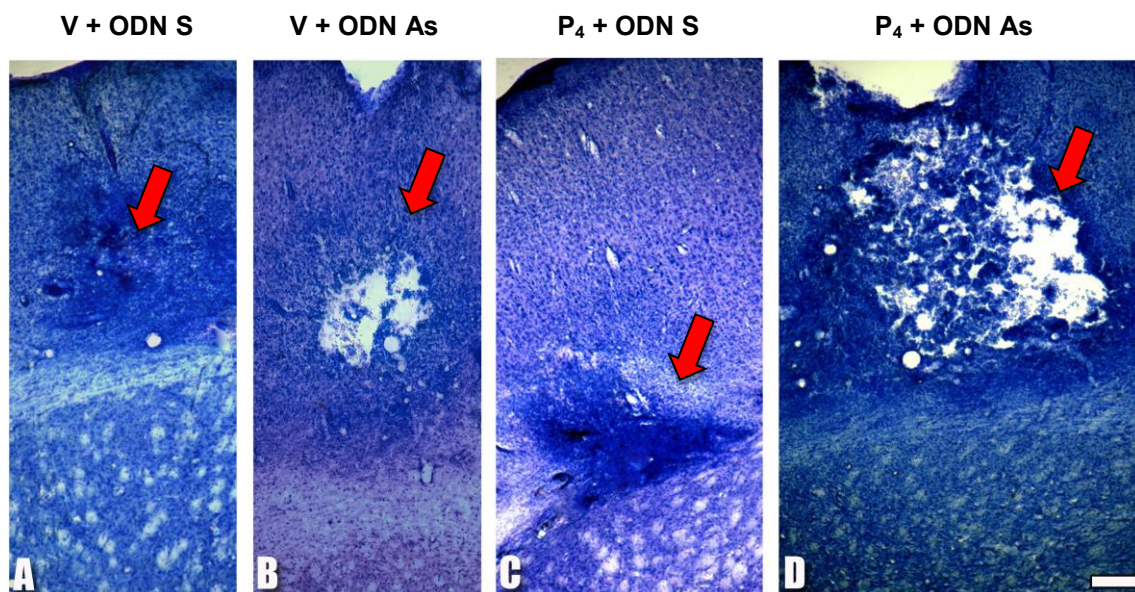


Figura 14. Efectos de los ODNs antisentido contra el RP-B sobre el crecimiento inducido por P_4 en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata. A. ODN sentido + vehículo. B. ODN antisentido + vehículo. C. ODN sentido + P_4 . D. ODN antisentido + P_4 . El aumento está representado por una escala de 200 μm .

Se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para detectar a SOX-2 y Ki-67 en el tejido cerebral de las ratas (**Figura 15**). En los cortes teñidos se comprobó que las células U87 se encontraban en el tejido cerebral y que éstas continuaban en proliferación.

En las ratas tratadas con ODN sentido + vehículo la colocación Ki-67/SOX-2 fue de $65.69 \pm 8.70\%$ (media \pm SEM), mientras que en aquellas con tratamiento de P₄ fue de $72.24 \pm 8.10\%$. Las ratas tratadas con ODN antisentido y vehículo presentaron una colocación de $29.36 \pm 0.52\%$ y con P₄ de $42.22 \pm 7.50\%$. En ambos casos, vehículo y P₄, los tratamientos con ODN antisentido presentaron una colocación significativamente menor comparada con la observada con el ODN sentido.

La P₄ incrementó de manera significativa el área del tumor formado por el implante de células U87 en la corteza cerebral de ratas tratadas tanto con ODNs sentido como antisentido para el RP-B. La administración de ODN antisentido no solo no disminuyó el efecto de la P₄, sino que contrario a lo que se esperaba, lo aumentó (**Figura 16**).

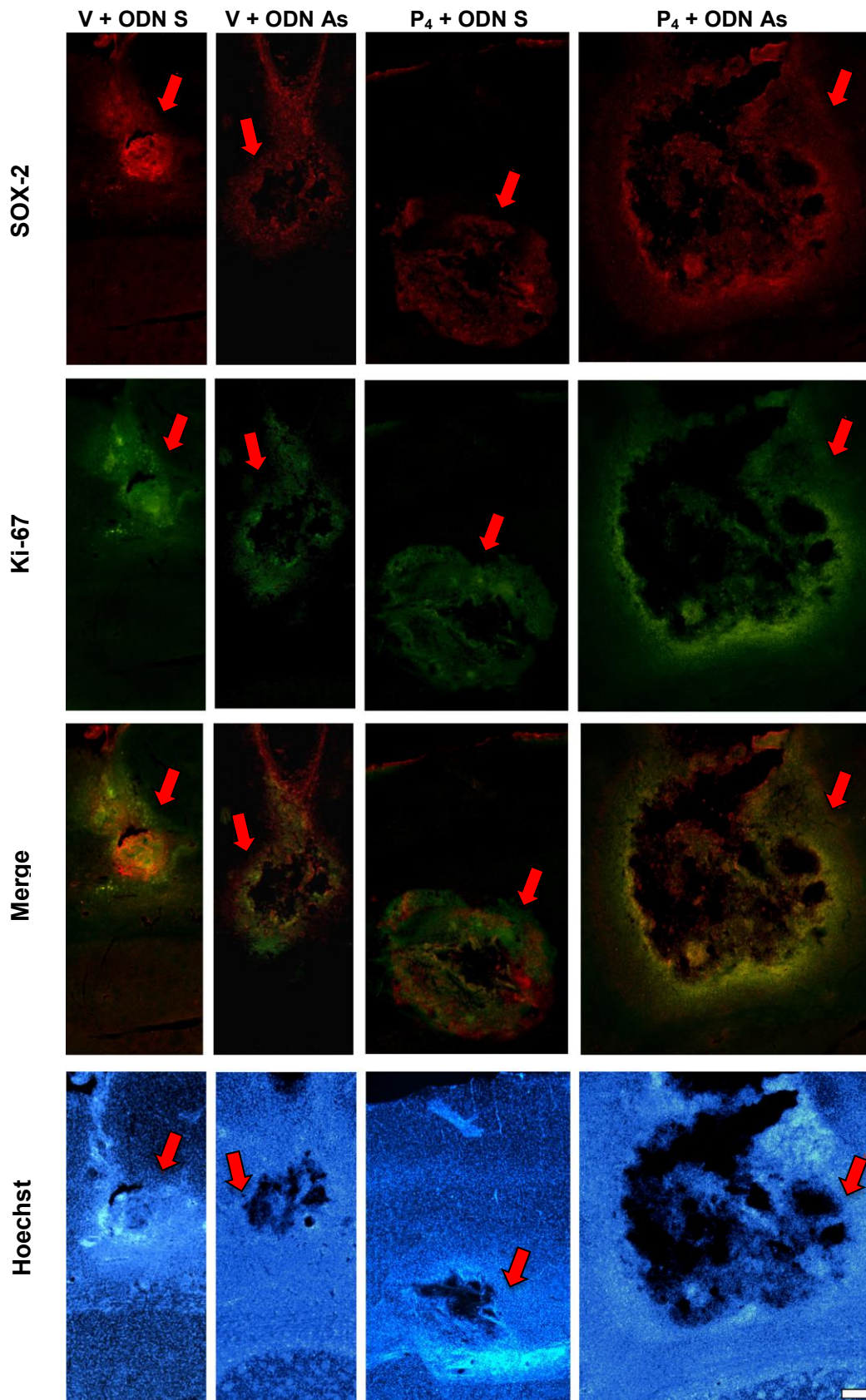


Figura 15. Expresión de SOX-2 y Ki-67 en células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata bajo tratamientos con P₄ y ODNs sentido y antisentido contra RP-B. Los núcleos se encuentran teñidos con Hoechst en azul, Ki-67 en verde, SOX-2 en rojo y el merge Ki-67/SOX-2 en naranja. El aumento está representado por una escala de 200 μ m.

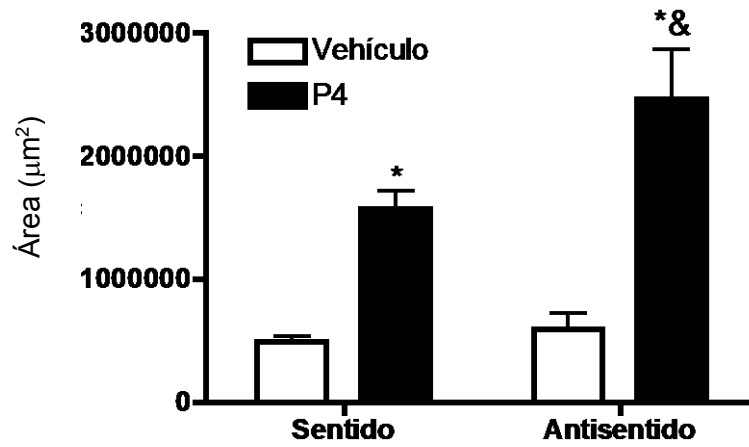


Figura 16. Efectos de los ODN antisentido contra RP-B sobre el área del tumor formado por el implante de células U87 en la corteza cerebral de la rata bajo el tratamiento con P₄. Los datos representan media ± SEM. n= 3. *p<0.05 vs el resto de los tratamientos. &p<0.05 vs Sentido + P₄.

En este caso no se evaluó la distancia de infiltración, debido a que el tamaño del tumor desarrollado con el tratamiento de P₄ + ODN antisentido no permitió distinguir si el tumor había infiltrado o solamente aumentado de tamaño.

8. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de la P₄ y de las isoformas de su receptor intracelular en la progresión tumoral a partir de células derivadas de un astrocitoma humano grado IV implantadas en la corteza cerebral de la rata. En primer lugar, se determinó que la P₄ induce la proliferación celular en la línea U87 y que este efecto es bloqueado por su antagonista, el RU486, lo que sugiere que éste ocurre a través de la interacción de la P₄ con el RP. Este resultado es consistente con los obtenidos en trabajos previos de nuestro laboratorio, donde se estudiaron otras líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos grados III y IV (U373 y D54, respectivamente) tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [21, 64, 65]. Asimismo, se ha reportado que la P₄ incrementa el número de células que se encuentran en la fase S de ciclo celular en las células U373 [64], lo que podría explicar el aumento en el número de células observado en la línea U87.

Posteriormente, con el fin de estudiar el papel de las isoformas del RP en los efectos inducidos por la P₄ *in vivo*, se decidió silenciar la expresión del RP total (RP A+B) y del RP-B en las células U87 implantadas en la corteza cerebral de la rata utilizando ODNs antisentido. Al trabajar con el RP total se observó que en las ratas tratadas con vehículo y ODNs sentido y antisentido las células U87 permanecieron alrededor del sitio del implante y formaron tumores de área similar, mientras que en aquellas tratadas con P₄ y ODN sentido tanto el área como la distancia de infiltración fueron significativamente mayores que en el resto de los grupos. Estos efectos fueron bloqueados por el tratamiento con ODN antisentido, disminuyendo significativamente ambas respuestas (**Figura 11**). Estos resultados concuerdan con los reportes que indican que la P₄ ejerce dichos efectos a través del RP, ya que al bloquear su actividad con un antagonista, o silenciar su expresión con ODNs, las respuestas provocadas por la P₄ se ven abatidas.

También observamos que las células U87 implantadas expresaban los marcadores de glioma y de proliferación en distintas proporciones dependiendo del tratamiento recibido. De manera interesante observamos que en cada

tratamiento de ODNs, la colocación de dichos marcadores en ratas tratadas con vehículo fue significativamente mayor a su respectivo tratamiento con hormona, es decir, la colocación de los marcadores en las ratas tratadas con vehículo + ODN sentido fue mayor que en el tratamiento con P₄ + ODN sentido, de igual manera, en el caso de vehículo + ODN antisentido la colocación de los marcadores fue mayor que con P₄ + ODN antisentido, lo que podría indicar que la P₄ favoreció la progresión de estos tumores, llevando a un proceso de desdiferenciación en el cual las células resultantes expresaran en menor medida el marcador de proliferación expresando en su lugar marcadores de invasión y/o migración. Es importante mencionar que este efecto de desdiferenciación pareciera ser independiente del RP, ya que se observa tanto en las células tratadas con el ODN sentido como en aquellas tratadas con el antisentido.

Al estudiar a la isoforma B del receptor se observó que en los tratamientos con vehículo el área del tumor con los ODN sentido y antisentido fue similar, mientras que en los tratamientos con P₄, el área incrementó de manera significativa con respecto al vehículo bajo ambos tratamientos de ODNs. De manera interesante se observó que el área de los tumores de las ratas tratadas con P₄ + ODN antisentido fue significativamente mayor que en aquellas tratadas con P₄ + ODN sentido (**Figura 16**), lo cual fue un resultado imprevisto, ya que se esperaba que con los ODNs antisentido el área del tumor disminuyera. Sin embargo, es notoria la ausencia de células en la parte interna del tumor desarrollado bajo este tratamiento, lo cual podría sugerir que además del incremento en el área ocasionado por la administración de P₄, se está llevando a cabo otro proceso que altera el desarrollo del tumor. Un posible mecanismo podría estar relacionado con inflamación y necrosis ya que se ha reportado que el microambiente de los glioblastomas está compuesto por diversos tipos de células, entre las que se encuentran células que participan en procesos inflamatorios como los neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos T [87], asimismo, se ha determinado que la necrosis es una característica de los glioblastomas, ya que diversos estudios señalan que está presente en el 85% de los casos [88–91].

Al igual que con el tratamiento de ODNs para silenciar el RP total, se observó que las células implantadas expresaban los marcadores de glioma y proliferación en distintas proporciones dependiendo del tratamiento recibido. En este caso, y a diferencia del tratamiento anterior, los cambios se observaron con respecto a los ODNs, donde los animales tratados con ODNs As mostraron una colocalización Ki-67/SOX-2 significativamente menor comparada con la observada con el ODN sentido con ambos tratamientos de vehículo y P₄. Este resultado podría indicar que el cambio en la proporción de expresión de las isoformas del RP altera la expresión de dichos marcadores, lo cual podría relacionarse con la progresión del tumor y con la expresión de otros marcadores involucrados en inflamación y/o necrosis.

Se ha reportado que el patrón de expresión de las isoformas del RP es determinante en el desarrollo de los tumores, así como en su respuesta ante determinados estímulos. En cáncer de mama, un incremento en la expresión de RP-A está frecuentemente asociado a una mayor agresividad y peor pronóstico de la enfermedad [92]; asimismo, es sabido que RP-A puede regular la actividad transcripcional de otros receptores nucleares, como el de glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos [93, 94], y que éstos están relacionados con la regulación de la inflamación y la respuesta inmune [95]. Adicionalmente, se ha observado que la P₄, a través del RP-A, participa en la modulación de genes relacionados con inflamación, adhesión celular y apoptosis [96].

De igual manera, se ha reportado que una consecuencia de la administración de progestinas en células de cáncer de mama con predominancia de RP-A es la adquisición de sensibilidad a dicha hormona en genes involucrados en la regulación del metabolismo, morfología y adhesión celular, los cuales normalmente no son blancos de la P₄ [97]. Así mismo, se ha observado que el aumento en la expresión de RP-A en células miometriales humanas provoca la activación de genes proinflamatorios además de inhibir los efectos antiinflamatorios de RP-B [98]. Esto puede ocurrir a través de la activación de NF- κ B, el cual es un factor de transcripción proinflamatorio que suprime la expresión de RP-B, lo cual a su vez provoca más inflamación [99].

También, se ha reportado que en células de cáncer de mama y endometrio, la sobreexpresión de RP-A provoca alteraciones en la morfología y adhesión celular, lo que sugiere que la sola sobreexpresión de la isoforma A del RP puede provocar cambios deletéreos en el funcionamiento de la célula [100], además de que una mayor expresión de RP-A puede provocar que esas células invadan el estroma circulante más fácilmente [101].

Al discutir acerca de los efectos de la predominancia de RP-A, es necesario recordar que además del aumento de la proporción de RP-A también existe una disminución en RP-B, y que como ya se ha mencionado, esta isoforma participa en la regulación de gran número de genes blanco de la P₄.

Es sabido que la pérdida de la expresión coordinada de las isoformas de RP conlleva no solamente a la perturbación de la señalización del RP, sino también a alteraciones en la señalización del receptor a estrógenos (RE), y que RP-A, pero no RP-B, en presencia de P₄ disminuye la habilidad de los estrógenos de inducir una respuesta en sus genes blanco [102].

Finalmente, es importante recalcar que en diversos tumores un alto índice de RP está asociado a un fuerte potencial oncogénico y que la identificación de la isoforma predominante en cada tumor es de suma importancia, ya que puede determinar su respuesta ante el tratamiento. En carcinomas mamarios se ha observado que cuando la proporción de RP-A es mayor que la de RP-B éstos responden al tratamiento con antiprogestinas, mientras que con una proporción RP-B:RP-A mayor presentan resistencia a dicho tratamiento [103].

9. CONCLUSIONES

La P₄ promueve el crecimiento e infiltración de un tumor formado a partir del implante de células de glioblastoma humano en la corteza cerebral de la rata a través de su interacción con el RP.

La tasa de expresión de las isoformas del RP desempeña un papel fundamental en la respuesta de los glioblastomas a la P₄.

Las isoformas del RP participan de manera diferencial en la progresión de un glioblastoma *in vivo*, siendo la isoforma RP-A la principalmente implicada en los efectos de la P₄.

10. ABREVIATURAS

3 α -HSOR	3 α -hidroxiesteroide oxidorreductasa
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 β -HSOR	3 β -hidroxiesteroide reductasa
5 α -DPH	5 α -dihidroprogesterona
A	Amperes
AKRs	Aldo-ceto reductasas
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CO ₂	Dióxido de carbono
DBD	Dominio de unión a ADN
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
E ₂	Estradiol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERP	Elemento de respuesta a progesterona
FA	Función de activación transcripcional
FI	Función de inhibición trascricional
FSH	Hormona folículo estimulante
h	Horas
Hsp	Proteína de choque térmico
LBD	Dominio de unión a ligando
LH	Hormona luteinizante
min	Minutos
ODNs	Oligodeoxinucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
P ₄	Progesterona
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pRB	Proteína del retinoblastoma
PRL	Prolactina
RE	Receptor a estrógenos
RP	Receptor a progesterona
RP-A	Isoforma A del receptor a progesterona
RP-B	Isoforma B del receptor a progesterona
s	Segundos
SDRs	Deshidrogenasas/reductasas de cadena corta
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
TBS	Amortiguador tris salino
TGF- α	Factor de crecimiento transformante α
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

11. REFERENCIAS

1. Graham JD, Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502–19
2. Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet J-P, Mattern C, Ghomari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 6:1–22
3. Miller HM, Foxcroft GR, Squires J, Aherne FX (1999) The Effects of Feed Intake and Body Fatness on Progesterone Metabolism in Ovariectomized Gilts. *J Anim Sci* 77:3253–61
4. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA (1995) Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin* 47:329–40
5. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, et al (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 29:313–39
6. 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* 11:5032–43
7. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL (1993) Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13:3577–87
8. 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* 150:192–6
9. Wong MS, Murphy LC (1991) Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T-47D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:39–44
10. Skildum A, Faivre E, Lange C a (2005) Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 19:327–39
11. Burger K, Fahrenholz F, Gimpl G, Gutenberg-universita J (1999) Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 464:25–9
12. Blackmore PF (1993) Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* 5:531–8

13. Lösel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:46–56
14. Jacobsen BM, Horwitz KB (2012) Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357:18–29
15. Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M (2006) Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In: Joseph-Bravo P (ed) *Mol. Endocrinol. Research signpost, Kerala, India*, pp 25–38
16. Prieto G, Saqui-Salces M, Almaraz-Nieves A, Villamar-Cruz O, Néri-Gomez T, Camacho-Arroyo I, Iván Hernández-Molina V, Valdez Rodríguez H (2003) ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educ Química* 14:196–201
17. Hernández-Hernández OT, Rodríguez-Dorantes M, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2010) Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 37:194–200
18. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321–44
19. Glass CK, Rosenfeld MG (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121–41
20. González-Arenas A, Hernández-Hernández OT (2010) Papel de la progesterona y de sus receptores en la proliferación celular de astrocitomas humanos. In: Morales-Montor J, Velázquez-Moctezuma J (eds) *Integr. neuroinmunoendócrina*. UAM-PUIS, México, DF, pp 229–52
21. Cabrera-Muñoz E, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo I (2011) Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem* 11:1663–7
22. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R (1987) Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet* 77:280–2
23. Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E (1993) Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1216:289–92
24. Schumacher M, Guennoun R (2009) Progesterone: Synthesis, Metabolism, Mechanisms of Action, and Effects in the Nervous System. An Overview. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT (eds) *Horm. brain Behav.* pp 1505–60

25. Guiochon-Mantel A (2000) Structure of the progesterone receptor and mode of action of progesterone. In: Sitruk-Ware R, Mishell D (eds) *Progestins antiprogestins Clin. Pract.* Marcel Dekker, pp 1 – 13
26. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA (1996) Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 214:25–8
27. Villamar-Cruz O, Manjarrez-Marmolejo J, Alvarado R, Camacho-Arroyo I (2006) Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull* 69:276–81
28. Cabrera-Muñoz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, García-Becerra R, Camacho-Arroyo I (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:80–4
29. Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I (2000) Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev Invest Clin* 52:686–91
30. Hovland AR, Powell RL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (1998) An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 273:5455–60
31. Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DME, Nitao LK, Richer JK, Sartorius CA, Takimoto GS, Horwitz KB (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* 20:2656–70
32. Raaijmakers HCA, Versteegh JE, Uitdehaag JCM (2009) The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *J Biol Chem* 284:19572–9
33. 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* 7:1256–65
34. 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* 7:1244–55
35. Conneely OM, Lydon JP (2000) Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 65:571–7

36. Giangrande PH, McDonnell DP (1999) The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 54:291–313
37. Fernandez-Valdivia R, Mukherjee A, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, DeMayo FJ, Amato P, Lydon JP (2005) Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse. *Semin Reprod Med* 23:22–37
38. Guerra-Araiza C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martínez A, Lima-Hernández FJ, Camacho-Arroyo I, González-Flores O (2009) Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90:73–81
39. McGowan EM, Clarke CL (1999) Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 13:1657–71
40. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB (2002) Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277:5209–18
41. Melcangi RC, Garcia-Segura LM, Mensah-Nyagan AG (2008) Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 65:777–97
42. Guennoun R, Fiddes RJ, Gouézou M, Lombès M, Baulieu EE (1995) A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3 beta-HSD), is expressed in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 30:287–300
43. Ibanez C, Guennoun R, Liere P, Eychenne B, Pianos A, El-Etr M, Baulieu E-E, Schumacher M (2003) Developmental expression of genes involved in neurosteroidogenesis: 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase in the rat brain. *Endocrinology* 144:2902–11
44. Mellon SH, Griffin LD (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab* 13:35–43
45. Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon M-C, Pelletier G, Vaudry H (2009) Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol* 30:259–301
46. Caruso D, Pesaresi M, Maschi O, Giatti S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC (2010) Effect of short-and long-term gonadectomy on neuroactive steroid levels in the central and peripheral nervous system of male and female rats. *J Neuroendocrinol* 22:1137–47

47. Labombarda F, Pianos A, Liere P, Eychenne B, Gonzalez S, Cambourg A, De Nicola AF, Schumacher M, Guennoun R (2006) Injury elicited increase in spinal cord neurosteroid content analyzed by gas chromatography mass spectrometry. *Endocrinology* 147:1847–59
48. Liu A, Margaiil I, Zhang S, et al (2012) Progesterone receptors: a key for neuroprotection in experimental stroke. *Endocrinology* 153:3747–57
49. Meffre D, Pianos A, Liere P, Eychenne B, Cambourg A, Schumacher M, Stein DG, Guennoun R (2007) Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Endocrinology* 148:2505–17
50. Schumacher M, Mattern C, Ghoumari A, Oudinet JP, Liere P, Labombarda F, Sitruk-Ware R, De Nicola AF, Guennoun R (2014) Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog Neurobiol* 113:6–39
51. Ahmad N, Kumar R (2011) Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 300:1–9
52. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61:25–41
53. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE (2010) Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:2421–7
54. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM (2012) Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338:1080–4
55. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon C-H, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 15:45–56
56. Cheng L, Bao S, Rich JN (2010) Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 80:654–65
57. Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN (2013) Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol Aspects Med* 39:82–101

58. Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Lee HC, Hsu DM, Lin HL, Chen CC, Liu CL, Lee WY, Ho LH (2013) Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant* 22:731–9
59. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109
60. Tihan T, Bloomer MM (2010) Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Semin Diagn Pathol* 27:114–21
61. Arko L, Katsyv I, Park GE, Luan WP, Park JK (2010) Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol Ther* 128:1–36
62. Brandes A, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C (2008) Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 67:139–52
63. Sauvageot CM, Kesari S, Stiles CD (2007) Molecular pathogenesis of adult brain tumors and the role of stem cells. *Neurol Clin* 25:891–924
64. González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, Solano JD, Morales R, González-Arenas A, Cabrera-Muñoz E, Camacho-Arroyo I (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32:129–35
65. Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I (2014) Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int* 2014:393174
66. Guerra-araiza C, Coyoy-salgado A, Camacho-arroyo I (2002) Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *59:105–9*
67. Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I (2003) Changes in Progesterone Receptor Isoforms Content in the Rat Brain During the Oestrous Cycle and After Oestradiol and Progesterone Treatments. *15:984–90*
68. Piña A, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2014) Effects of progesterone in the migration and the activation of actin-binding proteins moesin and cofilin in human astrocytoma cells. *Neuroscience Meeting. Washington, DC*
69. Romieu G, Maudelonde T, Ulmann A, Pujol H, Grenier J, Cavalie G, Khalaf S, Rochefort H (1987) The antiprogestin RU486 in advanced breast cancer: preliminary clinical trial. *Bull Cancer* 74:455–61

70. Klijn JG, de Jong FH, Bakker GH, Lamberts SW, Rodenburg CJ, Alexieva-Figusch J (1989) Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Res* 49:2851–6
71. Grunberg SM, Weiss MH, Russell CA, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Sitruk-Ware R (2006) Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Invest* 24:727–33
72. Esteve JLC, Acosta R, Pérez Y, Campos R, Hernández AV, Texidó CS (2012) Treatment of uterine myoma with 5 or 10 mg mifepristone daily during 6 months, post-treatment evolution over 12 months: double-blind randomised clinical trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 161:202–8
73. Lin MF, Kawachi MH, Stallcup MR, Grunberg SM, Lin FF (1995) Growth inhibition of androgen-insensitive human prostate carcinoma cells by a 19-norsteroid derivative agent, mifepristone. *Prostate* 26:194–204
74. Talaulikar VS, Manyonda I (2012) Progesterone and progesterone receptor modulators in the management of symptomatic uterine fibroids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 165:135–40
75. Llaguno-Munive M, Medina LA, Jurado R, Romero-Piña M, Garcia-Lopez P (2013) Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell Int* 13:29
76. Parthasarathy S, Morales a J, Murphy a a (1994) Antioxidant: a new role for RU-486 and related compounds. *J Clin Invest* 94:1990–5
77. Murphy AA, Zhou MH, Malkapuram S, Santanam N, Parthasarathy S, Sidell N (2000) RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells. *Fertil Steril* 74:1014–9
78. Klijn JG, Setyono-Han B, Foekens J a (2000) Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65:825–30
79. Turgeon JL, Waring DW (2000) Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology* 141:3422–9
80. Weigel NL (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319 (Pt 3:657–67
81. Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C (2002) Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76:267–71

82. Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T (1997) Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 80:2133–40
83. González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56:43–48
84. Tsigkou A, Reis FM, Lee MH, Jiang B, Tosti C, Centini G, Shen F-R, Chen Y-G, Petraglia F (2015) Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms. *Fertil Steril*. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.04.024
85. Eschbacher JM, Yeh R-F, Smirnov I, Feuerstein B, Coons S (2008) SOX2: A Glioma-Specific Marker and a Potential Target for Therapy. *FASEB J* 22:706–18
86. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D (2011) SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 8:139–47
87. Sowers JL, Johnson KM, Conrad C, Patterson JT, Sowers LC (2014) The role of inflammation in brain cancer. *Adv Exp Med Biol* 816:75–105
88. Barker FG, Davis RL, Chang SM, Prados MD (1996) Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. *Cancer* 77:1161–6
89. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H (2006) Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:846–54
90. Miller CR, Dunham CP, Scheithauer BW, Perry A (2006) Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 24:5419–26
91. Pierallini A, Bonamini M, Pantano P, Palmeggiani F, Raguso M, Osti MF, Anaveri G, Bozzao L (1998) Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. *Neuroradiology* 40:150–3
92. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL (2002) Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 72:163–72
93. Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP (1994) The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 14:8356–64

94. McDonnell DP, Shahbaz MM, Vegeto E, Goldman ME (1994) The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48:425–32
95. Tait AS, Butts CL, Sternberg EM (2008) The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *J Leukoc Biol* 84:924–31
96. Santos SJ, Aupperlee MD, Xie J, Durairaj S, Miksicek R, Conrad SE, Leipprandt JR, Tan YS, Schwartz RC, Haslam SZ (2009) Progesterone receptor A-regulated gene expression in mammary organoid cultures. *J Steroid Biochem Mol Biol* 115:161–72
97. Graham JD, Yager ML, Hill HD, Byth K, O'Neill GM, Clarke CL (2005) Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 19:2713–35
98. Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S (2012) Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E719–30
99. Wu Y, Shi X, Guo S-W (2008) The knockdown of progesterone receptor isoform B (PR-B) promotes proliferation in immortalized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 90:1320–3
100. McGowan EM, Weinberger RP, Graham JD, Hill HD, Hughes JAI, O'Neill GM, Clarke CL (2003) Cytoskeletal responsiveness to progestins is dependent on progesterone receptor A levels. *J Mol Endocrinol* 31:241–53
101. Mote PA, Graham JD, Clarke CL (2007) Progesterone receptor isoforms in normal and malignant breast. *Ernst Schering Found Symp Proc* 1:77–107
102. Graham JD, Clarke CL (2002) Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res* 4:187–90
103. Sequeira G, Vanzulli SI, Rojas P, Lamb C, Colombo L, May M, Molinolo A, Lanari C (2014) The effectiveness of nano chemotherapeutic particles combined with mifepristone depends on the PR isoform ratio in preclinical models of breast cancer. *Oncotarget* 5:3246–60