



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL
RECEPTOR A PROGESTERONA EN LA
MIGRACIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS DE
UN GLIOBLASTOMA HUMANO**

TESIS

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

PRESENTA

JORGE CHÁVEZ JIMÉNEZ



CDMX

2017



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. Carolina Guzmán Arriaga
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, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Valeria Hansberg Pastor

SUSTENTANTE:

Jorge Chávez Jiménez

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, bajo la tutoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con los apoyos económicos del proyecto de PAPIIT IN201414, DGAPA, UNAM y la beca de Ayudante de Investigador Nacional Nivel III o Emérito, expediente 12671.

A la Dra. Valeria Hansberg Pastor de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo técnico y asesoría durante este proyecto.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, a la Dra. Elena Zambrano González y a la Dra. Carolina Guzmán Arriaga por el apoyo en la revisión y comentarios a esta tesis.

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Introducción	4
4. Antecedentes	4
4.1 Generalidades del Cáncer	5
4.2 Tumores primarios del sistema nervioso central	5
4.2.1 Astrocitomas	6
4.2.2 Migración celular en glioblastomas	8
4.3 La progesterona	11
4.3.1 Síntesis de la progesterona	11
4.3.2 Mecanismo de acción de la P4	12
4.3.3 El receptor a progesterona	14
4.3.4 La progesterona, el receptor a progesterona y los glioblastomas	17
5. Planteamiento del problema	18
6. Hipótesis	18
7. Objetivos	18
7.1 Objetivo general	18
7.2 Objetivos particulares	18
8. Metodología	19
8.1 Cultivo celular	19
8.2 Tratamientos hormonales	19
8.3 Ensayo de migración	20
8.4 Silenciamiento con oligonucleótidos antisentido	20
8.5 Extracción de proteínas y Western Blot	22
8.6 Análisis estadístico	23
9. Resultados	23
10. Discusión	27
11. Conclusiones	29
12. Referencias	29

1. Abreviaturas

AKRs	Aldo-ceto reductasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
DAG	Diacilglicerol
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
FAK	Proteína cinasa de adhesión focal
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
Hsp	Proteína de choque térmico
IDH	Gen de la isocitrato deshidrogenasa
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL-6	Interleucina-6
IP3	Inositol trifosfato
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MEK	MAPK cinasa
mRP	Receptor membranal a progesterona
P4	Progesterona
PI3K	Inositol trifosfato cinasa
PIK3CA	Gen catalizador de la fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinasa subunidad alfa
PIK3R1	Gen regulador de la fosfatidilinositol 3-cinasa subunidad 1
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PTEN	Gen homólogo de fosfatasa y tensina
RP	Receptor intracelular a progesterona
RU486	Mifepristona, antagonista del RP
SHR	Receptores a hormonas esteroides
SNC	Sistema nervioso central
TAM	Macrófagos asociados a tumor

TP53	Gen de la proteína tumoral P53
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

2. Resumen

Los glioblastomas son los tumores primarios de tipo astrocítico más frecuentes y agresivos del sistema nervioso central y representan entre el 60 y 75% de todos los astrocitomas. El crecimiento de los glioblastomas está regulado por varios factores, entre ellos, las hormonas sexuales como la progesterona (P4). Esta hormona actúa sobre sus células blanco a través de la interacción con su receptor intracelular (RP), el cual exhibe dos isoformas, RP-A y RP-B, que tienen diferentes funciones y regulación: en general se considera que RP-B es un mejor activador transcripcional que RP-A. Recientemente se ha reportado que la P4 a través de su receptor promueve la migración e invasión de células D54 y U251 derivadas de glioblastomas humanos. Sin embargo, se desconoce el papel que cada una de las isoformas ejerce sobre la migración de dichas células. El objetivo de este trabajo fue determinar el papel de las isoformas del RP sobre la migración de las células U251, derivadas de un glioblastoma humano. Inicialmente, las células se trataron con P4 (10 nM) y el antagonista del RP, el RU486 (10 μ M) para determinar el papel del RP sobre la migración celular. Posteriormente las células se silenciaron mediante la transfección con oligonucleótidos antisentido para el RP-A y el RP-B y fueron tratadas con P4 (10 nM) para determinar el efecto de las isoformas sobre la migración celular. Los resultados indican que la P4 induce la migración de las células derivadas de glioblastomas a través del RP, sin embargo, no fue posible determinar cuál de sus isoformas participa en dicho efecto, ya que el oligonucleótido control del RP-B indujo muerte celular debido a una posible interacción con la proteína NPAS3, que participa en la supervivencia celular.

3. Introducción

Los gliomas son los tumores cerebrales primarios malignos más comunes, con una incidencia aproximada de 6 personas por cada 100,000 habitantes [1]. De acuerdo a sus características histológicas se clasifican en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas; siendo los astrocitomas los más frecuentes, representando aproximadamente el 75% de todos los gliomas. Los astrocitomas se clasifican a su vez en cuatro grados de evolución (I-IV) de acuerdo a sus características histopatológicas, de los cuales los de grado IV o glioblastomas son los más frecuentes y agresivos. Los glioblastomas representan el 46.1% de todos los tumores cerebrales malignos [1, 2] la supervivencia media de los pacientes después del diagnóstico es de 12 a 18 meses aproximadamente [3].

Diferentes vías de señalización se ven alteradas en los glioblastomas, principalmente aquellas involucradas en la regulación del ciclo celular (proliferación celular y senescencia), regulación de la apoptosis y necrosis, invasión celular (adhesión y migración) y angiogénesis [4]. En conjunto, estos factores constituyen parte importante en el desarrollo de los glioblastomas. Estudios sugieren que las hormonas sexuales, dentro de ellas la progesterona (P4), son un factor importante en el desarrollo y evolución de los astrocitomas [5]. Muchos de los efectos de la P4 están mediados por su receptor intracelular, RP, el cual presenta dos isoformas (RP-A y RP-B) con distinta expresión, función y regulación.

Existe evidencia que indica que la interacción de la P4 con el RP induce la migración e invasión de células derivadas de un glioblastoma humano *in vitro* e *in vivo* [6, 7]. Sin embargo, se desconoce el papel específico de las isoformas del RP en dicho proceso, por lo que en este trabajo se estudió el papel que juega cada una de ellas sobre la migración de la línea celular U251 derivada de un glioblastoma humano.

4. Antecedentes

4.1 Generalidades del Cáncer

El cáncer es un término empleado para definir a un grupo de enfermedades que se caracterizan por presentar células desdiferenciadas capaces de proliferar sin control. El cáncer puede afectar cualquier parte del organismo y es resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones de casos reportados en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas [8].

En general, las células cancerosas poseen capacidades que favorecen el crecimiento y diseminación del tumor y que son adquiridas durante el desarrollo y progresión del cáncer. Entre ellas se encuentran señales que favorecen la proliferación celular, resistencia a la muerte celular, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis, desregulación de genes supresores de tumores, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la respuesta inmunológica. La comprensión de estos procesos ha permitido diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el desarrollo de fármacos con blancos específicos, sin embargo, hasta la fecha la mayoría de estos tratamientos continúan siendo poco efectivos [9, 10].

4.2 Tumores primarios del sistema nervioso central

Los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) conforman un grupo muy heterogéneo de tumores. Existen alrededor de 100 tumores primarios que presentan diferencias en sus características histopatológicas, en su respuesta a los tratamientos y en las manifestaciones clínicas que afectan la calidad de vida del paciente. En general, los tumores cerebrales primarios se pueden clasificar como no malignos y malignos, de los cuales los meningiomas son los tumores no malignos más frecuentes y los gliomas los tumores malignos más comunes y agresivos [2]. Los gliomas son tumores cerebrales que poseen características de células gliales y de acuerdo a sus características morfológicas, histopatológicas y marcas

moleculares se clasifican en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas; siendo los astrocitomas los más frecuentes y agresivos. La etiología de los gliomas se desconoce, pero se han propuesto diversas teorías que sugieren que estos tumores se originan a partir de células troncales cancerosas, progenitoras neurales o de células con mayor grado de diferenciación que inician la formación del tumor. Por lo tanto, es posible que más de un tipo celular esté involucrado en el origen de los diferentes gliomas [11].

A diferencia de otros tipos de cáncer, los factores de riesgo involucrados en los gliomas no se encuentran bien establecidos. En cuanto a los factores ambientales, la exposición a altas dosis de radiación ionizante es la única causa demostrada que, después de varios años de la exposición, puede provocar la presencia de este tipo de tumores. En relación a los factores genéticos, la aparición de gliomas se ha asociado a algunos trastornos genéticos tales como la Neurofibromatosis tipos 1 y 2 y el Síndrome de Turcot. Además, algunos estudios han sugerido que la susceptibilidad a presentar gliomas aumenta debido a polimorfismos genéticos, principalmente los asociados a genes que participan en la reparación del DNA, regulación del ciclo celular y respuesta inmunológica [4, 12].

4.2.1 Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales derivados de astrocitos o de células troncales cancerosas [13]. Se presentan mayoritariamente en adultos entre los 40 y 60 años de edad [2]. La OMS clasifica a los astrocitomas de acuerdo a su grado de malignidad en una escala del I al IV; siendo los de grado I los menos agresivos y los de grado IV los más agresivos y mortales [7].

Los astrocitomas de grado I o astrocitomas pilocíticos comprenden el 5.2% de todos los tumores cerebrales primarios y generalmente son de pronóstico favorable. Se presentan mayoritariamente en niños y jóvenes y la mayoría de estos tumores se desarrollan en el cerebelo [10, 14]. Son tumores diferenciados y con bajo potencial proliferativo. Histológicamente, existe una variación mínima en la forma y el tamaño

de los núcleos. El tratamiento de este tipo de tumores es mediante resección quirúrgica y/o radio o quimioterapia en caso de no ser posible su resección total. Luego de la resección quirúrgica, el pronóstico de supervivencia de la mayoría de los pacientes es mayor a 15 años [15].

Los astrocitomas de grado II o astrocitomas difusos constituyen el 8.6% de todos los tumores cerebrales primarios y se presentan principalmente en adultos entre los 30 y 40 años de edad. Se desarrollan mayoritariamente en la corteza frontal y lóbulos temporales y presentan infiltración, por lo que es imposible la resección total y se requiere de un tratamiento posterior de radioterapia y/o quimioterapia. Son tumores que presentan células multinucleadas con baja actividad proliferativa y con bordes poco definidos. Estos tumores pueden avanzar a grados más altos y la supervivencia media de los pacientes es de 5 a 10 años [2, 14, 16].

Los astrocitomas de grado III o astrocitomas anaplásicos representan el 6.1% de todos los tumores primarios y se presentan en promedio en adultos de entre 40 y 60 años de edad. Estos tumores muestran mayor desdiferenciación y mayor capacidad de infiltración que los astrocitomas difusos y se localizan principalmente en los hemisferios cerebrales [2, 17]. Histológicamente se caracterizan por presentar atipia nuclear y una alta actividad proliferativa y la supervivencia media de los pacientes es de 2 a 3 años y el tratamiento recomendado es una resección máxima seguida de radio y/o quimioterapia con temozolomida [3, 18].

Los astrocitomas de grado IV o glioblastomas comprenden el 55.1% de los tumores cerebrales primarios y la supervivencia media de los pacientes es de 14-18 meses. La incidencia máxima se encuentra entre los 45 y 70 años de edad. Constituyen el tipo de glioma más agresivo y presentan proliferación celular descontrolada, infiltración, necrosis, inducción de angiogénesis y resistencia a la apoptosis. El tratamiento común para el glioblastoma consiste en neurocirugía, seguido de radio y/o quimioterapia con temozolomida [2, 19, 20].

Se han reportado diversas mutaciones en los astrocitomas, principalmente en genes que participan en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis, dentro de las

cuales destacan mutaciones en genes como el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y el de la proteína tumoral P53 (TP53), que actúan como supresores de tumores. También se ha reportado la amplificación o sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que promueve la división celular. Asimismo, se han reportado mutaciones en el gen del regulador de la fosfatidilinositol 3-cinasa subunidad 1 (PIK3R1), que participa en la regulación negativa de la apoptosis, en el gen del catalizador de la fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinasa subunidad alfa (PIK3CA), que promueve la proliferación celular, y en el gen de la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), que mitiga el daño oxidante [21]. Se ha reportado que en la mayoría de los astrocitomas se presentan anomalías cromosómicas como la pérdida del cromosoma 10, duplicidad del cromosoma 7 y deleciones y translocaciones en el cromosoma 9; además de pérdidas del cromosoma 22 y deleciones en los cromosomas 1 y 7 [22].

4.2.2 Migración celular en glioblastomas

Los glioblastomas son los gliomas más agresivos debido a la capacidad que presentan de infiltrar el tejido adyacente. Esta capacidad depende de las alteraciones que ocurren en las vías de señalización involucradas en procesos de invasión y migración celulares [23]. El proceso de invasión celular es multi-factorial y se lleva a cabo a través de la interacción de las células tumorales con la Matriz Extracelular (ECM) y del contacto con células adyacentes. Además, los diferentes procesos bioquímicos que ocurren en la célula en movimiento [23] desencadenan cambios en la regulación dinámica del citoesqueleto de actina [24].

En el proceso de migración celular ocurren diferentes eventos, los cuales han sido descritos mediante el modelo del movimiento de una célula mesenquimal en un plano [25]:

- a) Polarización: Se refiere a la polarización delantera-trasera, la cual puede deberse a mecanismos intrínsecos de la célula o al ambiente extracelular. Por ejemplo, la adhesión a un sustrato o el contacto con otras células, pueden

generar señales de polarización. Las señales de polarización extracelulares pueden producir el reclutamiento o la activación asimétrica de proteínas dentro de la célula, creando una asimetría funcional que se traduce en una morfológica (protrusión). Algunos quimioatrayentes a menudo inducen la polarización de las células, induciendo así la migración de éstas.

- b) Protrusión: Las protrusiones son extensiones de la membrana celular que ocurren en respuesta a señales quimioatrayentes de la ECM, como son los niveles de AMPc o la presencia de quimiocinas. La deformación de la membrana se da gracias a la polimerización dinámica de los filamentos de actina, llevando así a la membrana hacia adelante.
- c) Adhesión: La adhesión a la EMC modula la migración celular y requiere de la participación de los receptores de adhesión. Los más estudiados son la familia de las integrinas, conformadas por dos subunidades, α y β . Ambas son proteínas transmembranales y se asocian para formar un heterodímero. La activación de estos receptores resulta en la modulación de la movilidad celular (controlado la polimerización de actina).
- d) Retracción: Se refiere al desmontaje de la adhesión en el cual son fundamentales aquellos mecanismos relacionados con la contracción de los filamentos de actomiosina, la relajación de la adhesión inducida por microtúbulos, la endocitosis de los receptores de adhesión y la escisión proteolítica.

Se ha reportado en modelos *in vitro* e *in vivo* que las células tumorales pueden infiltrarse en los tejidos adyacentes mediante diversos patrones: la “migración individual” en la cual las células se diseminan individualmente y la “migración colectiva” en la que las células se diseminan en agrupaciones [26, 27]. A diferencia de otros tipos de cáncer, los glioblastomas no presentan metástasis, en su lugar migran a través de los espacios extracelulares del cerebro, lo que conduce a la formación de tumores distantes [23].

Las vías por las cuales los glioblastomas migran se dividen en dos: el espacio perivascular y el parénquima cerebral; el primero se encuentra lleno de líquido y rodea los vasos sanguíneos y el segundo contiene cuerpos celulares neuronales y gliales, por lo que los espacios extracelulares del parénquima son estrechos y sinuosos y proporcionan una mayor resistencia física que el espacio perivascular. El espacio intersticial del parénquima contiene una matriz compuesta de proteoglicanos, hialuronano y tenascinas, las cuales promueven la migración celular. Interesantemente, los glioblastomas son capaces de secretar tenascina para aumentar su capacidad de migración. Se ha demostrado mediante estudios *in situ* que las células de los glioblastomas migran a través de los vasos sanguíneos y mediante señales quimiotácticas producidas por la bradicinina, induciendo cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} y por ende, inducción de la migración celular [9].

Se ha observado que los glioblastomas tienden a acumular iones Cl^- , lo que activa el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$, el cual interactúa con el citoesqueleto mediante la actina, aumentando así su contractilidad y por ende la migración celular [9].

Algunos estudios han sugerido un papel importante de las células madre cancerosas en la capacidad de infiltración de los glioblastomas. Estas células, caracterizadas por el marcador CD133, muestran un mayor potencial migratorio en comparación con células CD133 negativas derivadas de glioblastomas humanos primarios, xenoinjertos y diferentes líneas celulares derivadas de tumores cerebrales [28].

En los glioblastomas se han descrito diversos factores que influyen en el comportamiento migratorio de las células, tales como la presencia o ausencia de glucosa en el microambiente, la inhibición del microRNA 451 y la inhibición del complejo de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) [29]. Las células de los glioblastomas son capaces de recurrir a moléculas de la microglía y de los macrófagos asociados a tumores (TAM), tales como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), la Interleucina-6 (IL-6) y las metaloproteinasas y así inducir la invasión y migración [30].

Se sabe también que las hormonas sexuales juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de los tumores cerebrales, tales como el estradiol y la progesterona [5, 31].

4.3 La progesterona

4.3.1 Síntesis de la progesterona

La P4 es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol que se sintetiza en los ovarios, los testículos, las glándulas adrenales, la placenta y el cerebro. El primer paso en la biosíntesis de la P4 es la oxidación del colesterol a pregnenolona, mediada por el citocromo P450_{scc} y se lleva a cabo dentro de la mitocondria. Luego, la pregnenolona es transportada al retículo endoplásmico liso para que mediante la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se convierta en P4. Posteriormente, la P4 es metabolizada a 5 α -dihidroprogesterona por la acción de la 5 α -reductasa. La 5 α -dihidroprogesterona se metaboliza a alopregnenolona y/o epialopregnenolona mediante la actividad de la 3 α -hidroxiesteroide oxidorreductasa y la 3 β -hidroxiesteroide oxidorreductasa, respectivamente (**Figura 1**) [32].

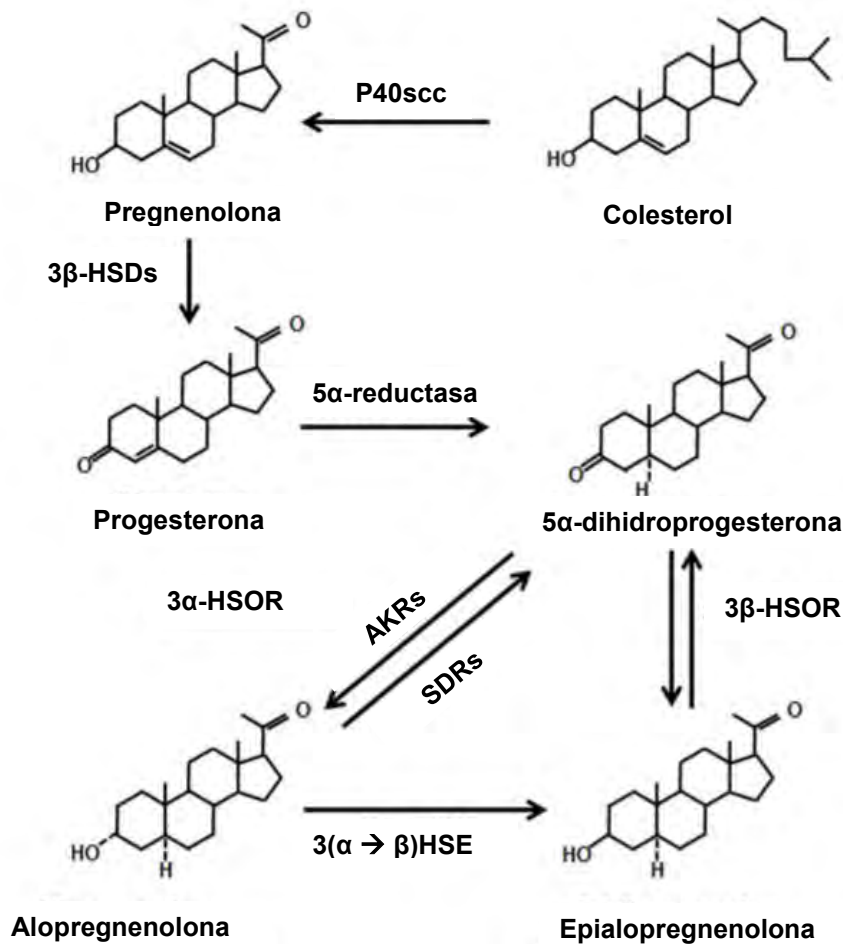


Figura 1. Biosíntesis de la progesterona. La P4 se sintetiza a partir del colesterol, el cual es oxidado a pregnenolona por el citocromo P40scc para luego ser convertida a P4 mediante la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSDs). La P4 se metaboliza a 5α-dihidroprogesterona por la 5α-reductasa y posteriormente a alopregnenolona por la actividad de la 3α-hidroxiesteroide oxidorreductasa (3α-HSOR), mediada por la aldo-ceto reductasa (AKRs) y deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDRs). La 5α-dihidroprogesterona también se puede metabolizar a epialopregnenolona por la actividad de la 3β-hidroxiesteroide oxidorreductasa (3β-HSOR). Modificado de [32].

4.3.2 Mecanismo de acción de la P4

La P4 está implicada en la regulación de diversos procesos y actúa principalmente en útero, ovario, páncreas, pulmón, hueso, timo, glándula mamaria, pituitaria y cerebro. En el SNC, la P4 participa en la regulación de la conducta sexual, diferenciación sexual, excitabilidad neuronal, dolor, respiración, estado de ánimo,

memoria y aprendizaje, neuroprotección y regulación en el crecimiento de tumores cerebrales [33].

La P4 ejerce sus efectos sobre sus células blanco a través de dos mecanismos: clásico (genómico) y no clásico (no genómico) [33]. El mecanismo clásico de la P4 involucra cambios en la transcripción de genes a través de la interacción con el RP, el cual es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de los Receptores a Hormonas Esteroides, SHR por sus siglas en inglés (*Steroid Hormone Receptors*) [34]. Cuando el RP se encuentra en ausencia de ligando, éste se mantiene inactivado ya que se encuentra unido a un complejo proteínico conformado por proteínas de choque térmico Hsp70/Hsp90 y Hsp40, la proteína p23 y co-chaperonas como FKPB 51 y 52 [33]. La unión de la P4 con el RP, permite que este último se disocie del complejo que lo mantiene inactivo y se dimeriza con otra molécula de RP (complejo RP:RP); una vez dimerizado es fosforilado y translocado al núcleo donde interactúa con Elementos de Respuesta a P4 (ERP), los cuales se localizan en la región promotora de distintos genes blanco. El complejo RP:RP recluta correguladores (coactivadores y correpresores) para regular la transcripción de sus genes blanco [35-37]. En el mecanismo no clásico, se sabe que la P4 interactúa con receptores membranales (mRP) acoplados a proteínas G, activando diferentes cascadas de señalización mediante la acción de segundos mensajeros como la fosfolipasa C y el AMPc (**Figura 2**). Aunado a esto, se ha descrito que la P4 puede activar canales de Ca^{2+} e interactuar en sitios alostéricos de los receptores de ácido gamma-aminobutírico (GABA) [38-40].

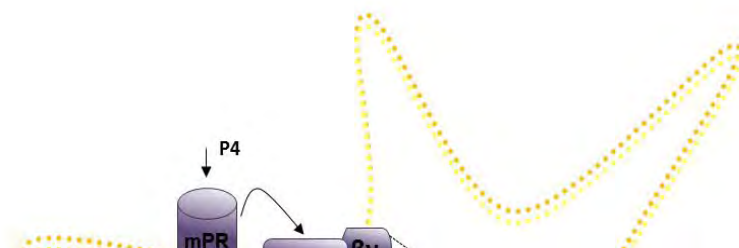


Figura 2. Mecanismo clásico y no clásico de la P4. En el mecanismo clásico, el RP se dimeriza, fosforila y se une a los elementos de respuesta a progesterona (ERP) y activa la transcripción de genes blanco, también puede inducir la activación de la Proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la cual activa la Inositol trifosfato cinasa (PI3-K) y la MAPK cinasa (MEK). En el mecanismo no genómico, la P4 interactúa con el mRP y con canales iónicos y activa diferentes cascadas de señalización por la activación de mensajeros intracelulares: La subunidad α de la proteína G induce la formación de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), activando así a la Proteína cinasa A (PKA). Las subunidades β y γ activan a la Fosfolipasa C (PLC), la cual produce Inositol trifosfato (IP3) y Diacilglicerol (DAG); el IP3 induce la liberación de calcio (Ca^{2+}) y el DAG activa la Proteína cinasa C (PKC). Modificado de [33].

4.3.3 El receptor a progesterona

El RP exhibe dos isoformas (RP-A y RP-B) de las cuales RP-B es estructuralmente diferente a RP-A, ya que contiene en su región N-terminal 164 aminoácidos más en humanos. En nuestra especie, RP-A pesa 94 kDa y RP-B 116 kDa y ambas están codificadas por el mismo gen localizado en el cromosoma 11q22-23. La cadena polipeptídica que comparten ambas isoformas se divide en un extremo amino terminal con una función de activación (FA1) y una función de inhibición (FI) de genes blanco, una región conectora y un carboxilo terminal con un dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio con función de activación dependiente de ligando (FA2), además de una región conservada denominada dominio de unión al DNA (DBD) y una señal de localización nuclear (NLS) y de unión a chaperonas Hsp90. Estructuralmente, RP-B tiene una función de activación (FA3) en su N-terminal que le permite interactuar con FA1 y FA2 y ejercer efectos alostéricos a nivel conformacional, y funcional sobre otros dominios del receptor que le confieren en conjunto una mayor actividad transcripcional (**Figura 3**). La actividad fisiológica del RP depende de la tasa de expresión de ambas isoformas (RP-A:RP-B). Estudios de microarreglos han demostrado que RP-A y RP-B tienen diferentes genes blanco y en algunos casos ejercen efectos opuestos; pues RP-A actúa principalmente como un represor de la expresión de genes mientras que RP-B es un mejor activador transcripcional; sin embargo, la función del RP dependerá de la tasa de expresión de ambas isoformas [34].

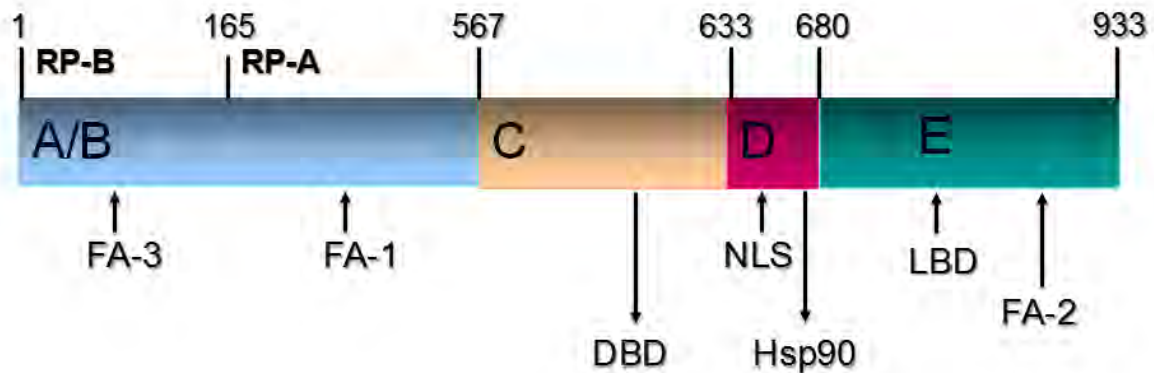


Figura 3. Representación esquemática de las regiones del RP. La cadena polipeptídica que comparten ambas isoformas se divide en un extremo amino terminal con una función de activación (FA1) y una función de inhibición (FI) y un carboxilo terminal con un dominio de unión a ligando (LBD), un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio con función de activación dependiente de ligando (FA2). En el caso de RP-B, éste tiene una función de activación en su amino terminal (FA3) que le confiere una mayor actividad transcripcional. Modificado de [33].

La respuesta al antagonista principal de la P4, la mifepristona (RU486), depende de la tasa de expresión del RP [34]. El RU486 compite por el sitio de unión al RP y muestra una mayor afinidad por el RP que la P4, por lo cual se une preferentemente al receptor. Al interactuar el RU486 con el RP, la fuerza de unión de las proteínas de choque térmico anteriormente mencionadas aumenta, impidiendo que el RP se active y se una a los ERP y así, evita el reclutamiento de la maquinaria transcripcional [41].

4.3.4 La progesterona, el receptor a progesterona y los glioblastomas

El receptor intracelular a P4 juega un papel importante en el desarrollo de los glioblastomas. Se ha demostrado que la P4 induce la proliferación de células U373 y D54 derivadas de un astrocitoma de grado III y de grado IV, respectivamente. Este efecto se bloquea con el tratamiento con el antagonista de la P4, RU486, lo que sugiere que este es mediado por la interacción con el RP [31]. Además, se ha demostrado que la P4 a través de la interacción con el RP induce la expresión de genes que regulan el ciclo celular, la proliferación y la angiogénesis (ciclina D-1, EGFR y VEGF) en células D54 [22].

Como se mencionó anteriormente, el papel fisiológico del RP depende de la tasa de expresión de sus isoformas, lo que sugiere que existen diversos mecanismos que regulan la expresión de las mismas. En los astrocitomas, la expresión del RP se encuentra relacionada con el grado de evolución del tumor, siendo RP-B la de mayor expresión en los glioblastomas. Aunado a esto, se sabe que RP-A inhibe el efecto de la P4 sobre el crecimiento de las células de astrocitomas [42, 43]. A nivel de la regulación de la expresión del RP, se sabe que la metilación del DNA en la línea U373 juega un papel importante en la expresión del RP-B [44, 45].

Respecto a la migración e invasión celular, se sabe que la activación de las isoformas de la PKC alfa y delta incrementan la invasión y migración de las líneas celulares U251 y U87, derivadas de glioblastomas humanos, efecto que se bloquea tras la administración del antagonista de la P4 (RU486) [46]. Además, recientemente hemos reportado que la P4 (10 nM) induce la migración e invasión *in vivo* e *in vitro* en células D54 y U251 mediante la interacción con el RP [6, 7].

5. Planteamiento del problema

Se sabe que la P4 juega un papel importante en la progresión de los glioblastomas y que ejerce sus efectos a través de la interacción con su receptor intracelular, el cual exhibe dos isoformas, RP-A y RP-B. Además, se ha reportado que la interacción de la P4 con el RP induce la migración e invasión de células derivadas de un glioblastoma humano. Sin embargo, se desconoce el papel específico de RP-A y RP-B en la migración de células derivadas de un glioblastoma humano.

6. Hipótesis

Si el RP-B es un mejor activador transcripcional que RP-A y se encuentra en mayor proporción en los glioblastomas, entonces su silenciamiento disminuirá la migración de las células derivadas de un glioblastoma humano.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Conocer el papel de las isoformas del RP sobre la migración de la línea celular U251, derivada de un glioblastoma humano.

7.2 Objetivos particulares

- Evaluar la participación de la P4 y del RP sobre la migración de las células U251, derivadas de un glioblastoma humano.
- Silenciar al RP total (RP-AB) y a RP-B mediante oligonucleótidos antisentido.
- Determinar el efecto del silenciamiento del RP total (RP-AB) y de RP-B sobre la migración de las células U251.

8. Metodología

8.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular U251, derivada de un glioblastoma humano proveniente de una biopsia de un hombre caucásico. Se cultivaron 200,000 células en cajas Petri con medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con rojo fenol, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato de sodio 1 mM, antibióticos 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y bicarbonato de sodio en condiciones de aire al 95% y CO₂ al 5% a 37 °C.

8.2 Tratamientos hormonales

Para determinar el efecto de la P4 y la participación del RP en la migración de la línea celular U251, se utilizaron los siguientes tratamientos:

- a) Vehículo: 0.02% ciclodextrina (CDX).
- b) P4: 10 nM
- c) RU486: 10 μM
- d) Tratamiento conjunto: P4, 10 nM + RU486, 10 μM.

Se ha reportado que la P4 a una concentración de 10 nM induce la migración e invasión en células derivadas de glioblastomas humanos [6] y que el RU486 a la concentración de 10 μM bloquea el efecto de la P4 en la proliferación de células U373 y D54 derivadas de un astrocitoma de grado III y de grado IV, respectivamente [31].

Para los ensayos de migración con las isoformas silenciadas, se realizaron tratamientos únicamente con vehículo y P4.

8.3 Ensayo de migración

Para determinar el efecto de la P4 y el papel de las isoformas del RP sobre la migración de la línea celular U251 se utilizó el ensayo de “cierre de herida”. En cajas de 6 pozos se sembraron 200,000 células por pozo con medio DMEM completo (mencionado en el punto 8.1) y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 70-80%, posteriormente se cambió el medio a DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB sin hormonas al 10% para asegurar que el efecto observado se debe a los tratamientos y no a las hormonas presentes en el SFB y se incubaron durante 24h. Las células se lavaron 2 veces con PBS, se les agregaron 500 μ L de PBS-EDTA a cada pozo e inmediatamente, con una punta de pipeta de 200 μ L, se generó una estría en la monocapa celular. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS con la finalidad de eliminar a las células desprendidas. A continuación, se colocaron 2 mL de medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB sin hormonas al 10% y para descartar que el efecto observado en el número de células que migran se deba a un aumento en la proliferación, se agregó un inhibidor de la síntesis de DNA: clorhidrato de citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C) a una concentración final de 10 μ M y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo y sin retirar el medio, se adicionaron los tratamientos hormonales descritos en el punto 8.2 y se tomaron fotografías con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X en la zona de herida a las 0, 3, 6, 12 y 24 h.

8.4 Silenciamiento con oligonucleótidos antisentido

Para evaluar el papel de las isoformas del RP sobre la migración de las células U251 se realizó el silenciamiento del RP total (AB) y RP-B mediante la transfección con oligonucleótidos antisentido (AS), la cual es una secuencia de DNA complementaria al RNAm que inhibe su expresión. Se sembraron 180,000 células U251 en las condiciones mencionadas en la sección 8.1 hasta alcanzar una confluencia del 30% para transfectar con oligonucleótidos sentido (secuencia de DNA que no se une al RNAm y por lo tanto no inhibe su expresión, usado así como oligonucleótido de

control de transfección) y antisentido de RP-AB y del 40-50% para transfectar con oligonucleótidos sentido y antisentido de RP-B (**Tabla 1**). Para realizar la transfección se utilizó el vehículo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, USA), el cual es un agente de transfección de ácidos nucleicos (DNA y RNA) en células eucariotas. Las células en la confluencia deseada se incubaron con: a) 0.5 µg de oligonucleótido sentido y antisentido para RP-AB (S RP-AB y AS RP-AB, respectivamente); b) 1.0 µg de oligonucleótido S RP-B y de oligonucleótido AS RP-B y c) se incluyó un control con el vehículo de transfección Lipofectamina. Para realizar la transfección (por pozo), se mezclaron 6 µL de Lipofectamina con 94 µL de medio DMEM sin rojo fenol y sin suplementar y se dejaron reposar por 30-45 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se mezcló con los respectivos oligonucleótido (S o AS), previamente diluidos en 100 µL de medio DMEM sin rojo fenol y sin suplementar, y se dejó reposar la mezcla por 15 min. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se dejaron en 800 µL por pozo de medio DMEM sin rojo fenol y sin suplementar. Posteriormente, se les agregó la mezcla de Lipofectamina y oligonucleótidos (200 µL) por goteo a cada pozo. Las células transfectadas se incubaron durante 48 h para evaluar el grado de silenciamiento de la isoformas por Western Blot. Para los ensayos de migración, las células transfectadas se incubaron durante toda la noche y a continuación se les cambió el medio por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB con hormonas y sin antibiótico con la finalidad de propiciar la recuperación de las células por 24 h para RP-AB y por 12 h para RP-B. Después, se realizó un cambio de medio por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB sin hormonas al 10% durante 24 h para poner los tratamientos y se llevó a cabo el ensayo de migración como se describió en el apartado 8.3.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el silenciamiento de las isoformas del RP.

Oligonucleótido	Secuencia
S RP-AB	5'- TTATGCCTTACCATGTGGCA - 3'
AS RP-AB	5' - TGCCACATGGTAAGGCATAA - 3'
S RP-B	5' - AGTCGCTGTCCGACGTGGAG - 3'
AS RP-B	5' - CTCCACGTCCGACAGCGACT - 3'

8.5 Extracción de proteínas y Western Blot

Para determinar el grado de silenciamiento de las isoformas del RP se realizó la técnica de Western Blot. Las células transfectadas se despegaron con 1 mL de PBS-EDTA, se centrifugaron y se lisaron con buffer de lisis RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 1% y SDS 0.1%) adicionado con inhibidores de proteasas y EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich, USA) y se cuantificaron las proteínas totales con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE 7.5% a 100 V y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda durante 7 h a 40 mA. Posteriormente, la membrana se incubó con una solución de leche libre de grasa al 3% y albúmina sérica bovina al 2% por 2 h a 37 °C y en agitación constante. A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo primario de ratón anti-RP humano en una concentración de 0.2 µg/µL durante 48 h a 4 °C. La membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón) conjugado a peroxidasa de rábano durante 45 min en una dilución de 1:5000. Se realizaron nuevamente 3 lavados y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific, USA, Kodak). Finalmente, se determinó el contenido de la proteína α -tubulina, usada como control de carga. Para ello se incubó la membrana con glicina a pH ácido (0.1 M, pH 2.5, SDS 0.5%) a temperatura ambiente por 15 min, se bloqueó y se incubó con un anticuerpo primario anti- α -tubulina a una concentración de 0.2 µg/µL a 4°C por toda la noche. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces

con TBS-Tween 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente y se detectaron las proteínas por quimioluminiscencia.

8.6 Análisis estadístico

El programa Image J se utilizó para cuantificar el número de células que cerraron la herida en los ensayos de migración y para realizar el análisis densitométrico del contenido de las isoformas RP-A y RP-B. Los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6 utilizando una ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

9. Resultados

9.1 Efecto de la P4 sobre la migración en la línea celular U251

Inicialmente se evaluó el efecto de la P4 sobre la migración en las células U251, derivada de un glioblastoma humano, mediante el ensayo de “cierre de herida”. La P4 aumentó significativamente el número de células que migraron a las 6, 12 y 24 h, en comparación con el vehículo. El RU486 bloqueó significativamente el efecto de la P4 a partir de las 3 h y hasta las 24 h (**Figura 4**).

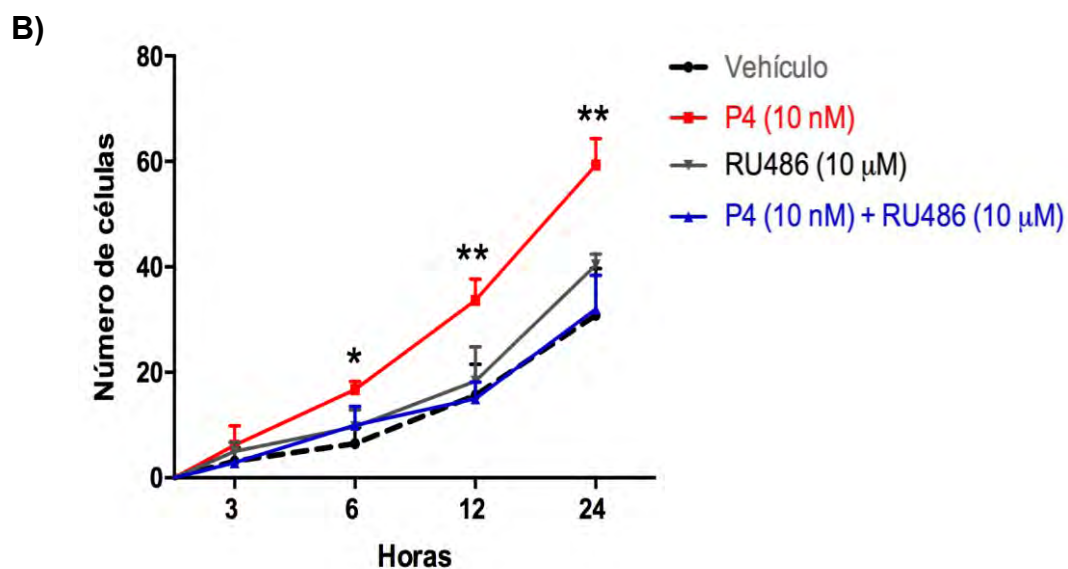
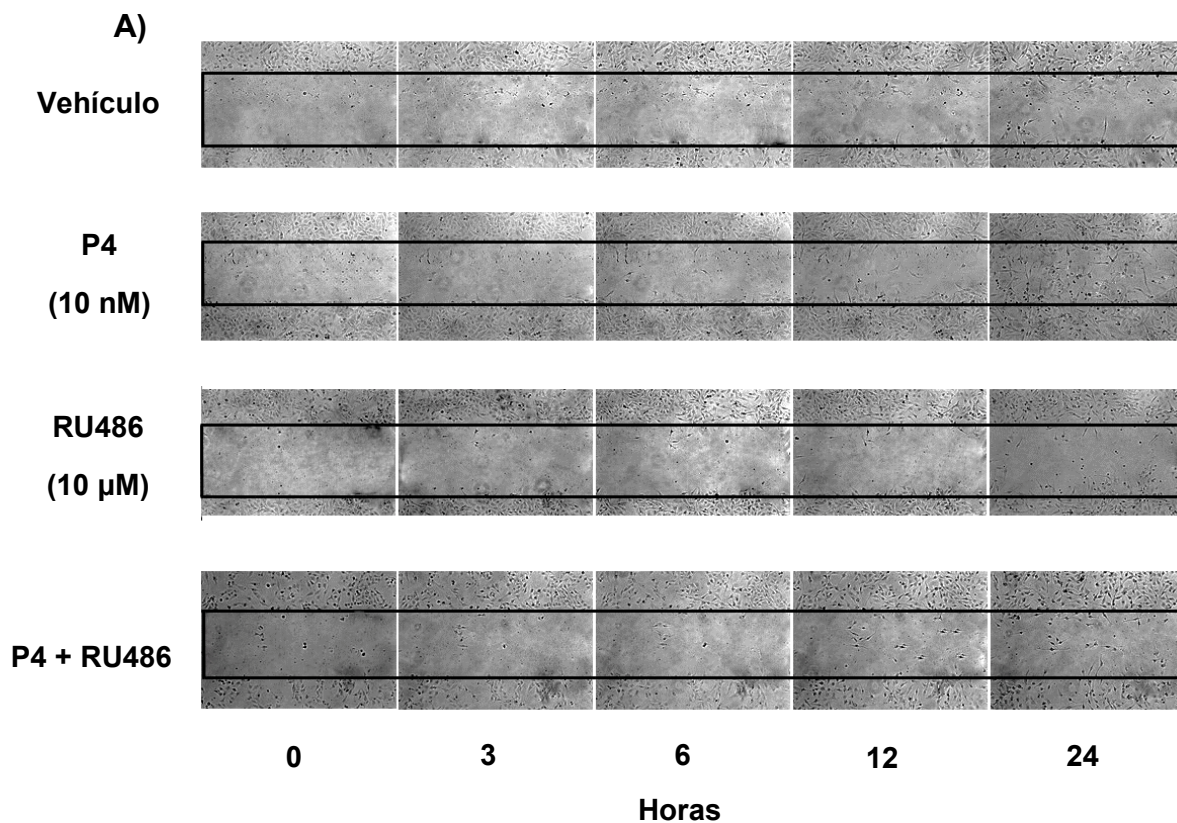


Figura 4. Efecto de la P4 sobre la migración en la línea celular U251. A) Imágenes representativas a las 0, 3, 6, 12 y 24 h del ensayo de cierre de herida. Las células fueron tratadas con ciclodextrina 0.02% (V), P4 (10 nM), RU486 (10 μM) y P4 + RU486. B) Efecto de la P4 sobre la migración en la línea celular U251. Gráfica que representa el número de células que migraron después de los tratamientos con V, P4, RU486 y P4 + RU486. n = 3. *P<0.05 vs. Vehículo, **P<0.001 vs. todos los grupos.

9.2 Papel de las isoformas del RP sobre la migración en la línea celular U251

Posteriormente se determinó el papel que tienen las isoformas del RP (A y B) sobre la migración en la línea celular U251, derivada de un glioblastoma humano, mediante el ensayo de “cierre de herida” y mediante el silenciamiento de ambas isoformas (RP-AB) y del RP-B por transfección con oligonucleótidos antisentido. La transfección con oligonucleótidos sentido para RP-AB (control) y tratadas con P4 (10 nM) aumentaron significativamente el número de células que migran a las 6, 12 y 24 h en comparación con los demás tratamientos. Una disminución significativa en el número de células que migran se observa cuando las células son transfectadas con oligonucleótidos antisentido para RP-AB y tratadas con V y P4 en comparación con el tratamiento control (**Figura 5**).

Interesantemente, al realizar la transfección con oligonucleótidos sentido para RP-B, se observó que la mayoría de las células transfectadas comenzaron a morir desde las 3 h del tratamiento (**Figura 6**), lo que imposibilitó realizar más experimentos con dicho tratamiento, por lo que en la **Figura 5B** solamente se muestran los datos con los otros tratamientos.

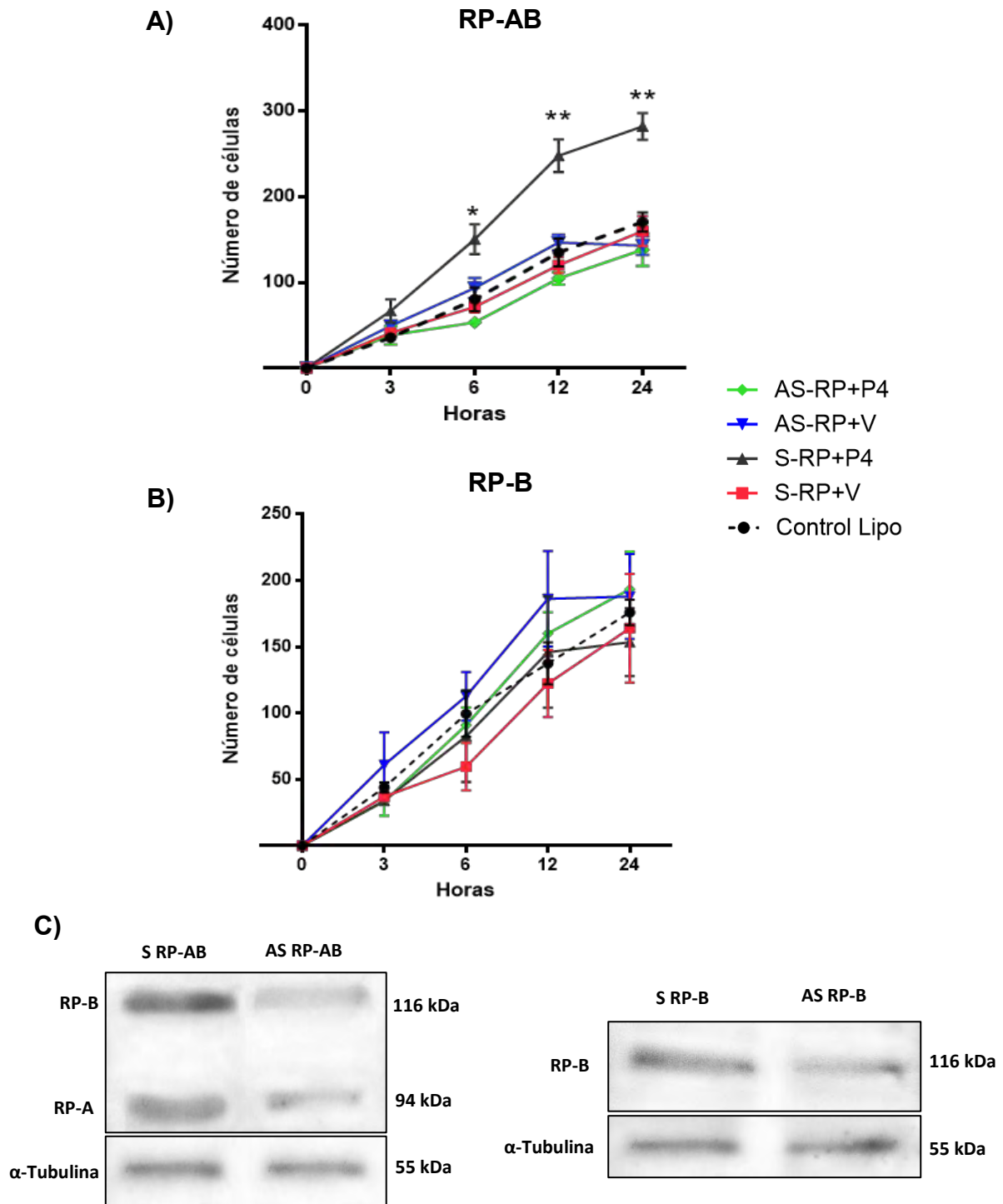


Figura 5. Papel de las isoformas del RP sobre la migración de las células U251, derivadas de un glioblastoma humano. Las células fueron tratadas con oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (AS) para RP-AB (figura A) y RP-B (figura B) y tratadas con ciclodextrina 0.02% (V) y P4 (10 nM). En las gráficas se muestra el número de células que migraron después de silenciar RP-AB y RP-B (figura A y B, respectivamente). C) Western Blots representativos del silenciamiento de las isoformas del RP con S y AS. n= 3 y 2 para RP-AB y RP-B, respectivamente. *P<0.05 vs. todos los grupos, **P<0.001 vs. todos los grupos.

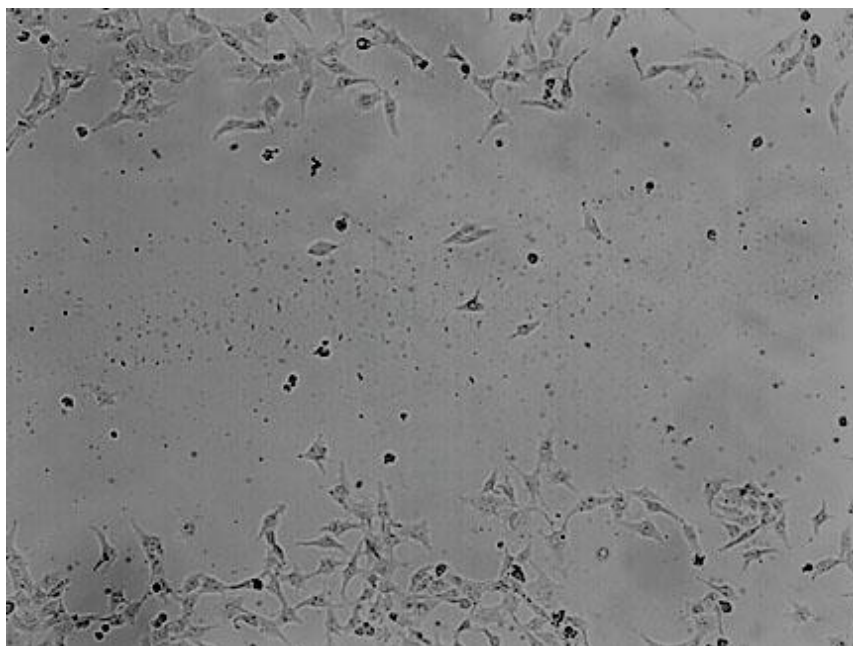


Figura 6. Imagen representativa de las células muertas con la transfección con oligonucleótidos sentido para RP-B

10. Discusión

Uno de los principales obstáculos en el tratamiento de los glioblastomas es enfrentar su capacidad infiltrativa por los procesos de invasión y migración, por lo que es imposible una resección total, ocasionando recurrencia del tumor [29]. La migración celular de los glioblastomas es un proceso en el que influyen diversos factores, tales como las hormonas sexuales. La P4 es una hormona sexual que se sintetiza a partir del colesterol y ejerce sus efectos a través de su interacción con su receptor intracelular, el cual exhibe dos isoformas, RP-A y RP-B. Recientemente se reportó que la P4 induce la migración e invasión celulares en células derivadas de astrocitomas humanos a través de su interacción el RP [39], por lo que en el presente trabajo se estudió el papel de las isoformas del RP sobre la migración en células U251, derivadas de un glioblastoma humano.

En la **figura 4** se observa el efecto que la P4 ejerce sobre la migración de las células U251. A las 6, 12 y 24 h de tratamiento se observa que el número de células que migran aumenta significativamente en comparación con los demás grupos. El

tratamiento con el antagonista de la P4, el RU486, bloquea significativamente el efecto de la P4 sobre la migración celular. Los resultados de este experimento demuestran que el efecto que la P4 ejerce sobre la migración en la línea celular U251 es debido a la interacción con su receptor intracelular. Nuestros resultados concuerdan con estudios que han demostrado en líneas celulares de cáncer de mama y de glioblastomas la participación del RP en la migración celular [6, 29].

En la **figura 5A** se observa que hay un aumento significativo en el número de células cuando éstas son tratadas con P4 (10 nM) y transfectadas con oligonucleótidos sentido (control) para el RP-AB en comparación con los demás grupos. Una disminución en el número de células que migran se observa cuando son transfectadas con oligonucleótidos antisentido para RP-AB y tratadas con V y P4. Estos resultados demuestran que la expresión del RP-AB es importante en el proceso de migración en células U251, derivadas de un glioblastoma humano.

De manera interesante, se observa que cuando las células son transfectadas con oligonucleótidos sentido para RP-B, éstas comienzan a estresarse y presentar muerte celular (**Figura 6**), por lo que los resultados mostrados en la **figura 5B** son insuficientes para poder conocer el papel de las isoformas del RP en la migración de la línea celular U251. Al realizar un análisis BLAST de la secuencia del oligonucleótido sentido para RP-B (descrito en la sección de metodología) en la base de datos: *National Center for Biotechnology Information*, se encontró que existe posibilidad de que dicho oligonucleótido pueda ligarse al gen de la proteína NPAS3 (por sus siglas en inglés: Neuronal PAS domain protein 3). Existe evidencia que demuestra la expresión de dicha proteína en los cuatro grados de astrocitomas, observándose una menor expresión o ausencia de expresión en los astrocitomas de mayor grado (grados III y IV), relacionándose así el grado de expresión con el grado de malignidad del tumor. Dichos resultados se asociaron a mutaciones y cambios epigenéticos en el DNA que codifica para la proteína NPAS3 en los glioblastomas. Asimismo, se reportó que esta proteína participa de manera importante en procesos de proliferación, apoptosis, migración e invasión, viabilidad y como supresor de tumor. En cuanto a la viabilidad se refiere, se reportó que si dicha proteína está sobre-expresada, la viabilidad disminuye y aumenta la apoptosis

[47], por lo que al transfectar las células con los oligonucleótidos sentido para RP-B, estos podrían estar regulando la expresión de la proteína NPAS3, disminuyendo así su viabilidad y aumentando la apoptosis, sin embargo, esta hipótesis tiene que ser comprobada mediante ensayos de viabilidad y apoptosis.

Debido a lo anterior, en este trabajo no fue posible determinar el papel de las isoformas del RP en la migración de la línea celular U251, derivada de un glioblastoma humano.

11. Conclusiones

Se corroboró que la P4 induce la migración en la línea celular U251, derivada de un glioblastoma humano, a través de la interacción con su receptor intracelular.

Los resultados obtenidos no permitieron determinar el papel de las isoformas del RP en la migración de la línea celular U251, derivada de un glioblastoma humano, debido a la posible interacción del oligonucleótido control para RP-B con la proteína NPAS3, de importancia en la supervivencia de las células, como se describió en la sección 10.

12. Referencias

1. Weller, M., et al., *Glioma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15017.
2. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro Oncol, 2015. **17 Suppl 4**: p. iv1-iv62.
3. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
4. Pojo M, C.B., *Molecular hallmarks of gliomas*. Molecular targets of CNS tumors, 2011: p. 177-200.

5. Camacho-Arroyo, I., et al., *Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas*. J Neurooncol, 2000. **49**(1): p. 1-7.
6. Pina-Medina, A.G., et al., *Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells*. Steroids, 2016. **105**: p. 19-25.
7. German-Castelan, L., et al., *Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 393174.
8. OMS *Cáncer. Nota descriptiva 297. Centro de prensa*. 2015.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
10. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
11. Modrek, A.S., N.S. Bayin, and D.G. Placantonakis, *Brain stem cells as the cell of origin in glioma*. World J Stem Cells, 2014. **6**(1): p. 43-52.
12. Ichimura, K., et al., *Molecular pathogenesis of astrocytic tumours*. J Neurooncol, 2004. **70**(2): p. 137-60.
13. Alcantara Llaguno, S., et al., *Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model*. Cancer Cell, 2009. **15**(1): p. 45-56.
14. *Childhood Astrocytomas Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*2002: Bethesda (MD).
15. Tihan, T. and M.M. Bloomer, *Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective*. Semin Diagn Pathol, 2010. **27**(2): p. 114-21.
16. Arko, L., et al., *Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 1-36.
17. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
18. Buckner, J.C., et al., *Central nervous system tumors*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(10): p. 1271-86.
19. Zorzan, M., et al., *Molecular targets in glioblastoma*. Future Oncol, 2015. **11**(9): p. 1407-20.

20. Hadjipanayis, C.G. and E.G. Van Meir, *Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies*. Trends Mol Med, 2009. **15**(11): p. 519-30.
21. Aum, D.J., et al., *Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma*. Neurosurg Focus, 2014. **37**(6): p. E11.
22. Bigner, S.H., J. Mark, and D.D. Bigner, *Cytogenetics of human brain tumors*. Cancer Genet Cytogenet, 1990. **47**(2): p. 141-54.
23. Cuddapah, V.A., et al., *A neurocentric perspective on glioma invasion*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(7): p. 455-65.
24. Nagai, S., et al., *Role of the cofilin activity cycle in astrocytoma migration and invasion*. Genes Cancer, 2011. **2**(9): p. 859-69.
25. Claire M. Wells, M.P., *Cell Migration*. Second ed 2011: Humana Press.
26. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
27. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
28. Ortensi, B., et al., *Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(1): p. 18.
29. Kim, Y., *Regulation of cell proliferation and migration in glioblastoma: new therapeutic approach*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 53.
30. Razavi, S.M., et al., *Immune Evasion Strategies of Glioblastoma*. Front Surg, 2016. **3**: p. 11.
31. Gonzalez-Aguero, G., et al., *Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines*. Endocrine, 2007. **32**(2): p. 129-35.
32. Schumacher, M., et al., *Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair*. Front Neurosci, 2012. **6**: p. 10.
33. Camacho-Arroyo, I., *Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain*. Recent Research Developments in Life Sciences, Research Signpost, 2003: p. 221-242.
34. Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M, *Mechanism of Progesterone Action in the Brain*, in *Hormones, Brain, and Behavior*, 2017: Oxford: Academic Press;.
35. Hernandez-Hernandez, O.T., T.K. Gonzalez-Garcia, and I. Camacho-Arroyo, *Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF*,

- EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **132**(1-2): p. 127-34.
36. Gonzalez-Arenas, A., et al., *Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt B**: p. 463-70.
 37. Camacho-Arroyo, I., et al., *Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain.* Neuroendocrinology, 2002. **76**(5): p. 267-71.
 38. Singh, M., C. Su, and S. Ng, *Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain.* Front Neurosci, 2013. **7**: p. 159.
 39. Henderson, L.P., *Steroid modulation of GABAA receptor-mediated transmission in the hypothalamus: effects on reproductive function.* Neuropharmacology, 2007. **52**(7): p. 1439-53.
 40. Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok, *Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm.* Nature, 2011. **471**(7338): p. 387-91.
 41. Mahajan, D.K. and S.N. London, *Mifepristone (RU486): a review.* Fertil Steril, 1997. **68**(6): p. 967-76.
 42. Cabrera-Munoz, E., O.T. Hernandez-Hernandez, and I. Camacho-Arroyo, *Role of progesterone in human astrocytomas growth.* Curr Top Med Chem, 2011. **11**(13): p. 1663-7.
 43. Cabrera-Munoz, E., et al., *Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **113**(1-2): p. 80-4.
 44. Hansberg-Pastor, V., et al., *The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines.* Steroids, 2013. **78**(5): p. 500-7.
 45. Hansberg-Pastor, V., A. Gonzalez-Arenas, and I. Camacho-Arroyo, *CCAAT/enhancer binding protein beta negatively regulates progesterone receptor expression in human glioblastoma cells.* Mol Cell Endocrinol, 2017. **439**: p. 317-327.
 46. Brenda Marquina-Sánchez, J.G.-J., Valeria Hansberg-Pastor, Talia Wegman-Ostrosky, Noemi Baranda-Ávila, Sonia Mejía-Pérez, Ignacio Camacho-Arroyo, *The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells.* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2016.

47. Moreira, F., et al., *NPAS3 demonstrates features of a tumor suppressive role in driving the progression of Astrocytomas*. Am J Pathol, 2011. **179**(1): p. 462-76.