



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efectos de la alopregnanolona sobre el patrón de expresión génica en células derivadas de gliomas humanos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B. CARMEN JANÍN ZAMORA SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Junio, 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.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana del Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Esta tesis fue realizada con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto # No. 250866.

A la Dra. Valeria Hansberg Pastor del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la supervisión técnica de este trabajo; al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes y al Dr. Iván Salido Guadarrama del Instituto Nacional de Medicina Genómica, por la asesoría sobre los microarreglos de expresión.

Al comité tutor, conformado por la Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez y el Dr. Samuel Canizales Quinteros, por su asesoramiento durante el desarrollo de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo económico otorgado para participar en el: 17th Congress of the European Neuroendocrine Association, Milán, Italia.

A los miembros del jurado, por sus valiosos comentarios a este trabajo.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción	8
3. Antecedentes	9
3.1. Panorama general sobre el cáncer y los tumores cerebrales.....	9
3.2. Gliomas	11
3.3. La progesterona (P ₄) y su papel en el desarrollo de los astrocitomas	17
3.4. Síntesis de la alopregnanolona (3 α -THP).....	20
3.5. Mecanismos de acción de la 3 α -THP	26
3.6. Papel de la 3 α -THP en diferentes tipos de cáncer	31
4. Planteamiento del problema	35
5. Hipótesis	35
6. Objetivos	36
6.1. Objetivo general	36
6.2. Objetivos particulares	36
7. Metodología	37
7.1. Cultivo celular.....	37
7.2. Genotipificación.....	38
7.3. Tratamientos y extracción de RNA total	39
7.4. Microarreglos de expresión	42
7.5. Análisis de datos de microarreglos.....	43
7.6. Validación de resultados mediante RT-qPCR	44
7.6.1. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	44
7.6.2. Oligonucleótidos	45
7.6.3. qPCR	46
7.7. Análisis estadístico	46
8. Resultados	46
8.1. Genotipificación de la línea celular U87	46
8.2. Análisis de la expresión génica a 0 y 24 h de tratamiento.....	48

8.3	Análisis de la expresión génica a 72 h de tratamiento.....	50
8.4	Validación experimental del análisis por microarreglos.	57
9.	Discusión	63
10.	Conclusiones	72
11.	Referencias.....	73
12.	Anexos.....	83
12.1	Determinación de la integridad del RNA utilizado para los microarreglos.	83
12.2	Listas de genes diferencialmente expresados.....	85
12.3	Artículos publicados durante la maestría	92
	• Artículo en revista indizada.....	93
	Zamora-Sánchez Carmen J. , Hansberg-Pastor Valeria, Salido-Guadarrama Iván, Rodríguez-Dorantes Mauricio, Camacho-Arroyo Ignacio (2017). Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. <i>Steroids</i> , 119:36-42.	
	• Artículo en revista de divulgación científica.....	99
	Gutiérrez-Rodríguez A, Zamora-Sánchez C , Camacho-Arroyo I (2016). Las hormonas sexuales en el desarrollo de tumores cerebrales. AAPAUNAM, Año 8 No.1: 28-32.	

Índice de abreviaturas

3αHSD	3 α -hidroxiesteroide oxidoreductasa
3α-THP	Alopregnanolona
5α-DHP	Dihidroprogesterona
5αR	5 α -reductasa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCDC91	Proteína accesoria P56 (<i>coiled-coil domain containing 91</i>)
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
DYNC2H1	Cadena pesada 1 de la dineína citoplasmática 2
ESF1	<i>Nucleolar pre-rRNA processing protein homolog</i>
F	Finasterida
GABA_A	Receptor del ácido- γ -amino butírico tipo A (ionotrópico)
GABA_B	Receptor del ácido- γ -amino butírico tipo B (metabotrópico)
mRPα	Receptor a progesterona membranal α (PAQR-7)
mRPβ	Receptor a progesterona membranal β (PAQR-8)
mRPγ	Receptor a progesterona membranal γ (PAQR-5)
mRPδ	Receptor a progesterona membranal δ (PAQR-6)
mRPϵ	Receptor a progesterona membranal ϵ (PAQR-9)
REV3L	Subunidad catalítica de la polimerasa ζ (<i>REV3-like</i>)
RIF1	<i>Replication timing regulatory factor 1</i>
ROCK1	Proteína cinasa asociada a Rho 1
ROCK2	Proteína cinasa asociada a Rho 2
RP	Receptor a progesterona
RT-qPCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PCM1	Material pericentriolar 1
SRC	Coactivador de receptores a esteroides
TAC	<i>Affymetrix® Transcriptome Analysis Console Software</i>
TPR	<i>Translocated promoter region</i>
V	Vehículo: Dimetilsulfóxido

1. Resumen

Los gliomas representan más del 50% de todos los tipos de cáncer del sistema nervioso central (SNC), de los cuales, se registran aproximadamente 6.5 casos por cada 100,000 personas al año. Los astrocitomas representan hasta 70% de los gliomas. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los astrocitomas se clasifican en cuatro grados de malignidad (I-IV); los astrocitomas grado III -o anaplásico- y grado IV -o glioblastomas-, son las variantes más frecuentes de los tumores astrocíticos (30 y 50% de frecuencia, respectivamente).

Existen diversos factores que están relacionados con el desarrollo y la progresión de los gliomas humanos, entre los que se encuentran las hormonas esteroideas como la progesterona (P_4). Ésta participa en procesos de proliferación, infiltración y migración de los astrocitomas. Algunos informes sugieren que las células derivadas de gliomas expresan las enzimas necesarias para llevar a cabo la síntesis de metabolitos activos de dicha hormona. La alopregnanolona (3α -THP) es uno de los metabolitos más estudiados de la P_4 a nivel del SNC. La síntesis, y los mecanismos de acción de la 3α -THP, se han asociado a procesos como la proliferación celular. En nuestro grupo de investigación, recientemente se observó que la 3α -THP promueve la proliferación de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales la 3α -THP induce la proliferación en gliomas, aún no han sido determinados.

En este trabajo se evaluó el efecto de la 3α -THP y el bloqueo de su síntesis sobre el perfil de expresión génica de la línea celular U87, la cual se deriva de un glioblastoma humano. Inicialmente, se realizó el genotipado de la línea celular U87 para corroborar la concordancia de nuestra línea celular con la línea celular distribuida por la *American Type Culture Collection* (ATCC). Asimismo, se realizaron tratamientos con 3α -THP (10 nM) durante 10 minutos y 24 h. Bajo dichas condiciones y por medio de microarreglos de expresión, se determinó el perfil de expresión génica de la línea celular U87. Al no encontrar diferencias en la expresión génica debida a los tratamientos y tiempos seleccionados, se cambiaron las condiciones de estudio. Después de 72 h de tratamiento con vehículo (V, dimetilsulfóxido 0.01 %), 3α -THP (10 nM), P_4 (10 nM) o finasterida (F, 100 nM -un inhibidor de la 5α R, enzima importante en el metabolismo de la P_4 -), se observó que los tratamientos con la 3α -THP y la F modificaron la expresión de

una variedad muy amplia de genes. De entre los genes que presentaron un mayor cambio en su expresión, se seleccionaron 9 para corroborar, por RT-qPCR, su respuesta después de 72 h de tratamiento. Dichos genes fueron elegidos ya que manifestaron mayor cambio en su expresión después de las 72 h de tratamiento. Los resultados obtenidos indican que la 3 α -THP regula la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad del material genético, la replicación del DNA y la regulación del citoesqueleto de la línea celular U87. Además, la F bloqueó los efectos de la P₄ en el caso de algunos de los genes estudiados. Lo anterior sugiere que, al inhibir a la 5 α -reductasa (5 α R), podría afectarse la expresión de genes que regulados por los metabolitos de la P₄ en células derivadas de glioblastomas humanos.

2. Introducción

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen una causa frecuente de muerte en la población mundial adulta. Dentro de éstos, los tumores derivados de células gliales -o gliomas-, representan más del 50% y se registran aproximadamente 6.5 casos por cada 100,000 personas al año (Furnari et al., 2007). Los astrocitomas son un tipo de glioma y representan el 40-50% de todos los tumores primarios (originados intracerebralmente) del SNC y hasta 70% de los tumores gliales. Los astrocitomas se clasifican en cuatro grados de malignidad (I-IV). El astrocitoma anaplásico (grado III) y el glioblastoma (grado IV) son las variantes de mayor malignidad y frecuencia de los tumores astrocíticos (30 y 50% de frecuencia respectivamente). La frecuencia de aparición de estos tumores entre hombres y mujeres es de 3:2 en los astrocitomas de mayor grado de evolución (Schwartzbaum et al., 2006).

Se han observado diversos factores asociados al desarrollo y evolución del grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar et al., 2009). Las hormonas esteroides, en particular la progesterona (P_4), incrementa el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo et al., 2000; González-Agüero et al., 2001; 2007). Dicha hormona es metabolizada en el SNC y sus metabolitos pueden prolongar, incrementar, disminuir o terminar con sus efectos. La alopregnanolona (3α -THP), uno de los metabolitos principales de la P_4 , participa en la regeneración de células del SNC y en la formación de mielina en las células gliales (Brinton R.D., 2013; Schumacher et al., 2014).

En nuestro grupo de investigación se ha observado que la 3α -THP (10 nM) aumenta el número de células y la proliferación de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano. Sin embargo, se desconoce el efecto de este metabolito sobre el perfil de expresión génica de dicha línea celular, el cual pudiera estar relacionado con la progresión tumoral.

3. Antecedentes

3.1. *Panorama general sobre el cáncer y los tumores cerebrales.*

La palabra *cáncer* se refiere a un conjunto de enfermedades con una característica compartida: presentan una proliferación celular excesiva. Esto es el resultado de alteraciones en los procesos de proliferación, muerte y diferenciación celular o en la regulación de los mismos. Las células con estas características también pueden desarrollar la capacidad de invadir a los tejidos circundantes o de entrar al torrente sanguíneo e invadir tejidos distantes al tumor original (Chow AY, 2010; National Cancer Institute, 2015).

Existen diferentes factores que pueden llevar a que una célula normal se convierta en una célula cancerosa. Los cuales pueden ser ambientales (de carácter físico, químico o biológico) o endógenos (como la carga genética de cada individuo). Además, pueden favorecer la iniciación, promoción o progresión del cáncer (Anand et al., 2008). Sin embargo, todos ellos provocan inestabilidad genómica –de ahí que el cáncer sea considerada una patología del genoma– (MacConaill y Garraway, 2010).

Las principales alteraciones en el genoma que pueden dar origen al cáncer son: a) mutaciones que pueden modificar la actividad correspondiente a un oncogen o a un gen supresor de tumores; b) rearrreglos cromosómicos o translocaciones, c) aneuploidías (MacConaill y Garraway, 2010). La caracterización de estas alteraciones es fundamental para poder entender la biología de esta patología, así como para predecir cómo será la respuesta de las células tumorales ante un tratamiento.

Los tumores cancerosos son más que una masa de células que proliferan rápidamente. Son tejidos complejos constituidos por diversos tipos celulares tumorales y no tumorales que interaccionan entre sí para contribuir a la progresión de la enfermedad. Además de la inestabilidad genómica, las células tumorales adquieren características funcionales a lo largo de las diferentes etapas de tumorigénesis. Asimismo, las células del sistema inmunológico promueven un estado inflamatorio que participa en la progresión del tumor. Dado lo anterior, pueden distinguirse regiones intra-tumorales demarcadas por células en diversos grados de

diferenciación, vascularización, inflamación y capacidad de invasión. (Hanahan y Weinberg 2011).

Los tumores en el SNC, como todos los tipos de cáncer, surgen a partir de alteraciones en los controles moleculares de los procesos de proliferación, muerte y diferenciación celular. Pueden ser primarios si se originan *de novo* en el SNC; se denominan de acuerdo al tipo celular que compone la masa tumoral y/o a su ubicación, y tienen características genóticas totalmente diferentes a los tumores secundarios. Los tumores secundarios surgen de un tumor que inició en un sitio ajeno al SNC y que se diseminó, es decir, que hizo metástasis hacia el SNC. Éstos se denominan por el tipo de células o cáncer de origen (cáncer de pulmón, de mama, melanoma, etc.). En la actualidad, los tumores cerebrales se clasifican de acuerdo a un sistema propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y que se desarrolló a partir del trabajo de Bailey y Cushing considerando la topología y la morfología de la neoplasia con base en el reporte patológico (Furnari et al., 2007). Actualmente se han identificado hasta 120 tipos diferentes de tumores cerebrales, algunos ejemplos son: el meduloblastoma, meningioma, neuroblastoma y los gliomas. En general, los gliomas son resistentes a la terapia, progresan rápidamente y se infiltran al tejido cerebral sano (Lawler y Chiocca, 2010).

La incidencia de las neoplasias cerebrales, depende del género, la edad y factores genéticos y ambientales. En México, los tumores de SNC representan el 2.8% de la mortalidad debida a neoplasias durante 2014 (Wegman-Ostrosky et al., 2016), sin embargo, no existe una estadística más precisa sobre la incidencia de los gliomas. En Estados Unidos de América, la incidencia anual de los tumores cerebrales primarios es de aproximadamente 27.86 por cada 100 mil individuos (Ostrom et al., 2012), de los cuales, los gliomas y los meningiomas son los más comunes ya que representan el 30 y 36% de todos los tumores del SNC, respectivamente (**Figura 1**). El astrocitoma de grado IV o glioblastoma es el tipo más maligno de los gliomas y constituye del 12 al 25% de todas las neoplasias cerebrales y hasta el del 50-60% de todos los gliomas (Ostrom et al., 2012; Weller et al., 2015).

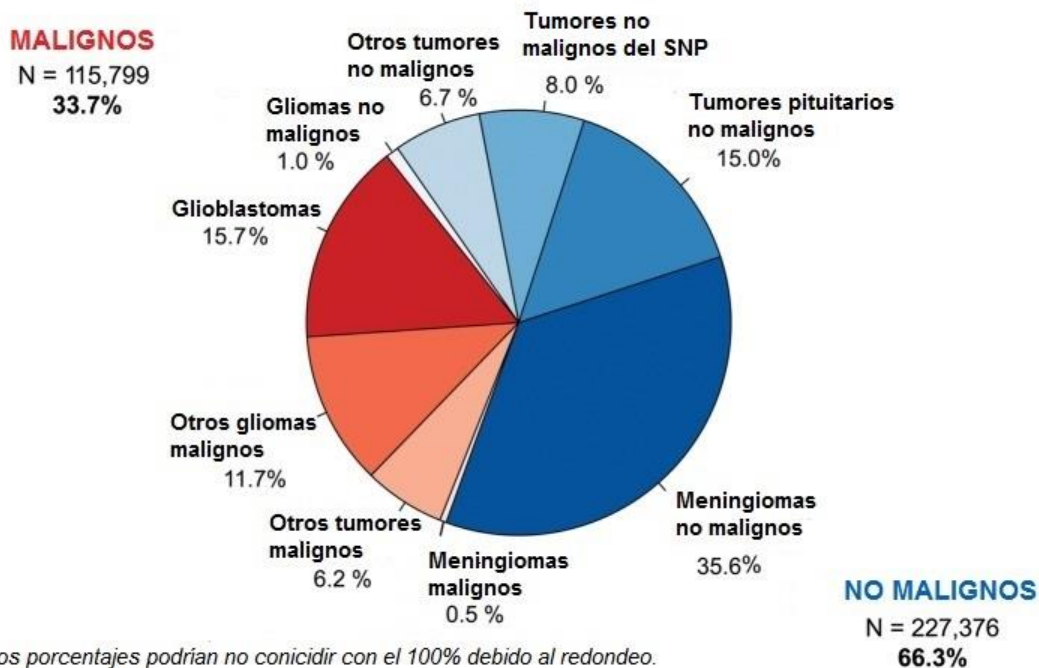


Figura 1. Distribución de los tumores primarios del SN según su malignidad y tipo de tumor. Datos de Estados Unidos de América entre 2007-2011 (Reporte estadístico de CBTRUS). Modificado de Ostrom et. al., 2012. SNP: Sistema Nervioso Periférico.

Hasta el momento, son pocos los factores genéticos o ambientales que se han identificado y que aumentan la predisposición a tumores cerebrales. Algunos de los factores genéticos asociados son: mutaciones en el gen BRCA2 y algunos síndromes familiares como el de Turcot, el de Li-Fraumeni, y la neurofibromatosis tipo 1 y 2 (NF1 y NF2). También se han estudiado factores ambientales como el uso de teléfonos celulares, campos electromagnéticos y traumatismos cerebrales previos, entre otros; sin embargo, sólo la exposición a radiación gamma y la sensibilidad genética a dicho tipo de radiación y a carcinógenos ambientales se ha asociado con un aumento del riesgo a desarrollar tumores cerebrales (Weller et al., 2015).

3.2. Gliomas

Los gliomas son tumores que tienen características de células gliales. Existen diferentes teorías que buscan explicar el origen de estos tumores, una de ellas plantea que existe una ventana de vulnerabilidad neoplásica en la cual ocurren eventos oncogénicos en células fetales en

proliferación (Louis et al., 2007). También se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas que se encuentran en el adulto y tienen una alta capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse, por lo que son candidatos potenciales a ser progenitores de tumores gliales (Alcantara Llaguno *et al.*, 2009). Se plantea que existen células neuronales y gliales preneoplásicas provenientes de distintas regiones del cerebro y que poseen una mayor susceptibilidad a cambios genéticos, que, sumados con el microambiente y a las señales de las células no neoplásicas, pueden representar un riesgo hacia el desarrollo de gliomas (Chen y Gutmann 2014). Asimismo, existen reportes que sugieren que las neuronas y los astrocitos maduros pueden sufrir desdiferenciación en respuesta a cambios genéticos inducidos por un vector vírico (lentivirus), generándose un estado progenitor suficiente para iniciar la formación de estos tumores. Esta teoría también explicaría la heterogeneidad característica de los gliomas (Friedmann-Morvinski et al., 2012).

La OMS propone un sistema para clasificar a los gliomas con base en sus características histológicas e inmunohistoquímicas en: oligodendrogliomas, ependimomas, tumores mixtos o oligoastrocitomas y astrocitomas. El grado de malignidad de dichos tumores se indica con números romanos y va del I al IV (Furnari et al., 2007; Ostrom et al., 2012). Sin embargo, se están estudiando cada vez más, los patrones de las alteraciones genéticas que presentan los gliomas con el fin de mejorar su clasificación, el diagnóstico y la terapia de dichos tumores.

Los astrocitomas son los gliomas más frecuentes. Se presentan principalmente en adultos entre 50 y 70 años y poseen un alto potencial de malignidad (González-Agüero et al., 2001). La frecuencia de aparición de astrocitomas entre hombres y mujeres es de 3:2, principalmente, en los astrocitomas de mayor grado de evolución (Schwartzbaum et al., 2006). Éstos, son tumores neuroepiteliales que pueden surgir de los astrocitos, células troncales neurogliales o células progenitoras. La OMS clasifica a los astrocitomas según sus características histológicas (presencia de atipia, proporción de células en mitosis, proliferación endotelial y necrosis), capacidad de invasión y progresión en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV aquellos de mayor agresividad.

Los astrocitomas de grado I –o pilocíticos– son relativamente delimitados, de crecimiento lento y se presentan principalmente en niños y adultos jóvenes (Weller et al., 2015). Afectan

más comúnmente al cerebelo, seguido por el hipotálamo, nervio y quiasma ópticos, tálamo, ganglios basales, tallo cerebral y hemisferios cerebrales. Histológicamente se caracterizan por un patrón bifásico de tejidos compacto –zonas con agregados de astrocitos bipolares alargados– y laxo –astrocitos multipolares redondos, con gránulos eosinofílicos–. En ocasiones, puede observarse proliferación vascular. Las células que componen al astrocitoma presentan fuerte inmunopositividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de astrocitos (Sarkar, Jain, y Suri, 2009). Estos tumores usualmente pueden ser eliminados mediante resección quirúrgica (total o parcial) y/o radio/quimioterapia (Bristol, 2009).

Los astrocitomas de grado II –difusos o infiltrantes– afectan comúnmente a adultos entre 30 y 40 años de edad. Se caracterizan por alto grado de diferenciación, lento crecimiento celular y bordes no definidos, pero con una tendencia intrínseca para la progresión a astrocitomas de grado III y a glioblastomas. Se presentan comúnmente en los hemisferios cerebrales, seguidos por el tallo cerebral y la médula espinal. Histológicamente, se observa en estos tumores, un moderado incremento en el número de células, astrocitos bien diferenciados con atipia nuclear ocasional. Además, tienen una baja proporción de células con actividad mitótica y proliferación endotelial y no presentan necrosis. Tienen alta inmunorreactividad a GFAP y también son positivos a vimentina y S-100 (Sarkar, Jain, y Suri, 2009). Generalmente tienen mutaciones en el gen de la isocitrato deshidrogenasa (IDH1) o, rara vez, en la IDH2; se cree que dicha alteración podría ser una de las iniciadoras en el proceso tumorigénico en la mayoría de los gliomas difusos. Como resultado de dicha mutación, se promueven cambios metabólicos que predisponen a las células al estrés oxidativo y a cambios epigenéticos que forman parte de los rasgos característicos de los astrocitomas difusos: aumento en la metilación de histonas e hipermetilación de islas CpG en el DNA (fenotipo g-CIMP) (Weller et al., 2015). El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia (Bristol, 2009). En general, la media de supervivencia de los pacientes es de 5 años (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado III –o anaplásicos– están preferencialmente localizados en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos de entre 40 y 60 años de edad. Histológicamente se caracterizan por atipia nuclear, aumento en el tamaño celular y actividad proliferativa significativa, células multinucleadas con anormalidades en la mitosis y positivas a GFAP. Comúnmente presentan mutaciones en el gen de la IDH. Se ha reportado que los

astrocitomas de grados II y III que presentan deleciones homocigotas en el locus CDKN2A-CDKN2B y la pérdida del brazo largo de cromosoma 10, ambos pueden progresar a glioblastomas (Weller et al., 2015). El tratamiento inicial estándar incluye, la máxima resección posible del tumor sin deficiencias neurológicas (en la mayoría de los casos resulta muy poco efectiva), radioterapia y/o quimioterapia (Buckner et al., 2007). El tiempo de supervivencia de los pacientes con esta patología es de 2-3 años (Louis et al., 2007).

El astrocitoma de grado IV –o glioblastoma– es el tumor primario del SNC de mayor frecuencia y malignidad; comúnmente se presentan en adultos entre las edades de 45 a 70 años (Kim et al., 1991). Su localización más común es la corteza cerebral (Sarkar, Jain, y Suri, 2009), ganglios basales y tálamo. Pueden presentarse en niños y adolescentes, sin embargo, las características genóticas de dichos tumores son completamente diferentes a los glioblastomas presentes en adultos. Estos tumores llegan a medir hasta 5 cm, microscópicamente son altamente anaplásicos y pueden estar compuestos de células con diversas morfologías.

Se les denominan glioblastomas primarios a los que se generan *de novo*, es decir, sin evidencia de un tumor previo de menor malignidad, o secundarios si se desarrollaron por progresión a partir de astrocitomas de menor malignidad. Los glioblastomas primarios representan aproximadamente el 80-90% de los casos (Furnari et al., 2007). Los glioblastomas primarios y secundarios son morfológicamente indistinguibles entre ellos. Sin embargo, se sabe que se presentan en rangos de edad diferentes y poseen alteraciones genéticas diferentes: los glioblastomas primarios se caracterizan por la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) junto con la deleción del locus *INK4a/p14ARF*; los glioblastomas secundarios presentan diversas mutaciones en el gen de la proteína tumoral 53 (TP53) y la sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y de su receptor así como mutaciones en la IDH (Godard *et al.*, 2003).

Clínicamente, los glioblastomas secundarios tienden a ocurrir en pacientes con una media de 45-50 años, mientras que los primarios ocurren en personas con edades entre los 50 y 70 años (Sarkar, Jain, y Suri, 2009). Los pacientes con glioblastomas tienen una supervivencia corta y generalmente fallecen dentro del primer año después del diagnóstico (Louis et al., 2007). Estos tumores son muy resistentes a la radioterapia y a la quimioterapia y debido a su alta

capacidad para infiltrarse, en especial al parénquima cerebral, generalmente no es posible realizar resección quirúrgica (Hadjipanayis y Van Meir, 2009).

Algunos tipos celulares presentes en los glioblastomas tienen una morfología de estrella diferenciada y expresión de marcadores característicos como GFAP y S-100. Otras células presentes son desdiferenciadas, mezcladas con elementos estromales tales como astrocitos reactivos (caracterizados por hipertrofia y regulación a la alta de varias moléculas, incluyendo GFAP y S-100), microglía y otros infiltrados inmunes (Hadjipanayis & Van Meir, 2009). La atipia nuclear en estas células y la gran actividad mitótica es muy evidente. La presencia de proliferación microvascular atípica (debida a secreción de factores estimulantes de formación de vasos sanguíneos) y/o necrosis es esencial para su diagnóstico. En general, los primeros síntomas de los glioblastomas pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debido al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, ataques, cambios de personalidad, demencia o problemas con la memoria, el aprendizaje, la concentración y problemas motores. Los síntomas varían dependiendo de la localización del astrocitoma (Badash, 2009).

Una de las características principales de los glioblastomas es la inestabilidad genómica. Las alteraciones más frecuentes que se encuentran en los astrocitomas son la pérdida de heterocigocidad, mutaciones del gen TP53 y del retinoblastoma (RB). También presentan la amplificación de la ubiquitina ligasa de p53 (MDM2) y la inactivación del gen del inhibidor de la cinasa 2B dependiente de ciclina (P14arf), una proteína importante para la activación de p53 en condiciones de estrés. Además, el gen de la cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) se encuentra amplificado en el 15% de gliomas de alto grado de malignidad (Furnari et al., 2007). El inhibidor de la cinasa 2A dependiente de ciclina (P16ink4), implicada en la división celular, se encuentra inactivado por hipermetilación o pérdida del alelo. Asimismo, en los glioblastomas, se presentan alteraciones en la expresión de genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y EGFR que promueven la angiogénesis y la división celular, respectivamente (Ichimura et al., 2004). Se han reportado altos niveles del mRNA y la proteína de VEGF y EGFR en pacientes con astrocitomas grado IV comparados con los de grado II y III, lo anterior, se asocia con alta proliferación celular y una menor supervivencia de los pacientes (Godard *et al.*, 2003). Gracias a los esfuerzos realizados por el consorcio del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), se han podido establecer subclasificaciones y el posible origen celular de muestras de

glioblastomas primarios y secundarios con base en el perfil génico de diversos especímenes de glioblastomas obtenidos antes del tratamiento farmacológico de los pacientes (**Figura 2**).

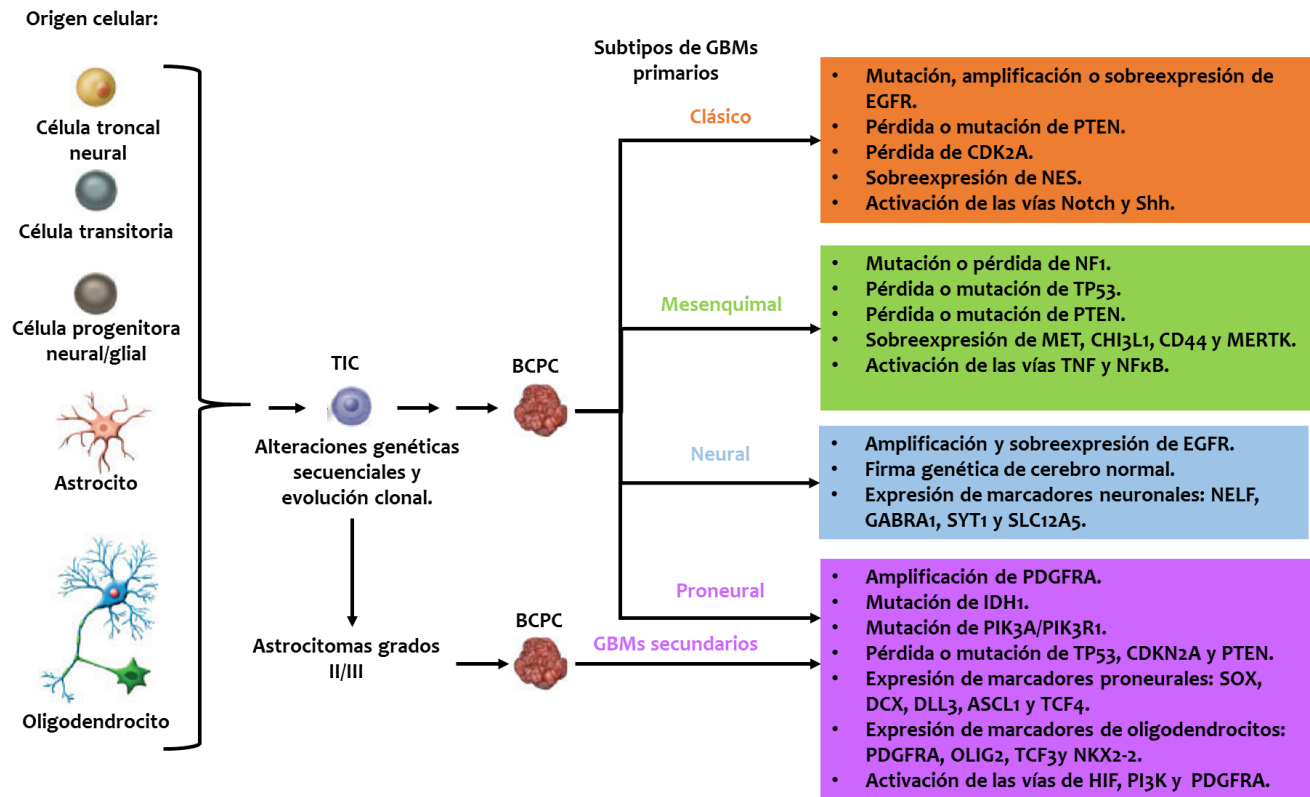


Figura 2. Subclasificación de los glioblastomas primarios con base en las células de origen y sus cambios genéticos secuenciales (modificada de Meir et al., 2010). TIC: célula iniciadora del tumor; BCPC: célula propagadora de cáncer cerebral; GBMs: glioblastomas.

Incluso con todos los avances terapéuticos, la intervención curativa para los astrocitomas más agresivos es muy pobre, de modo que el cuidado médico radica principalmente en el manejo paliativo de los pacientes. Es por esto que en muchos casos se busca ofrecer a los pacientes tratamientos experimentales o alternativos (como ocurre con otros tipos de tumores) entre los que se encuentran quimioterapia intra-arterial, inmunoterapia, terapia génica y tratamientos endócrinos (Edward et al., 2005). La expresión de los receptores a hormonas sexuales en astrocitomas ha sugerido la terapia hormonal como una alternativa terapéutica (Atif, Yousuf, & Stein, 2015). Sin embargo, existen informes que sugieren que las hormonas sexuales,

entre las cuales se encuentra la progesterona (P_4), pueden participar en el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo et al., 2000; González-Agüero et al., 2001; 2007). Se sabe que la P_4 es metabolizada en el SNC dando lugar a metabolitos que pueden ejercer alguna acción biológica a través de los mismos o diferentes mecanismos de acción de dicha hormona. Uno de estos metabolitos es la alopregnanolona (3α -THP), misma que participa en la regeneración neuronal y en la formación de mielina en las células gliales (Brinton R.D., 2013; Schumacher et al., 2014). En la línea celular de neuronas NT2 derivadas de teratocarcinoma humano, se ha observado que protege a las células contra necrosis y apoptosis (Lockhart et al., 2002).

A pesar de que en nuestro laboratorio determinamos que la 3α -THP tiene un efecto inductor de la proliferación de células derivadas de astrocitomas humanos, no se conocen los mecanismos involucrados en dicho proceso, por lo que en este trabajo se evaluará el efecto de dicho metabolito de la P_4 sobre el perfil de expresión génica en la línea celular U87, derivada de un glioblastoma humano.

3.3. La progesterona (P_4) y su papel en el desarrollo de los astrocitomas

Las hormonas esteroideas, como la P_4 , son sintetizadas en células específicas de las gónadas, la corteza adrenal, la placenta y el SN, a partir del colesterol (Henley et al., 2005). Todas las hormonas esteroideas tienen como estructura base al ciclopentanoperhidrofenantreno, sin embargo, las cadenas laterales así como la orientación espacial de estos grupos es muy importante, ya que muchos de los efectores de dichas hormonas son estereoespecíficos (Nussey y Whitehead, 2001). La P_4 es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono. En el SN, la P_4 es sintetizada por el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, por las neuronas y células gliales ya sea *de novo* -a partir del colesterol- o a partir de la pregnenolona circulante (Baulieu, 1999; Schumacher y Guennoun, 2010; Giatti et al., 2015).

La P_4 tiene diversos mecanismos de acción, de manera general, éstos se clasifican en dos: el mecanismo clásico –o genómico– y el mecanismo no clásico –o no genómico–. A través del mecanismo clásico, la P_4 ejerce sus efectos a largo plazo a través de la activación del receptor intracelular a P_4 (RP), el cual, es un factor de transcripción que regula la expresión de

genes blanco (Camacho-Arroyo et al., 2017). En el mecanismo no clásico, la P₄ se une a sus receptores membranales (mRPs), mismos que pueden modificar conductancia a iones, regular la producción de segundos mensajeros y la activación de cascadas de señalización (Valadez-Cosmes et al., 2016). Ambos mecanismos pueden estar activados en una misma célula por lo que los efectos de la P₄ están regulados de una forma más compleja (Faivre et al., 2005; Schumacher et al., 2014).

En nuestro grupo de trabajo se ha observado que la P₄ a diferentes concentraciones, aumenta el número de células y la proliferación de las líneas celulares U373 (derivada de un astrocitoma de grado III) y D54 (derivada de un glioblastoma). Por otro lado, el RU486, un antagonista del RP, bloquea parcialmente dicho efecto (González-Agüero et al., 2007). Asimismo, se ha visto que la interacción de dicha hormona con el RP puede llevar a aumento en la expresión a nivel de mRNA del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la ciclina D1. Dichas proteínas están relacionadas con un aumento en la proliferación, angiogénesis e inhibición de la apoptosis, procesos clave en el desarrollo y progresión de los glioblastomas (González-Arenas et al., 2014; González-Agüero et al., 2007; Camacho-Arroyo et al., 2000; González-Agüero et al., 2001). Asimismo, se ha reportado que la P₄ promueve la invasión y migración de las líneas celulares U251 y D54, ambas derivadas de glioblastomas humanos. Dichos efectos están mediados parcialmente por el RP ya que el tratamiento con RU486 o con un oligonucleótido antisentido para el RP bloquearon parcialmente la invasión y la migración de las células D54 (Piña-Medina et al., 2016). Lo cual señala que los efectos que tiene la P₄ sobre las células de glioblastoma podrían estar mediados por otros receptores además del RP.

Por otro lado, se ha identificado que los metabolitos de la P₄, también son sintetizados en el SN y pueden tener los mismos mecanismos de acción que la P₄, o bien, pueden tener mecanismos alternativos que modulen las acciones de dicha hormona (Roberto Cosimo Melcangi et al., 2014). En muchos casos, la 3 α -THP, uno de sus metabolitos, media las acciones de la P₄ (Frye, Manjarrez, y Camacho-Arroyo 2000; Guerra-Araiza et al., 2007; Guerra-Araiza et al., 2009) en el SNC.

La P₄ y la 3 α -THP (estructuras químicas en la **Figura 3**) son importantes para el mantenimiento y función del SNC y periférico (SNP). De manera fisiológica, la 3 α -THP

promueve la proliferación de células progenitoras neurales de rata y células troncales neurales humanas (Brinton, 2013; J. M. Wang et al., 2005) y la expresión de proteínas importantes para la formación de mielina en células de Schwann (Roberto C. Melcangi et al., 2005); en células de la microglia, dicho metabolito disminuye la expresión de citosinas pro-inflamatorias (Bender & Norenberg, 1998). Por otro lado, variaciones en los niveles de estos esteroides están asociadas con diversas patologías como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas y encefalopatía diabética, entre otras (Brinton, 2013; Melcangi et al., 2014) de manera tejido-específica y dependiente del sexo. A pesar de lo anterior, poco se sabe sobre el papel que desempeña la 3 α -THP sobre el desarrollo de los astrocitomas, así como de sus mecanismos de acción.

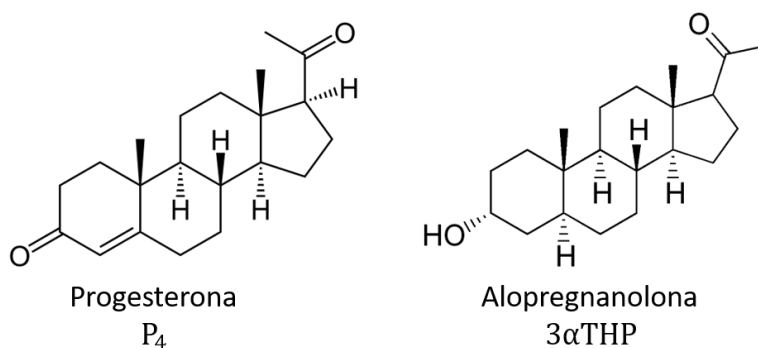


Figura 3. Estructura química de la P₄ y de la 3 α -THP

En la actualidad se sabe que la 3 α -THP interactúa con receptores membranales. Es un modulador alostérico de cierto tipo de receptores del ácido- γ -amino butírico (GABA). El GABA es un neurotransmisor inhibitorio del SNC (Brinton, 2013). Dicho metabolito también puede unirse a receptores membranales de P₄ (mPRs), proteínas de siete dominios transmembranales que pertenecen a la familia de receptores de progestinas y adiponectina Q (Dressing et al., 2014). Además, la 3 α -THP es un modulador positivo de los receptores PXR (pregnane xenobiotic receptor, por sus siglas en inglés), los cuales son receptores nucleares promiscuos que promueven la expresión de enzimas participantes en el metabolismo de xenobióticos en el hígado, riñón, intestino, la barrera hematoencefálica y el cerebro (C. Frye, Koonce, & Walf,

2014). Contrario a la propia P₄ o a otros metabolitos de ésta, la 3 α -THP no se une al receptor intracelular de la P₄ (RP) (Rupprecht et al., 1993). Debido a estas interacciones, se cree que la 3 α -THP puede activar mecanismos de protección y regeneración celular, de ahí que su efecto en células derivadas de glioblastomas pueda arrojar mayor información sobre el papel que ésta juega en el desarrollo tumoral.

3.4. Síntesis de la alopregnanolona (3 α -THP).

El metabolismo de la P₄ está altamente compartimentalizado. El paso inicial y limitante en la biosíntesis de la P₄ es la translocación del colesterol citoplasmático hacia el interior de la matriz mitocondrial a través de un complejo multiprotéico en el que participan la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO), la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), el canal dependiente de aniones (VDAC) y la proteína transportadora del nucleótido adenina (ANT). Éstas forman un poro para transportar colesterol desde el citoplasma hasta la matriz mitocondrial (Liu, Rone, & Papadopoulos, 2006). En la matriz mitocondrial, el citocromo P450 (P450_{scc}) cataliza la conversión de colesterol en pregnenolona al cortar la cadena lateral de seis carbonos (C22-C27) del colesterol (**Figura 4**); dicha reacción está mediada por la adrenodoxin oxidoreductasa (ADX_R). La ADX_R es una flavoproteína que participa en el transporte de electrones de las proteínas CYP450; recibe electrones del nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH) y reduce a la adrenodoxina. Esta última transfiere los electrones al P450_{scc} (Schumacher & Guennoun, 2010).

La pregnenolona puede difundirse hacia el citoplasma (**Figura 4**) y ser convertida en P₄ por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ D5-D4 isomerasa (3 β -HSD), que se encuentra en la mitocondria o en la membrana del retículo endoplásmico, dependiendo del tipo de célula esteroidogénica. La 3 β -HSD cataliza dos reacciones en sitios activos diferentes: la deshidrogenación de 3 β -hidroxiesteroides y la isomerización de Δ^5 -3-cetoesteroides (doble enlace entre los carbonos C5 y C6) a Δ^4 -3-cetoesteroides (doble enlace entre los carbonos C4 y C5) (Schumacher & Guennoun, 2010).

En el SNCyP, la P₄ puede ser sintetizada *de novo* a partir de colesterol o a partir de la pregnenolona circulante; la pregnenolona puede acumularse en el tejido nervioso en forma de

hormona libre, éster de ácido graso o conjugada con sulfato (Schumacher & Guennoun, 2010). Las neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann expresan las enzimas necesarias para sintetizar a la P₄.

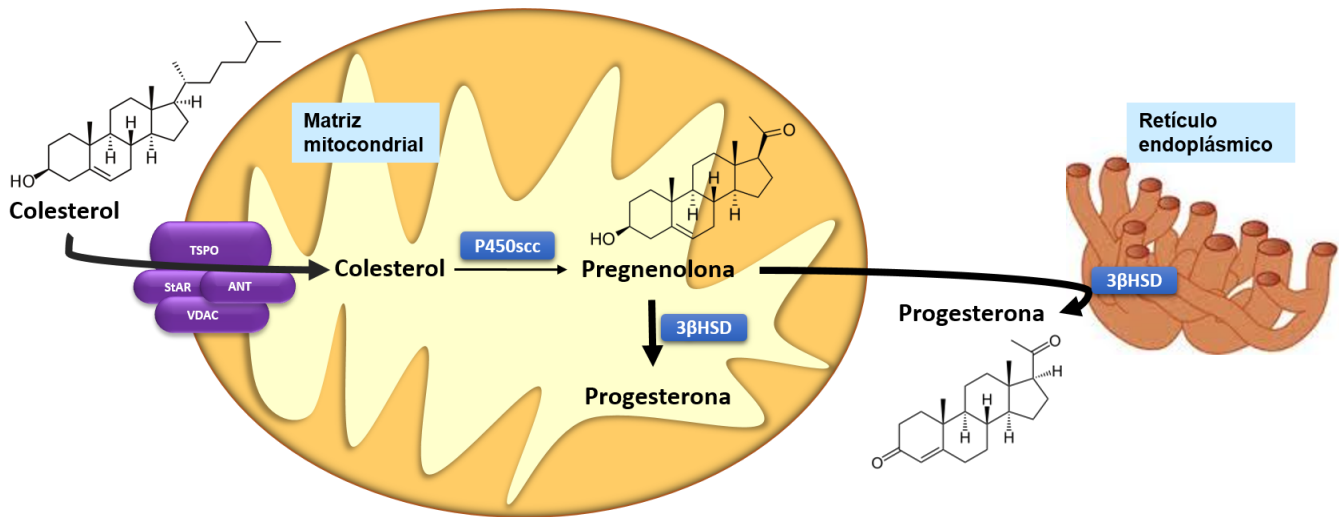


Figura 4. Síntesis de progesterona a partir de colesterol. En las células esteroidogénicas, el colesterol, que se encuentra en el citoplasma, es transportado hacia la matriz mitocondrial donde es convertido a pregnenolona, la cual es convertida en progesterona dentro de la mitocondria o en el retículo endoplásmico. VDAC: Canal de aniones 1 dependiente de voltaje, StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, ANT: la proteína transportadora del nucleótido adenina, TSPO: Proteína translocadora de 18 kDa, P450scc: citocromo P450, 3βHSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/ D5-D4 isomerasa.

Posteriormente, la P₄, ésta es reducida por la 5α-reductasa (5αR), a 5α-dihidroprogesterona (5α-DHP) en la membrana del retículo endoplásmico. Se han identificado distintas isoformas de la 5αR(1-3) que están codificadas en diferentes genes y tienen afinidades similares por sus diferentes sustratos, sin embargo, difieren en la sensibilidad que presentan por diversos tipos de inhibidores y su expresión es tejido-específica (Schumacher & Guennoun, 2010). Tanto la 5αR1 como la 5αR2 participan en la reducción de diversos neuroesteroides como la testosterona y la desoxicorticosterona, además de la P₄ (Stiles y Russell, 2010). Con respecto a la 5αR3, se ha visto que participa en la reducción de esteroides (Uemura et al., 2008; Yamana et al., 2010), sin embargo, su función mejor caracterizada es la reducción de poliprenol a dolicol, este último, al ser fosforilado, sirve como anclaje para la síntesis de N-glicanos en el retículo

endoplásmico (Cantagrel et al., 2010; Stiles & Russell, 2010; Taylor et al., 2017). En la **Tabla 1** se presentan diversas características de las isoenzimas 5 α R1, 5 α R2 y 5 α R3 (Aggarwal et al., 2010; Azzouni et al., 2012). En el SNC del humano, la rata y el ratón en etapa adulta, la expresión de la 5 α R1 es más abundante con respecto a la 5 α R2. En humanos, la 5 α R se encuentra en mayor cantidad en neuronas con respecto a oligodendrocitos y astrocitos (Faroni & Magnaghi, 2011). En la rata, la mayor expresión de dicha enzima se observa en células gliales y endodimales, mientras que en el ratón su expresión es mayor en neuronas (Pelletier, 2010). La 5 α R se ha asociado con la diferenciación y la maduración de células neuronales y gliales. Se ha sugerido que durante la gestación, la 5 α R2 es la responsable de producir la mayor cantidad de metabolitos de la P₄ (5 α -DHP y 3 α -THP) en el SN del feto (Nguyen et al. 2003; Paris et al., 2011). Mientras que la 5 α R1 es la isoforma predominante en el cerebro adulto (Pelletier, 2010). En células derivadas de gliomas, el AMPc parece causar la activación de dicha enzima (Morita et al., 1999).

Tabla 1. Comparación de las características de las isoenzimas 5 α R1, 5 α R2 y 5 α R3.

Enzima:	5αR1	5αR2	5αR3
<i>Gen, localización:</i>	<i>SRD5A1, 5p15</i>	<i>SRD5A2, 2p23</i>	<i>SRD5A3, 4q12</i>
<i>Peso:</i>	<i>29.4 kDa</i>	<i>28.4 kDa</i>	<i>36.52 kDa</i>
<i>Número de aminoácidos:</i>	<i>259</i>	<i>254</i>	<i>318</i>
<i>Número de exones</i>	<i>5</i>	<i>13</i>	<i>6</i>
<i>Localización en tejidos:</i>	<i>Glándulas sebáceas y sudoríparas, células de la papila dérmica, queratinocitos y folículos. En tejido muscular y hepático.</i>	<i>Próstata y piel genital, epidídimo, vesículas seminales, folículos capilares e hígado.</i>	<i>Páncreas, piel, glándulas mamarias, ovários, cérvix, próstata,</i>
<i>Localización en el SNC:</i>	<i>Corteza temporal y subcortical, hipocampo, cerebelo e hipotálamo (en neuronas y células gliales).</i>	<i>Mayormente expresada durante los periodos fetal y neonatal en hipocampo y cerebelo (en neuronas y células gliales).</i>	<i>Corteza frontal</i>

La 5 α R ha sido ampliamente estudiada en modelos *in vitro*, en particular, en la línea celular C6 de glioma de rata y en la línea 132N1 derivada de un astrocitoma humano. Las células C6

expresan a las 5 α R1 y 5 α R2 (Maayan et al., 2004). Ambas líneas celulares expresan una mayor cantidad de metabolitos de la P₄ con respecto a los astrocitos tipo 1, que envuelven las sinapsis en el SNC y participan en la liberación de diversas sustancias como neuroesteroides, neurotransmisores y purinas (adenosina y ATP), entre otras sustancias (Melcangi et al., 1998). Además, hay reportes que indican una mayor expresión de 5 α R en biopsias de gliomas con respecto a tejido cerebral normal o de epilepsia (B. Stoffel-Wagner et al., 2000). Asimismo, nuestro laboratorio reportó recientemente que las células U87 expresan a las 5 α R1 y 5 α R2, siendo la 5 α R1 la que mayormente se expresa (Zamora-Sánchez et al., 2017). En dichas líneas celulares, la finasterida (F) (**Figura 5**), un inhibidor competitivo de la 5 α R disminuyó la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular que fue inducida por la P₄ (Morita et al., 2006; Morita y Her, 2008; Modol et al., 2014; Wiebe et al., 2015; Zamora-Sánchez et al., 2017). Lo que es un fuerte indicador de que los metabolitos de dicha hormona median la expresión génica.

La F es uno de los inhibidores de la 5 α R más estudiados y utilizados tanto en investigación como en la clínica para el tratamiento de cáncer de próstata; el mecanismo de inhibición de la F es a través de la formación de un aducto entre la enzima unida a NADPH y la dihidrofinasterida, el producto de la reducción de la F. Cabe destacar que la vida media de dicho fármaco es de 6 a 8 h y si bien es un potente inhibidor para la 5 α R2 (K_i=3.5 nM), no lo es para la 5 α R1 cuya K_i es mayor o igual a 300 nM (Aggarwal et al., 2010; Azzouni et al., 2012).

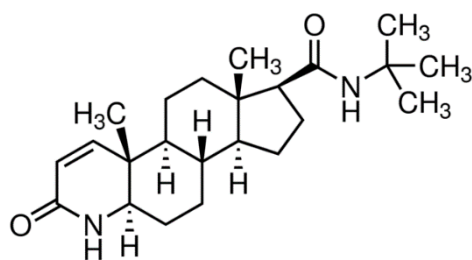


Figura 5. Estructura de la finasterida (F).

La 5 α -DHP, también es un metabolito activo de la P₄ que participa en la regulación de diversas funciones neuroendócrinas. Dicho metabolito tiene gran afinidad por el RP en aves,

sin embargo, tiene menos afinidad por el RP humano (Schumacher et al., 2014). En el citoplasma, la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α HSD) reduce a la 5 α -DHP a 3 α -THP (Melcangi y Panzica, 2014; Schüle et al., 2014) (**Figura 6**). La 3 α HSD puede metabolizar a otros esteroides y ácidos biliares, además de a la 5 α -DHP (Trauger et al., 2002). La reacción que cataliza dicha enzima es reversible, por lo que la 3 α -THP podría ser nuevamente metabolizada a 5 α -DHP y activar la transcripción mediada por el RP (Schumacher & Guennoun, 2010). La 3 α -THP también puede ser epimerizada a epialopregnanolona (3 β ,5 α -tetrahidroprogesterona), misma que puede antagonizar el efecto de la 3 α -THP (Belyaeva et al., 2007).

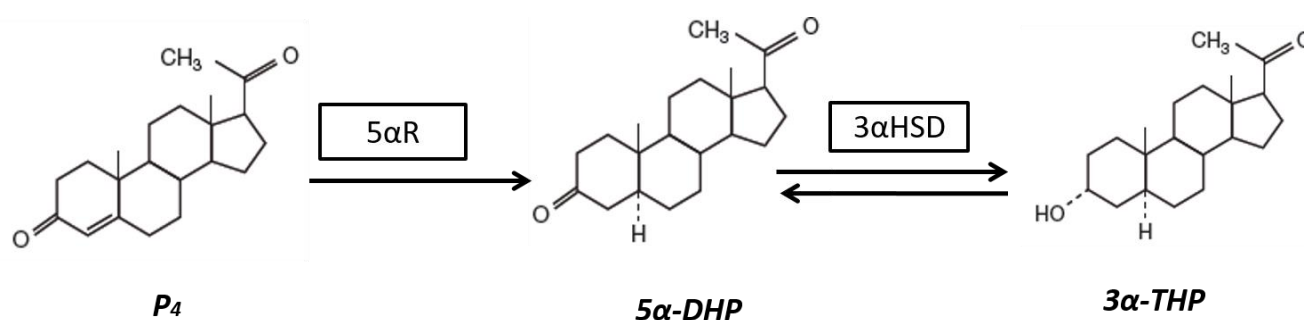


Figura 6. Síntesis de la 3 α -THP. La enzima 5 α -Reductasa (5 α R) cataliza la conversión de P₄ a 5 α -DHP, mientras que la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α HSD; también llamada 3 α -hidroxiesteroide oxidoreductasa) cataliza la conversión de 5 α -DHP a 3 α -THP (alopregnanolona) (Modificada de Schumacher y Guennoun 2010).

Se han identificado tres isoformas de la 3 α HSD (1-3), además de la 20 α HSD, que cataliza la misma reacción que la 3 α HSD pero en el C20. Dichas enzimas que pertenecen a la familia de aldo-ceto reductasas, de las cuales las isoformas 2, 3 y la 20 α se expresan ampliamente en el SNC. La región 5'-UTR de estos genes, se encuentra altamente conservada en humano y en ratón; además, dentro de su secuencia se han identificado elementos de respuesta a esteroides (Rossetti et al., 2016). El 17 β -estradiol participa en la modulación de la expresión de dicha enzima en el hipotálamo (Brunton et al., 2014), la cual está limitada a astrocitos. Se ha visto que en el hipocampo de pacientes con epilepsia la isoforma predominante es la 2 (Stoffel-Wagner et al., 2000). Las enzimas que participan en el metabolismo de neuroesteroides se expresan de manera diferencial en las células del SNC, lo cual sugiere la existencia de

mecanismos de cooperación entre neuronas y células gliales para regular la esteroidogénesis (Rossetti et al., 2016).

La 3 α -THP es sintetizada en respuesta al estrés agudo y desempeña un papel importante en la regulación de la función del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) (Evans et al., 2012). Con respecto a otros metabolitos de la P₄, se ha observado que los 5 α -pregnanos –entre los que se encuentra la 3 α -THP– podrían estimular procesos de proliferación, adhesión y remodelación del citoesqueleto, mientras que los 4 α -pregnenos podrían inhibir dichos procesos (Wiebe et al., 2005).

En la línea celular C6, derivada de un glioma de rata, se determinó que el estradiol suprime la expresión de la 5 α R, por lo tanto, la síntesis de DHP y de 3 α -THP (Maayan et al., 2004). En cobayos se ha visto que el tratamiento repetido con betametasona -un glucocorticoide-, provoca una disminución en los niveles de 5 α R2 así como de 3 α -THP en placenta y en el SNC del feto (McKendry *et al.*, 2010). Esto muestra que son varias las hormonas esteroides involucradas en la regulación del metabolismo de la P₄ a nivel de SNC y que las diferentes fluctuaciones en los niveles de éstas a lo largo de los ciclos reproductivos influyen en los niveles de metabolitos de la P₄ sintetizados en las células gliales y neuronales.

Las actividades de la 5 α R y la 3 α HSD se han evaluado en cultivos primarios de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos tipo 1 -que se localizan cerca de las sinapsis o de vasos sanguíneos- y tipo 2 -que entran en contacto con los nodos de Ranvier, donde liberan diversos sustratos- fetales y neonatales de la rata mediante la determinación de metabolitos de la testosterona. Los resultados indican que la formación de dihidrotestosterona por la 5 α R ocurre de manera preferencial en neuronas, astrocitos tipo 2 y oligodendrocitos y en mucho menor medida en astrocitos tipo 1. Mientras que la 3 α HSD se encontró principalmente en astrocitos tipo 1; en neuronas, astrocitos tipo 2 y oligodendrocitos. El 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol, producto de dicha enzima, fue detectado en muy bajos niveles (Roberto Cosimo Melcangi, Celotti, & Martini, 1994), lo cual sugiere que el metabolismo de la P₄, y en general, de las hormonas esteroides, no solo depende de la localización intracelular de las enzimas, sino también del tipo celular en el SNC.

3.5. Mecanismos de acción de la 3 α -THP

La 3 α -THP fue uno de los primeros neuroesteroides descritos, hasta el momento se le considera uno de los principales metabolitos del SNC debido a que participa en la modulación de diversas funciones neuronales y gliales tales como la neurogénesis y la proliferación de células troncales neurales. Las concentraciones de este metabolito de la P₄ son muy dinámicas en plasma y a nivel del SNC (Wang et al., 2005; Faroni y Magnaghi et al., 2011). Durante el embarazo, los niveles de P₄ y de 3 α -THP son elevados en el plasma y en el SNC de la madre y el feto (Brunton et al., 2014). En este último, la 3 α -THP ha sido asociada con el desarrollo y proliferación de células neuronales y gliales así como al crecimiento cerebral (Schumacher et al., 2000; 2012). Hasta el momento se sabe que la P₄ puede metabolizarse en dos tipos de compuestos: aquellos que estimulan y los que inhiben la proliferación celular y la tumorigénesis en tejido mamario.

La P₄ y la 5 α -DHP se unen al RP para activar el mecanismo clásico o genómico de la P₄; la 3 α -THP no se une al RP, sin embargo, puede activar la transcripción o iniciar cascadas de señalización de segundos mensajeros mediante diferentes mecanismos. La 3 α -THP es un modulador alostérico del receptor ionotrópico GABA_A (Schüle et al., 2014) y es un modulador positivo del receptor nuclear PXR, incluso, dicho receptor podría modular la síntesis de la 3 α -THP (Frye et al., 2014). La 3 α -THP también se une a los mPRs (Pang, Dong, & Thomas, 2013). Estos mecanismos son los más estudiados hasta el momento, sin embargo, la 3 α -THP también modula la respuesta a N-metil-D-aspartato (NMDA), además, no se puede descartar que se una al receptor GABA_B, un receptor metabotrópico de 7 dominios transmembranales (Faroni & Magnaghi, 2011). Asimismo, la 3 α -THP está relacionada con la liberación de glutamato y de GABA (Schumacher et al., 2013; Melcangi et al., 2014). A pesar de que la 3 α -THP no se une de manera directa al RP, podría activarlo indirectamente a través de su conversión a 5 α -DHP. Algunos de estos mecanismos están relacionados con los utilizados por las células para proliferar o protegerse ante ambientes citotóxicos (Frye et al., 2000; Guennoun et al., 2015a; Lockhart et al., 2002). Dado lo anterior, la 3 α -THP podría participar en el desarrollo del cáncer y particularmente, de los astrocitomas.

- Mecanismo mediado por el receptor GABA_A

Los receptores GABA_A son de tipo ionotrópico y se encuentran en la membrana celular de neuronas y algunas células gliales. Contienen un canal de cloruro que se abre por la acción del GABA. Para ser funcionales, los receptores GABA_A, deben estar constituidos por cinco subunidades diferentes. Se han caracterizado 19 subtipos de subunidades: $\alpha_{(1-6)}$, $\beta_{(1-3)}$, $\gamma_{(1-3)}$, δ , ϵ , θ, π y $\rho_{(1-3)}$. Cada subunidad contiene un dominio N-terminal extracelular y 4 dominios transmembranales (TMs), cada uno formado por un α -hélice, también poseen una asa intracelular entre el TM3 y el TM4; la región C-terminal está localizada en la región extracelular (Sieghart, 2015).

La mayoría de los receptores GABA_A están compuestos por dos subunidades α , dos β y una γ_2 , sin embargo, su composición depende de la distribución de las subunidades en el cerebro y en diferentes tipos celulares. Por lo anterior, sus características funcionales y de respuesta a moléculas neuroactivas es diferente (Guennoun et al., 2015). Se sabe que las subunidades δ y α_4 , en general, son responsivas a la 3 α -THP e insensibles a otros fármacos, sin embargo, modificaciones postraduccionales como la fosforilación, pueden cambiar dicha respuesta (Belelli et al., 2009). A concentraciones de orden nanomolar, la 3 α -THP induce la potenciación de la activación del receptor GABA_A a partir de su unión alostérica con el receptor, mientras que a concentraciones de orden micromolar, la 3 α -THP puede inducir directamente la activación de dicho receptor (Faroni 2011; Brinton 2013).

En células progenitoras neurales y en células progenitoras de oligodendrocitos, la 3 α -THP induce la proliferación a partir de un mecanismo mediado por el receptor GABA_A diferente al reportado en neuronas maduras. Esto se debe a que las células progenitoras expresan al cotransportador SLC12A2 (del inglés: solute carrier family 12 member 2), que media la reabsorción de iones K⁺, Na⁺ y 2Cl⁻, promoviendo que al activarse el receptor GABA_A ocurra un eflujo de iones cloruro y la activación de canales de iones calcio (Ca²⁺), esto, induce la activación de cascadas de señalización que desembocan en la expresión de reguladores positivos del ciclo celular, como se muestra en la **Figura 7** (Brinton, 2013).

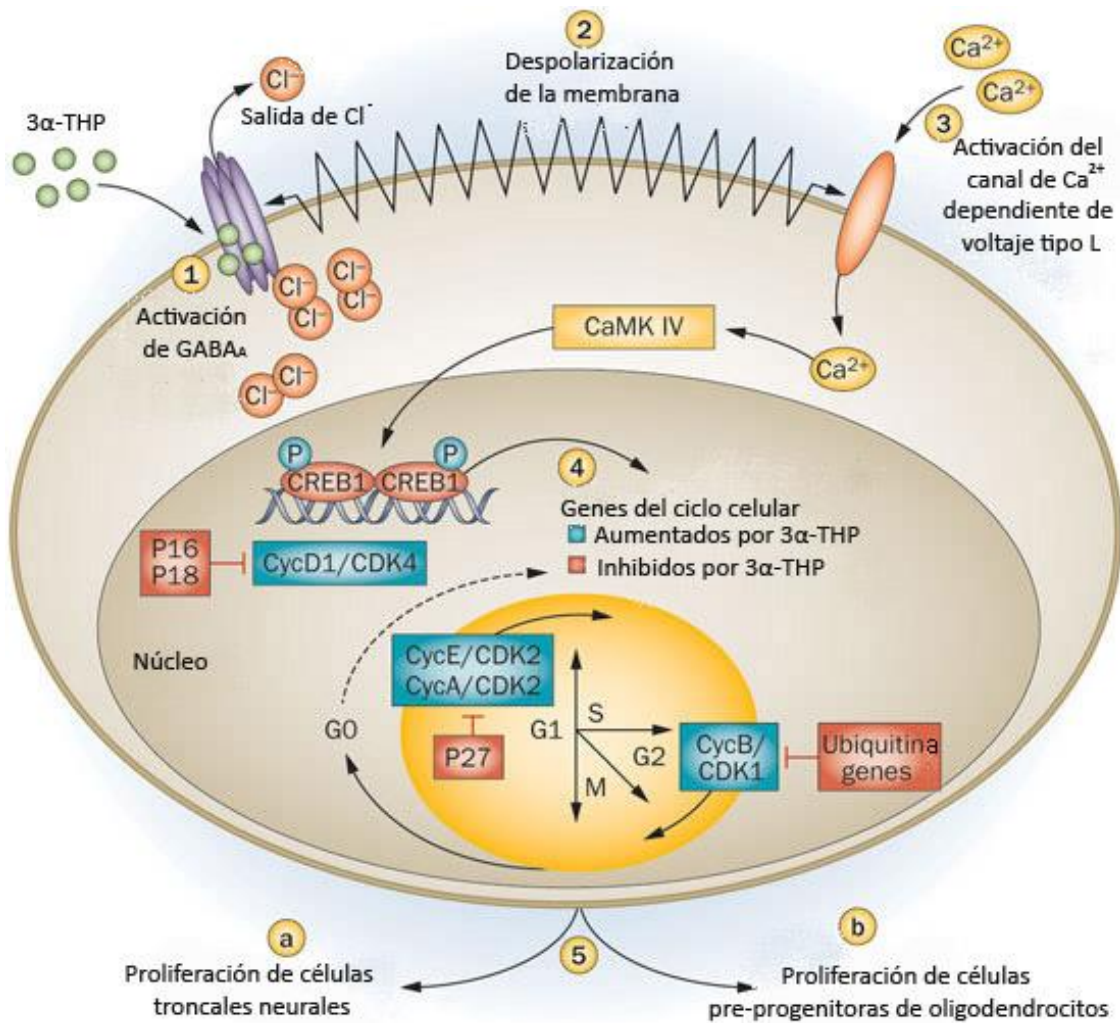


Figura 7. Regulación de la proliferación celular por la 3α-THP en células troncales neurales y progenitoras de oligodendrocitos. La 3α-THP se une al receptor GABA_A; debido a su carácter hidrofóbico, esta unión ocurre a nivel transmembranal. La expresión del SLC12A2 en células progenitoras neurales hace que la concentración de Cl⁻ sea mayor en el interior que en el exterior de la célula por lo que al ocurrir la activación del receptor GABA_A ocurre la salida de dicho ión (1). El eflujo de Cl⁻ del interior de la célula provoca la despolarización de la membrana (2). La salida de iones cargados negativamente y la despolarización de la membrana resultan en la activación de canales de calcio (Ca²⁺) tipo L dependientes de voltaje (3). El aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular activa a la cinasa dependiente de Ca²⁺, CaMK IV, que activa mediante fosforilación al factor de transcripción CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1, por sus siglas en inglés); a través de la activación de CREB1 la 3α-THP aumenta la expresión de genes necesarios para la transición de la fase G₀ a S y M (4). De manera simultánea la 3α-THP regula negativamente la expresión de genes que reprimen la división celular como los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p16 y p18 así como las ubiquitininas. La adecuada transición a través del ciclo celular permite la proliferación de las células troncales neurales en la zona subgranular del giro dentado y de las células pre-progenitoras de oligodendrocitos en la materia blanca (5) (Modificado de Brinton, 2013).

- Mecanismo mediado por los receptores a P₄ membranales (mRPs)

Los mRPs sólo han sido identificados en vertebrados y pertenecen a la Clase II de una gran familia de receptores: la Familia de Receptores a Progestinas y Adiponectina Q (PAQR). Consiste en cinco miembros divididos en dos subgrupos, uno constituido por el mRP α (PAQR-7) y el mRP β (PAQR-8) y otro por el mRP γ (PAQR-5), mRP δ (PAQR-6), mRP ϵ (PAQR-9). En humanos están codificados por diferentes genes y están localizados en distintos cromosomas (Smith et al., 2008). Hasta el momento no se ha elucidado la estructura tridimensional de estos receptores debido a su degradación rápida, sin embargo, los modelos bioinformáticos reportan que están formados por siete u ocho dominios transmembranales con el dominio N-terminal en la región extracelular y el C-terminal en la región intracelular, esto indica que dichos receptores son muy similares a los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Tang et al., 2005). Asimismo, aún no se han dilucidado completamente los mecanismos que pueden ser activados a través de dichos receptores. Por ensayos de competencia con [³H]-P₄, se ha visto que la 3 α -THP es relativamente afín a los mRP α , mRP β y mRP δ (IC₅₀= 151 nM), como puede observarse en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Comparación de la afinidad de unión de la P₄ y la 3 α -THP por los mRP. Modificado de Pang et al., 2013.

Receptor	P ₄ IC ₅₀ (nM)	3 α -THP IC ₅₀ (nM)
mRP α	26.3 \pm 5.9	404 \pm 73
mRP β	29.2 \pm 4.5	559 \pm 89
mRP δ	50.8 \pm 17.3	151 \pm 47
mRP ϵ	101.6 \pm 20.1	2561 \pm 505

Se ha reportado que los receptores mRP α , mRP β y mRP γ están acoplados a proteínas G inhibitorias (G_i). Además, en cáncer de mama, se ha asociado la sobreexpresión de estos tres receptores con el desarrollo y la progresión tumoral (Valadez-Cosmes et al., 2016); su sobreexpresión es de particular interés en células RP negativas, debido a que la P₄ podría estar participando en el crecimiento del tumor a través de mecanismos mediados por estos receptores (John P Wiebe et al., 2013). En nuestro grupo de investigación se ha identificado la expresión

del mRP β , mRP α y en menor medida, el mRP γ así como su localización en la membrana de células U87 y U251; de manera interesante, los tratamientos de P₄ y estradiol, disminuyeron la expresión del mRP α , sin embargo, aumentaron la expresión del mRP β (Valadez-Cosmes et al., 2015). En la línea celular GT1-7 derivada de neuronas hipotalámicas de ratón, que expresan al mRP α , mRP β y en menor cantidad al mRP δ , se ha propuesto que la 3 α -THP disminuye la muerte celular y la fragmentación del DNA a través de la activación de las cinasas MAPK y Akt mediada por el mRP α (Adams et al., 2015; Thomas & Pang, 2012). Por otro lado, los mRP δ y mRP ϵ son los menos estudiados hasta el momento, sin embargo, se ha visto que están acoplados a proteínas G estimuladoras (G_s). En células de cáncer de mama (MDA-MB-231) transfectadas con el mRP δ , la 3 α -THP (20 nM - 100 nM) aumentó la cantidad de AMPc, la fosforilación de la cinasa ERK y además, disminuyó el porcentaje de células apoptóticas cultivadas en medio libre de suero (Pang et al., 2013). Lo cual sugiere, que la 3 α -THP podría estar mediando sus efectos a través de los mRPs en células derivadas de glioblastomas humanos.

Además, se sabe que estos los mRPs se expresan en la membrana celular en una amplia variedad de regiones cerebrales (Pang et al., 2013). El mRP δ es el más abundante de los mRPs a lo largo de todo el SN, se expresa principalmente en la corteza cerebral e hipocampo –zonas de mayor síntesis de 3 α -THP–, cuerpo calloso, hipotálamo, tálamo, médula espinal, amígdala, hipocampo, entre otras. El mRP ϵ se expresa mayoritariamente en la pituitaria, amígdala, hipocampo, núcleo acumbens y bulbo olfatorio. El mRP β se expresa en zonas similares a donde se expresa el mRP δ y es el segundo más abundante después de éste. La expresión del mRP α se detecta en el lóbulo temporal, la glándula pituitaria y médula espinal (Pang et al., 2013).

- Mecanismo mediado por el receptor X de pregnano (PXR)

El PXR es un receptor nuclear que une a diferentes ligandos tanto endógenos como exógenos, éstos pueden ser esteroides, antibióticos, antimicóticos, ácidos biliares, entre otros (Wang et al., 2008). Su principal función es regular la respuesta a xenobióticos al promover la expresión de genes como el CYP3A4, uno de los citocromos más abundantemente expresados en

humanos, y a otras enzimas y transportadores necesarios para el metabolismo (Mackowiak & Wang, 2015). Es interesante que este receptor se encuentra expresado en diversas especies, sin embargo, su activación, así como los genes cuya transcripción regula es diferente entre dichos organismos. La localización del PXR aún no está del todo definida; en humanos, se ha visto que se encuentra localizado en el núcleo (Saradhi et al., 2005), sin embargo, su presencia en el núcleo, no produce una activación espontánea, sino que requiere de la presencia de un ligando (Mackowiak & Wang, 2015).

Para la activación de PXR es necesaria la unión de un ligando, lo que promueve la separación de PXR de proteínas chaperonas como la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) y 40 (Hsp40) (Marinis et al., 2009). Cuando el receptor está activo, ocurre la dimerización del PXR en el núcleo, y el reclutamiento de coactivadores como SRC-1 y GRIP1, que al unirse a elementos de respuesta en el DNA y a la maquinaria de transcripción, promueven la expresión de genes blanco (Mackowiak & Wang, 2015).

Se ha propuesto que la 3 α -THP puede ejercer algunos de sus efectos al inducir la activación del PXR y regular la transcripción de genes blanco. Por medio de dicho mecanismo, la 3 α -THP regula la homeostasis del colesterol y los ácidos grasos al promover la expresión del CYP3A13, CYP3A4, o de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-COA-reductasa, que son enzimas claves en el metabolismo del colesterol en diferentes modelos murinos de Alzheimer o de la enfermedad de Niemann-Pick (S. Chen et al., 2011; Langmade et al., 2006). Además, la 3 α -THP también regula la expresión del PXR y del LXR (receptor X del hígado), otro receptor nuclear altamente expresado en el SNC y que también participa en la regulación del metabolismo del colesterol (S. Chen et al., 2011).

3.6. Papel de la 3 α -THP en diferentes tipos de cáncer

Se han empleado diversas líneas celulares derivadas de gliomas como modelos *in vitro* para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, muerte celular (Djebaili et al., 2005), mecanismos de acción de los neuroesteroides (Puia et al., 2015) y metabolismo esteroideogénico de células gliales y neuronales (R C Melcangi et al., 1998; Morita et al., 1999). Sin embargo, no

se han usado como un modelo para evaluar el papel de los metabolitos de la P₄ en el mantenimiento de los gliomas.

En líneas celulares de cáncer de mama se ha estudiado el papel que tienen los metabolitos de la P₄ sobre el desarrollo tumoral, aunque no propiamente de la 3 α -THP (Wiebe et al., 2005). Se ha observado que la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama es mayor en quienes el tumor ha sido resectado durante la fase lútea del ciclo menstrual (fase en la que ocurre el mayor pico de P₄ y de 3 α -THP) que cuando fueron operadas durante la fase folicular; de ahí que haya surgido la necesidad de estudiar los efectos de los metabolitos de esta hormona y su papel en el desarrollo del cáncer (Wiebe et al., 2005). A pesar de que los metabolitos de la P₄ están presentes en el tejido normal y tumoral de mama, éstos se encuentran en diferentes concentraciones: En el tejido normal es mayor la concentración de derivados tipo 4-pregnenos que de 5 α -pregnanos (como la 3 α -THP) mientras que en el tejido tumoral es mayor la concentración de 5 α -pregnanos que de 4-pregnenos (Wiebe et al., 2000; 2013), de ahí la hipótesis de que los metabolitos de la P₄ son importantes en los procesos de crecimiento y diferenciación celular (**Figura 8**).

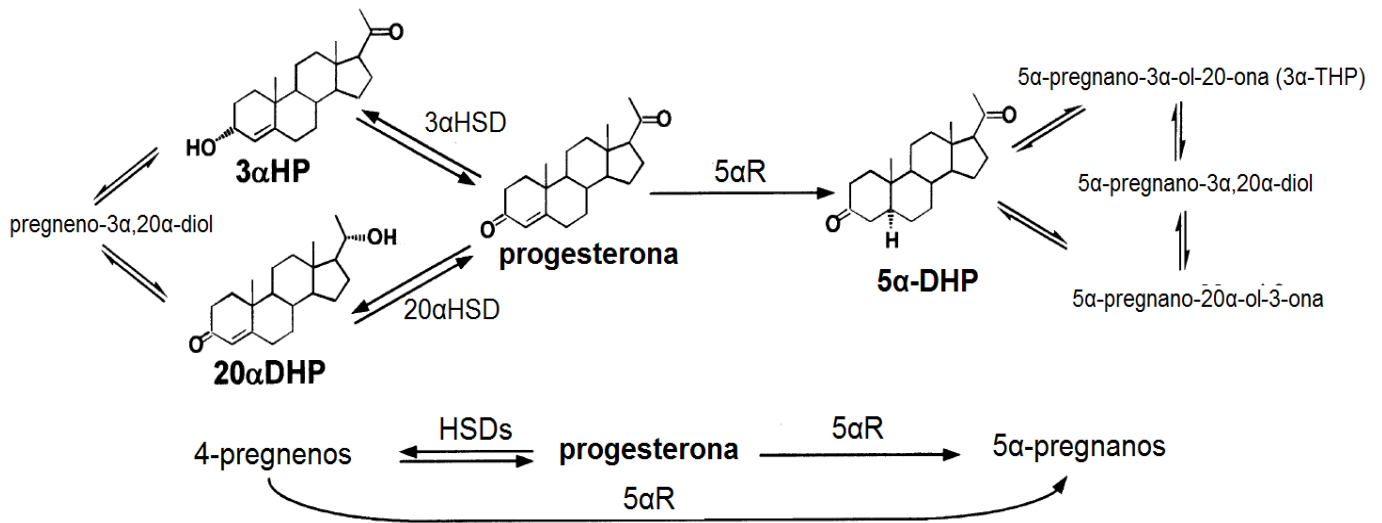


Figura 8. Vías alternativas del metabolismo de la progesterona a través de la 5 α R, la 3 α HSD y la 20 α HSD, que dan origen a diversos metabolitos. De lado izquierdo de la progesterona se muestran los metabolitos con estructura de 4-pregnenos (doble enlace entre el C4 y C5), entre ellos, la 3 α -hidroxi-4-pregnen-20-ona (3 α HP) y la 4-pregnen-20 α -ol-3-ona (20 α DHP). De lado derecho de la progesterona, se muestran los metabolitos con estructura de 5 α -pregnanos (en posición a en el C5), como la dihidroprogesterona. Cabe destacar que la 5 α R puede reducir a los 4-pregnenos (Modificado de Wiebe et al., 2005).

En diversas líneas celulares, la 3 α -THP disminuye la apoptosis celular causada por la exposición a agentes citotóxicos. La línea celular NT2, derivada de un teratocarcinoma y tratada con ácido retinoico para inducir su diferenciación a neuronas, se utilizó como un modelo de daño cerebral (Lockhart et al., 2002). En estas células, se observó que al ser pretratadas con 3 α -THP, el efecto apoptótico del N-metil-D-aspartato (NMDA) disminuía de manera dosis dependiente y con una EC₅₀ de 2.7 \pm 0.1 nM. Lo anterior sugiere que dicho metabolito actúa como un agente protector ante estímulos de muerte en este tipo de células tumorales (Lockhart et al., 2002).

Entre las líneas celulares derivadas de gliomas que han sido empleadas en investigación para determinar la influencia de los metabolitos de la P₄ se encuentran las células C6 derivadas de un glioma de rata. Éstas han sido utilizadas ampliamente en el estudio del metabolismo de neuroesteroides en células gliales debido a que presentan la ventaja de poseer un fenotipo homogéneo. En estas células se ha visto que las condiciones de cultivo celular influyen en la inmunorreactividad que presenta la línea celular para la 5 α R; el cultivo con un medio no suplementado con suero parece aumentar la inmunorreactividad de la 5 α R pero no su expresión génica (Morita et al., 1999), por lo que es necesario determinar qué factores pueden modificar su abundancia y activación en células del SNC.

En nuestro grupo de investigación, se ha observado que la 3 α -THP a una concentración de 10 nM, es capaz de incrementar el número de células de la línea de glioblastoma humano U87. Las células tratadas con una concentración de 10 nM presentaron un patrón de crecimiento muy similar al observado con el tratamiento con P₄ (10 nM) (Zamora-Sánchez et al., 2017). El efecto inductor del crecimiento celular de la P₄ (10 nM) ha sido reportado anteriormente en células U373, derivadas de un astrocitoma de grado III, y en las células D54, derivadas de un glioblastoma (González-Agüero et al., 2007). También se ha visto que la 3 α -THP (10 nM) aumenta la incorporación de BrdU de manera similar a la P₄ (10 nM). Por lo anterior podría pensarse que no sólo la P₄ *per se* tiene un efecto inductor de la proliferación, sino también sus metabolitos, en particular, la 3 α -THP. A pesar de lo anterior, no se descarta la posibilidad de que la 5 α -DHP también pueda tener efecto sobre dicha línea celular, o bien, que la 3 α -THP, active indirectamente al receptor nuclear de la P₄ al ser nuevamente convertida a 5 α -DHP.

Se ha visto que en la línea celular C6 y en la 1321N1, derivada de un astrocitoma humano grado II, el sustrato preferencial de la 5 α R1 es la P₄ y no la testosterona. En las células C6 aumentó la formación de 5 α -DHP y de 3 α -THP cuando éstas fueron tratadas con el medio de cultivo de neuronas fetales de rata, por otro lado, la formación de 5 α -DHP disminuyó en astrocitos tipo 1 cuando éstos fueron tratados con el medio de cultivo de las células C6 y las 1321N1(Melcangi et al., 1998). Lo anterior muestra que el microambiente celular influye en la síntesis de neuroesteroides en forma diferente para cada tipo celular, sea tumoral o no. Los productos liberados al medio por las neuronas podrían actuar en las células C6 activando vías de señalización mediadas por AMPc. Se sabe que altos niveles de AMPc provocan la activación de la 5 α R1 y aumentan la expresión de GFAP, una proteína de filamentos intermedios relacionada con el control del crecimiento y diferenciación de astrocitos, por lo que altos niveles de AMPc podrían relacionarse con modificaciones en la morfología y función de las células gliales (Melcangi et al., 1998). También se ha visto que la P₄ y sus metabolitos 5 α -reducidos como la 5 α -DHP podrían estar relacionados con la expresión del GFAP, misma que se inhibe con tratamientos con F, inhibidor de la 5 α R, lo cual indicaría que los metabolitos 5 α -reducidos pueden estar implicados en la regulación de la expresión de GFAP (Morita et al., 2006).

4. Planteamiento del problema

Se ha observado que existen líneas celulares derivadas de gliomas que expresan las enzimas necesarias para sintetizar 3α -THP. De manera fisiológica, la 3α -THP activa la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Ensayos realizados en nuestro laboratorio, indican que la 3α -THP induce la proliferación celular de la línea U87, derivada de un astrocitoma humano de grado IV (glioblastoma). Sin embargo, se desconoce el efecto de dicho metabolito y de la inhibición de su síntesis sobre el perfil de expresión génica de las células U87.

5. Hipótesis

- Dado que la 3α -THP induce la proliferación celular en la línea U87, se espera que el tratamiento con ésta modifique el perfil de expresión génica de dichas células, en particular, aumentará la expresión de genes que estén involucrados en procesos que promueven la proliferación celular.
- Si los metabolitos de la P_4 como la 3α -THP son fundamentales para modificar la expresión génica de las células U87, entonces el tratamiento con la finasterida (F) bloqueará los cambios en la expresión génica inducidos por la P_4 .

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la 3 α -THP sobre el perfil de expresión génica de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano.

6.2. Objetivos particulares

- 1) Genotipificar a la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias pequeñas de DNA repetidas en tándem (STR).
- 2) Identificar a los genes que presentan sobreexpresión o subexpresión en la línea celular U87 tratada con 3 α -THP mediante microarreglos de expresión génica.
- 3) Reconocer a los genes que presentan sobreexpresión o subexpresión en la línea celular U87 al utilizar un inhibidor de la síntesis de 3 α -THP, la finasterida (F).
- 4) Validar por transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) los datos obtenidos mediante el análisis de microarreglos sobre el efecto de la 3 α -THP en los niveles del mRNA de los genes seleccionados.

7. Metodología

7.1. Cultivo celular

La línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (**Figura 9**). Se cultivó en medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM) con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato (1 mM) y aminoácidos no esenciales, en condiciones de CO₂ al 5% y a 37°C. El medio se cambió regularmente (cada 48 horas) hasta obtener una confluencia de 70-80%.

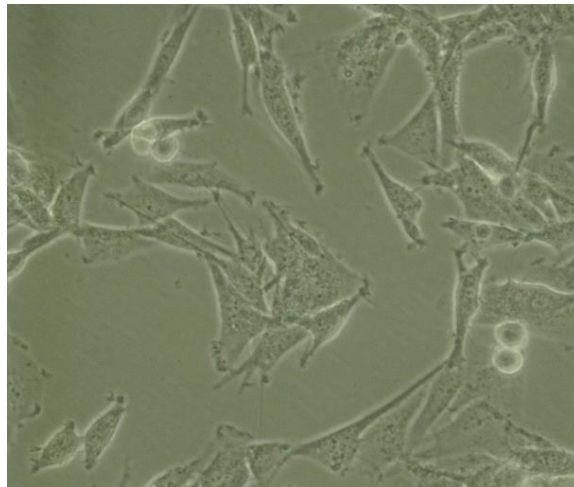


Figura 9. Línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano. Imagen tomada con un microscopio invertido a un aumento de 40X.

Para la genotipificación de la línea celular, el cultivo se realizó en botellas de 75 cm², una vez obtenida una confluencia del 80%, se desechó el medio DMEM y se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS a pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). Posteriormente, se agregaron 3 mL de PBS-EDTA y se incubaron durante 5 min en condiciones de CO₂ al 5% y 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron separadas de la botella y las alícuotas de 1 mL de PBS-EDTA con células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 1 min. El PBS-EDTA fue retirado y el botón de células fue resuspendido en 1 mL de PBS y se congeló a -20°C.

7.2. Genotipificación

La línea celular U87, proveniente de un hombre, se caracteriza por tener una estructura genómica altamente aberrante. Estas células son de tipo hipodiploide, con un número de cromosomas entre 43 y 45 en el 44% de las células. Los tipos de mutaciones más comunes que presentan son variaciones de un solo nucleótido, inserciones/deleciones y translocaciones. Se ha predicho que 332 genes presentan pérdida de función como consecuencia de variaciones de un solo nucleótido (Clark *et al.*, 2010). La genotipificación de las células U87 se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en el Laboratorio de Diagnóstico Genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo multiplex y por electroforesis capilar en un Analizador Genético 3130xl de Applied Biosystems (AB). El análisis de los fragmentos se realizó en Gene Mapper ID v3.2. Se utilizó el kit AmpFISTR® Identifiler™ que analiza secuencias microsatélites (STR, secuencias pequeñas repetidas en tándem) intergénicas y autosómicas y el gen de la amelogenina, la designación de los loci y las características se presentan en la **Tabla 3**. A partir de las muestras descritas en la sección de cultivo celular, se realizó la extracción de DNA para su análisis. Se analizaron ~25 ng/PCR de DNA, se nombraron y detectaron automáticamente sólo los alelos mencionados en la Tabla 3.

Tabla 3. Loci y características de las secuencias microsatélites detectadas durante la genotipificación de las células U87.

Designación del loci (Marcador)	Localización cromosómica	Secuencia repetida	Rango de alelos	Tamaño del amplificado de PCR (bp)	Marcador fluorescente (color)
D8S1179	8q24.13	[TCTA] [TCTG]	8-19	123-170	6-FAM™ (azul)
D21S11	21q11.2	[TGCC] [TTCC]	24-38	185-239	
D7S820	7q11.21	GATA	6-15	255-291	
CSF1PO	5q33.3	TAGA	6-15	305-342	
D3S1358	3p	[TCTG] [TCTA]	12-19	112-140	
TH01	11p15.5	TCAT	4-13.3	163-202	VIC® (verde)
D13S317	13q22	TATC	8-15	217-245	
D16S539	16q24	GATA	5-15	252-292	
D2S1338	2q35	[TGCC] [TTCC]	15-28	307-359	
D19S433	19q12	AAGG	9-17.2	102-135	NED™ (amarillo)
vWA	12p12	[TCTG] [TCTA]	11-24	155-207	
TPOX	2p23	GAAT	6-13	222-250	
D18S51	18q21.3	AGAA	7-27	262-345	

Designación del loci (Marcador)	Localización cromosómica	Secuencia repetida	Rango de alelos	Tamaño del amplificado de PCR (bp)	Marcador fluorescente (color)
Amelogenina	Xp22.22 Yp11.2	No aplica	X, Y	X= 107 Y= 113	PET® (rojo)
D5S818	5q21	AGAT	7-16	134-172	
FGA	4q28	CTTT	17-51.2	215-355	

7.3. Tratamientos y extracción de RNA total

Para el primer análisis mediante microarreglos, se realizaron tratamientos de 3 α -THP (10 nM) y vehículo (V, DMSO a una concentración final en el medio de 0.001%) durante 10 min (tiempo 0), para determinar la expresión basal o inicial de las células y 24 h. Para ello se partió del cultivo celular previamente descrito en cajas de 6 pozos hasta obtener una confluencia del 80%. 24 h antes de colocar los tratamientos, se cambió el medio DMEM con rojo fenol a uno sin rojo fenol y sin hormonas. Para el segundo análisis mediante microarreglos se siguió el mismo procedimiento de cultivo celular, en este caso, se realizaron tratamientos de V, 3 α -THP (10 nM), P₄ (10 nM) o F (100 nM) durante 72 h. El cultivo se realizó en cajas de 12 pozos a fin de minimizar la variación técnica debida a la manipulación de varias cajas de cultivo, como cuando se utilizan cajas de 6 pozos. Para realizar la validación de algunos resultados de los microarreglos, además de los tratamientos de V, 3 α -THP (10 nM), P₄ (10 nM) y F (100 nM), se incluyeron los tratamientos conjuntos: 3 α -THP+F y P₄+F durante 72 h en cajas de 6 pozos, a partir del cultivo celular previamente descrito.

Transcurrido el tiempo correspondiente a cada tratamiento, cada pozo con células fue lavado dos veces con 500 μ L de PBS frío. Posteriormente se agregaron 350 μ L de Trizol (Fenol e isotiocianato de guanidina; Invitrogen) a cada pozo. Las cajas se mantuvieron en hielo hasta que las células fueron desprendidas por pipeteo y transferidas a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se realizó la mezcla entre 3 muestras independientes para cada tratamiento como se esquematiza en las **Figuras 10 y 11**. Las muestras fueron congeladas a -70°C hasta el momento de la extracción, para la cual, se mantuvieron en hielo hasta descongelarse y fueron homogenizadas durante 15 s en el vórtex. Se agregaron 200 μ L de cloroformo por tubo y después de agitar en el vórtex, se incubaron en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 14,000 rpm

a 4°C por 15 min. Se obtuvieron dos fases: La inferior (color rosa), compuesta por fenol-clororformo que contenía a las proteínas; la superior (fase acuosa e incolora), contenía el RNA. En la interfase de color blanco, se mantuvo el DNA.

Para precipitar el RNA, la fase acuosa fue transferida a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agregó isopropanol en un volumen equivalente al extraído y las muestras se mantuvieron a 4°C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min. El RNA se observó como una pastilla de color blanco amarillento. El sobrenadante fue retirado por decantación y se realizó un lavado con etanol al 75% en agua libre de RNasas, DNasas y proteasas y se agitó en vórtex durante 20 s. Se centrifugó a 12,500 rpm a 4°C durante 8 min y el sobrenadante fue decantado. Se realizó otro lavado con 1 mL de etanol al 80% en agua libre de RNasas, DNasas y proteasas y se centrifugó a 12,500 rpm a 4°C durante 8 min. Se eliminó todo el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 50 µL de agua libre de RNasas, DNasas y proteasas.

La cantidad y pureza del RNA extraído fueron cuantificadas con el espectrofotómetro Nano Drop-2000 (Thermo Scientific, MA, EU) a 260 y 280 nm. Para conocer las condiciones del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1.5% en buffer TB 0.5X (tris-boratos). Para el análisis por microarreglos se utilizaron las mezclas de muestras independientes en las cuales el RNA no estaba degradado y cuyas bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S se observaban claramente, además de no encontrar la presencia de DNA. Se determinó el número de integridad del RNA (RIN), un parámetro que indica la integridad y calidad del RNA considerando la relación 260/280 así como la cuantificación de los productos de degradación detectables a lo largo de su migración electroforética considerando las áreas, intensidades y presencia de los picos que aparecen en el electroferograma, de tal forma que pueden obtenerse valores entre 1 y 10 donde 1 corresponde a RNA completamente degradado y 10 a RNA íntegro, sólo las muestras de RNA con un valor de RIN por arriba de 8 fueron utilizadas para generar el cRNA que fue hibridado en los microarreglos. El equipo utilizado para la determinación del RIN fue un bioanalizador (Agilent 2100 Bioanalyser), con el uso del software *2100 Expert*.

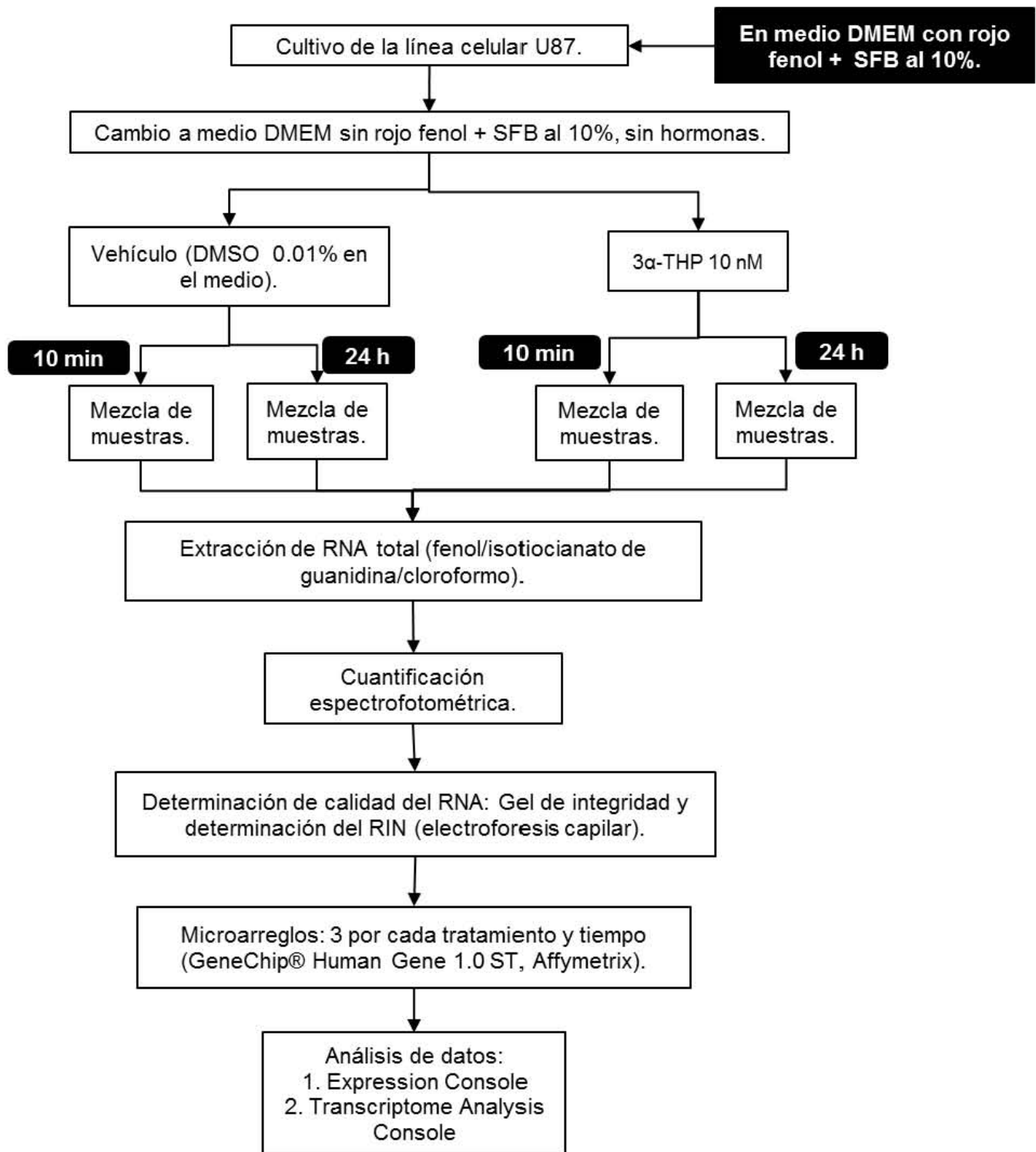


Figura 10. Diseño experimental utilizado para la obtención de muestras a 10 min y 24 h de tratamiento. DMEM: Medio Eagle Modificado Dulbecco, SFB: suero fetal de bovino, RIN: Número de Integridad del RNA.

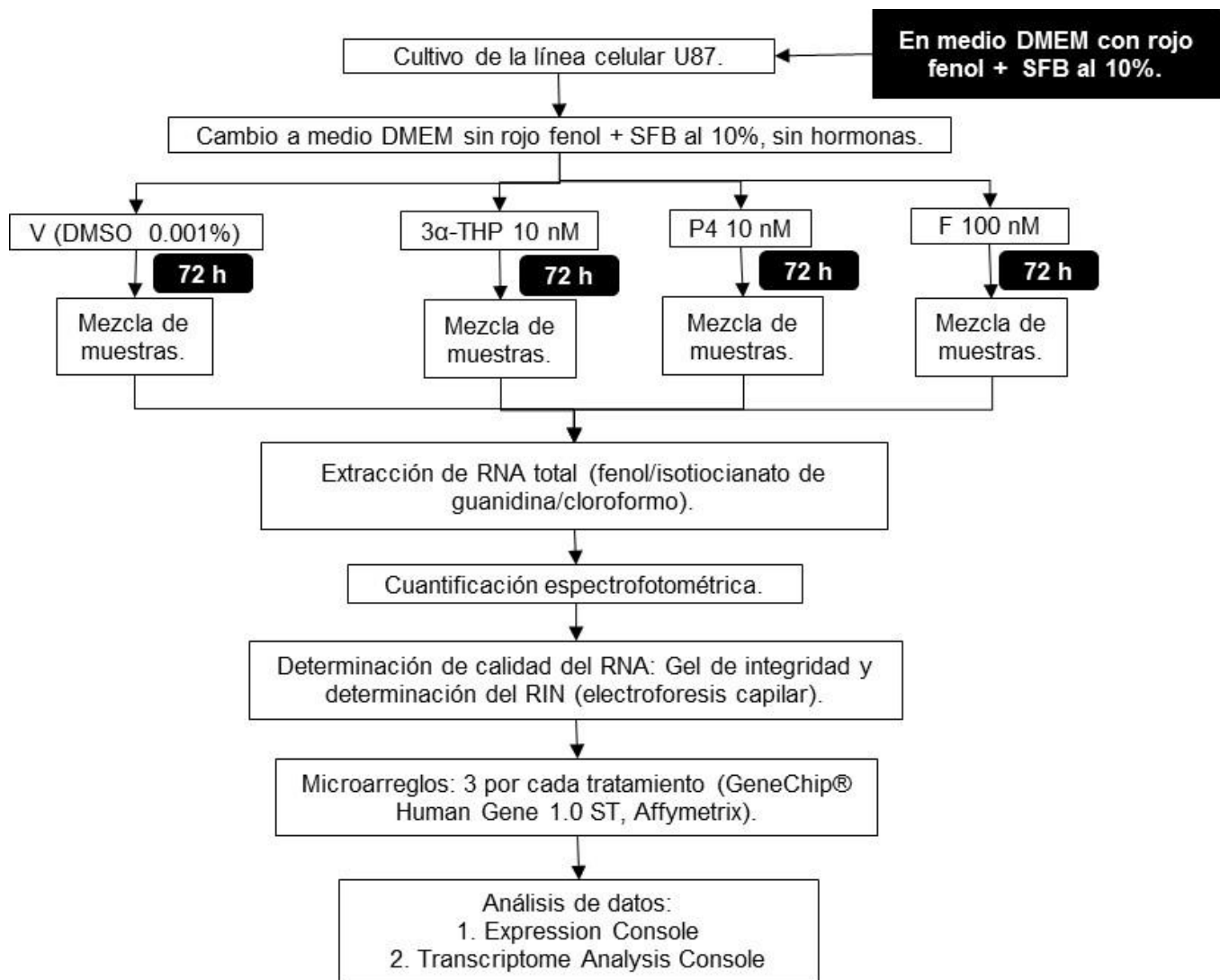


Figura 11. Diseño experimental utilizado para la obtención de muestras a 72 h de tratamiento.

7.4. Microarreglos de expresión

Para determinar los efectos de la 3 α -THP a las condiciones mencionadas sobre el perfil de expresión génica de la línea celular U87, se realizaron 3 microarreglos por condición experimental (12 en total). El microarreglo de oligonucleótidos empleado fue el GeneChip® Human Gene 1.0 ST de Affymetrix (Cleveland, EU) mismo que permite la caracterización de hasta 28, 000 transcritos (**Figuras 10 y 11**).

Dicha técnica requiere de un volumen mínimo de 10 μ L y de una concentración de RNA total de 80 ng/ μ L por muestra, además de un RIN por arriba de 8. Las muestras procesadas

tuvieron una concentración entre 80.82 y 107.39 ng/μL, así como valores de RIN entre 8.8 y 9.3 (los gráficos se muestran en la sección de anexos). Una vez determinada la calidad y la concentración del RNA, se agregaron los controles exógenos de poli-A contenidos en el kit GeneChip® Eukaryotic poli-A RNA Kit (Affimetrix), mismos que sirven como controles internos positivos.

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de la primera y segunda hebras de cDNA con el kit WT cDNA Synthesis and Amplification kit (Affymetrix). Una vez sintetizadas ambas hebras, se realizó el lavado de las mismas y la transcripción *in vitro* (IVT) a fin de obtener el cRNA. Éste fue purificado y utilizado como molde para la síntesis del cDNA en el que se utilizan oligonucleótidos al azar y desoxiuridina trifosfato (dUTP), mientras que el cRNA es hidrolizado. El DNA sentido fue fragmentado, para ello se utilizó la uracilo DNA glicosilasa (UDG) y la endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1), que reconoce específicamente sitios con residuos dUTP y rupturas en el DNA; posteriormente fue marcado en el extremo 3' por una desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) con el reactivo de marcaje que está unido covalentemente a biotina (WT Terminal Labeling kit, Affymetrix). Las muestras fueron hibridadas con los microarreglos durante 16-18 h junto con los controles de hibridación (GeneChip® Hybridization Control Kit, Affymetrix). Finalizada la hibridación, cada plataforma fue lavada, teñida con un conjugado de ficoeritrina-estreptavidina y escaneada a fin de poder hacer la determinación del perfil génico (Hybridization Wash and Stain Kit, Affymetrix).

7.5. Análisis de datos de microarreglos

Terminado el procesamiento de los microarreglos, se llevó a cabo la normalización y el análisis de los archivos de salida con la información de la intensidad de fluorescencia de cada sonda contenida en los microarreglos. Para la normalización, el análisis de calidad de las muestras y la generación de gráficas de dichos procesos, se empleó el software libre de Affymetrix: Expression Console™ Software 1.4.1, el cual se encuentra disponible en www.affymetrix.com. Para el análisis estadístico y la generación de gráficas como resultado de la comparación entre tratamientos se utilizó el software libre de Affymetrix: *Transcriptome Analisis Console* (TAC) que se encuentra disponible en www.affymetrix.com. Se obtuvo la tasa de cambio (Fc, por su denominación en inglés: fold change) que representa las veces de cambio en la expresión de

un gen en un determinado contraste de dos o más condiciones experimentales así como el promedio del nivel de expresión de un gen (en logaritmos naturales) en todos los microarreglos utilizados. El análisis estadístico realizado fue una ANOVA cuyos valores de “p” son similares a los de un análisis estadístico ordinario, pero con un incremento en los grados de libertad. Los resultados que se presentan incluyen el valor de significancia “p” de la prueba de ANOVA, el valor de “p” ajustado con el método de Benjamini y Hochberg para el control de falsos positivos (FDR) y la tasa de cambio de los genes diferencialmente expresados. Se consideró que los genes poseían una expresión diferencial si el valor de la tasa de cambio o Fc fue mayor a 1.5 y un valor de significancia “p” < 0.05 en los contrastes realizados.

7.6. Validación de resultados mediante RT-qPCR

Para comprobar algunos de los resultados obtenidos con los microarreglos, se realizó la validación de la expresión de 9 genes, de entre todos los que se encontraron diferencialmente expresados en el segundo ensayo de microarreglos. Es decir, al realizar tratamientos durante 72 h como se reporta en la sección 8.3. Para lo anterior, se partió de cultivos celulares de la línea U87 y nuevamente se realizaron tratamientos con V, 3 α -THP (10 nM), P₄ (10 nM), F (100 nM). Además, se realizaron los tratamientos conjuntos de: P₄+F –para determinar el efecto de la P₄ y de la inhibición de la 5 α R– y 3 α -THP+F –a fin de descartar que la F, al inhibir a la 5 α R que sintetiza al precursor de la 3 α -THP, pudiera afectar las acciones de la 3 α -THP–. En el caso de los tratamientos conjuntos, se utilizaron las mismas concentraciones que en los tratamientos individuales. Se realizó la extracción del RNA como se describió en la sección 7.3.

7.6.1. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, MA, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (volumen final de reacción de 20 μ L y 1 μ g de RNA total). En tubos eppendorf se colocaron los siguientes componentes (cantidades para una reacción): 1 μ L de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL), 1 μ g de RNA total y 1 μ L de dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP y dTTP a una concentración de 10 mM cada uno). La mezcla anterior fue calentada a 65°C durante 5 min y rápidamente transferida a un baño de hielo.

Posteriormente se agregaron 4 μ L de buffer de reacción (5X First-Strand Buffer), 2 μ L de ditiotreitól (DTT, 0.1 M) y 1 μ L de agua. Se homogenizó e incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se agregó 1 μ L (200 u) de la enzima M-MLV RT a cada tubo de reacción y se incubó a 37°C durante 50 min. Para inactivar a reacción se calentó a 70°C durante 15 min.

7.6.2. Oligonucleótidos

Se comprobó la expresión a nivel del mRNA de 9 genes que presentaron una expresión diferencial con los tratamientos –durante 72 h– de 3 α -THP y de F con respecto al V. Las características generales de dichos genes se reportan en la **Tabla 7** de la sección de resultados. Los oligonucleótidos para amplificar fragmentos de los transcritos a validar y el RNA ribosomal 18S –utilizado como control de expresión– fueron diseñados con la herramienta primer-BLAST del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), disponible en la página electrónica: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome . El diseño se realizó a partir de las secuencias publicadas en RefSec para cada uno de los transcritos analizados. Para el diseño se consideró, entre otros parámetros, que la longitud de los oligonucleótidos no excediera 24 bases, que su contenido de CG estuviera entre el 50 y 60 %, que la Tm calculada estuviera entre 57 y 60°C y que no hubiera complementariedad entre cada par. Además, se consideró que cada par hibridara/amplificara en una unión exón-exón. Los oligonucleótidos fueron introducidos en primer-BLAST para comprobar que fueran específicos para detectar la secuencia de interés (**Tabla 4**). Las técnicas utilizadas para la validación fue RT-qPCR.

Tabla 4. Oligonucleótidos y tamaño del amplificado de los genes a validar.

Gen	Oligonucleótido sentido (5'→3')	Oligonucleótido antisentido (5'→3')	Tamaño del fragmento amplificado [pb]
ESF1	GTCCTCGTGCTGATGAGATTA	TGCTCTTCCTTCATCCTCTCCT	176
PCM1	TCAAGACAAGAAAAGCGTCTGC	GGGCTGAATGTCTGTTCCCTACT	180
TPR	TTTGGCACAGTTTCGGCTAC	TCTTCCTCAGTTCCTACAGGTG	164
RIF1	TAATAAGGTTCCGCCGTGTCTCC	CCTTTGGCTGAAGTGGTATTATGC	177
REV3L	TGAGAAATGAGGTGGCTCTAAC	CACGGACACGGCTAACATAA	168
ROCK1	ATGGAACCAGTACAACAAGCTGA	GCATCTTCGACACTCTAGGGC	159
ROCK2	GAAGAGCAGCAGAAGTGGGT	GGCAGTTAGCTAGGTTTGTGG	170
CCDC91	AAGTCAGGAACTGTTAAGGCAG	ACAGGCTTCTTTGGCGGAT	152
DYNC2H1	GCTTGGCGGAGCAGATTA	CCAGGATGCCCGATTTCAGTAT	159
18S	AGTGAACTGCAATGGCTC	CTGACCGGGTTGGTTTTGAT	167

7.6.3. qPCR

Para los ensayos de qPCR se utilizó el kit LightCycler FastStart® DNA Master SYBR Green I (Roche, Basilea, Suiza) y el termociclador LightCycler FastStart® de Roche. Para la determinación de cada gen evaluado, se utilizaron: 12.9 µL de agua grado molecular, 1.6 µL de MgCl₂ (concentración final: 3 mM), 2 µL de los oligonucleótidos de interés (concentración final: 1 µM), 2 µL del cDNA de la reacción anterior y 1.5 µL del reactivo SYBR Green I conteniendo a la enzima FastStart DNA polimerasa (Roche). Como control negativo de la reacción, se sustituyó de la reacción anterior, el cDNA por agua de grado molecular. El análisis de los resultados se realizó por el método de Δ CT (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto al RNA 18S, empleado como gen control, de ahí que en la sección de resultados se expresen como expresión relativa de los genes de interés con respecto al gen 18S. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes por duplicado.

7.7. Análisis estadístico

A los datos obtenidos mediante qPCR se les realizó un análisis estadístico de ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se utilizó el programa GaphPad Prism5 para calcular los valores estadísticos considerando un intervalo de confianza del 95%, por lo tanto, sólo se consideraron como estadísticamente significativos los datos con un valor de $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1. Genotipificación de la línea celular U87

A fin de determinar la autenticidad de la línea celular U87 utilizada en el laboratorio, se realizó la genotipificación de la misma en el Laboratorio de Diagnóstico Genómico del INMEGEN. La designación de los loci amplificados (Marcador), y de los alelos identificados en nuestra línea celular así como los reportados en la literatura (Bady et al., 2012) se muestran en la **Tabla 5**. Al

realizar la comparación de los resultados obtenidos para nuestra línea celular contra lo reportado en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), se pudo determinar que existe una concordancia del 96.55 % con la línea celular U-87 MG (ATCC® HBT-14™). Asimismo, no se detectaron otros alelos diferentes a los reportados en la **Tabla 5**, que pudieran indicar que la línea celular está contaminada o presenta otro tipo de células humanas. El número del alelo indica el número de repeticiones completas de la secuencia (motivo que se repite). Los alelos en donde se presentan repeticiones parciales se reportan con el número de repeticiones completas seguido de un punto decimal y el número de bases en la repetición parcial.

Tabla 5. Comparación entre el perfil genético de la línea celular U87 mediante la determinación Short Tandem Repeats (STRs) utilizando la técnica de PCR de tipo multiplex y electroforesis capilar y el perfil genético reportado previamente por Bady y cols., 2012.

Marcador	Perfil genético obtenido (alelos)		Perfil genético (DSMZ)	
D8S1179	10	11	10	11
D21S11	28	32.2	28	32.2
D7S820	8	9	8	9
CSF1PO	10	11	10	11
D3S1358	16	17	16	17
THO1	9.3		9.3	
D13S317	8	11	8	11
D16S539	12		12	
D2S1338	20	23	NR	
D19S433	15	15.2	NR	
vWA	15	17	15	17
TPOX	8		8	
D18S51	11.2	13	13	
D5S818	11	12	11	12
FGA	18	24	18	24
Amelogenina	X	Y	X	

NR: No reportado

Dado que se obtuvo un porcentaje elevado de concordancia entre ésta y la línea celular U-87 MG de ATCC, se pudo comprobar la autenticidad de la línea celular U87 utilizada durante este proyecto.

8.2. Análisis de la expresión génica a 0 y 24 h de tratamiento

Para determinar la expresión diferencial de genes de la línea celular U87 bajo tratamientos de 3 α -THP (10 nM) o de vehículo (DMSO a una concentración final en el medio de 0.01 %) a 0 y 24 horas, se emplearon tres arreglos de expresión para cada condición evaluada. Los microarreglos utilizados fueron del tipo GeneChip® Human Gene 1.0 ST de Affymetrix, para 22,000 genes aproximadamente. Una vez obtenidos los archivos de salida correspondientes, se realizó la normalización de los datos mediante el software Expression Console™ 1.4 de Affymetrix. En la **Figura 12** se muestra la distribución de los datos antes y después de la normalización junto con sus respectivos histogramas, en ambos casos se puede observar que después de la normalización, todos los datos de expresión presentan una distribución muy similar expresada en forma logarítmica.

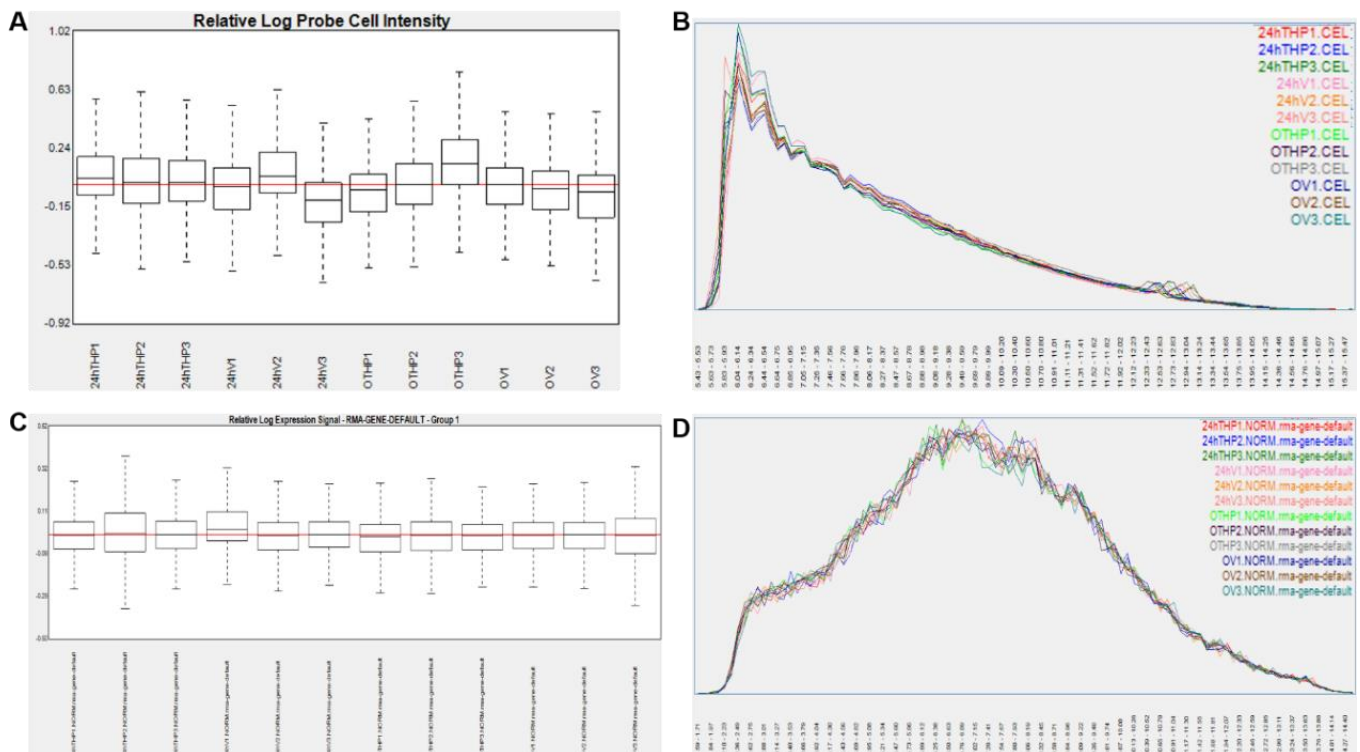


Figura 12. Histogramas y distribución de los datos de expresión génica antes y después de la normalización. Gráfica de cajas (A) y Distribución de las señales (B) de los microarreglos antes de ser normalizados. Gráfica de cajas (C) y distribución de las señales (D) de los microarreglos después de ser normalizados.

Después de la normalización de los datos, se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado. Se consideró que los genes poseían una expresión diferencial si el valor de Fc era mayor a 1.5, es decir, que corresponde por lo menos a 1.5 veces de cambio en la expresión génica. También se consideró un valor de $p < 0.05$ para considerar como estadísticamente significativo a dicho resultado. Las muestras presentaron un gran número de cambios en su expresión debido a los tiempos de tratamiento y no con respecto a los tratamientos en sí, lo cual indica que hay una fuerte variación en la expresión génica debido a la duración del cultivo celular y no debido a cambios por efecto de la 3 α -THP, por ello, se cambió la agrupación de las muestras: Las correspondientes al tiempo 0 (10 min de tratamiento) fueron colocadas dentro de un mismo grupo, mientras que las muestras a 24 h de tratamiento, se agruparon de acuerdo a los tratamientos de 3 α -THP y V como se puede observar en la **Tabla 6**. Es importante mencionar que no todas las secuencias que aparecen en dicha tabla están anotadas, es decir, que hasta el momento no han sido asociadas a un gen o función particular. Las listas con los genes diferencialmente expresados se encuentran en la sección de anexos.

Tabla 6. Número de secuencias diferencialmente expresadas bajo tratamientos a 10 min o 24 h.

Contraste	No. de secuencias sobre-expresadas	No. de secuencias sub-expresadas
3 α -THP (24 h) vs. V (24 h)	1 (1)	11 (3)
3 α -THP (24 h) vs. Tratamientos a 10 min (V y 3 α -THP)	50 (28)	76 (66)
V (24 h) vs tratamientos a 10 min (V y 3 α -THP)	84 (39)	60 (47)

NOTA: El número de secuencias entre paréntesis son las que están anotadas.

En la **Figura 13** se muestran las gráficas de volcán obtenidas del software *Affymetrix® Transcriptome Analysis Console* (TAC). En ellas se graficó la tasa de cambio (Fc) con respecto al logaritmo base 10 del valor de p de las comparaciones de los grupos de vehículo (V) o de 3 α -THP durante 24 h con respecto al grupo de tratamientos de V y 3 α -THP del tiempo 0 (T 0, 10 min). Los puntos de color verde y rojo representan las secuencias que cumplieron con los criterios de inclusión previamente mencionados y que presentan subexpresión o sobreexpresión, respectivamente. No se muestra la gráfica de volcán del contraste entre los tratamientos de 3 α -THP y V a 24 h debido al bajo número de secuencias cuya expresión se modificó.

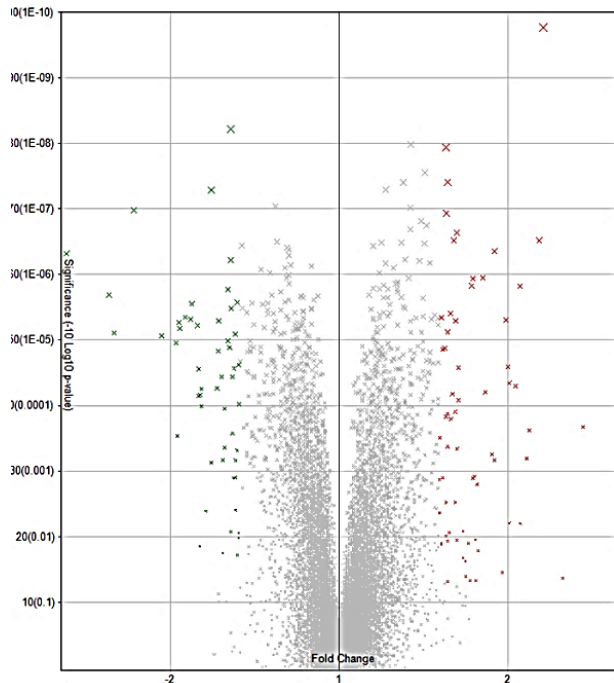
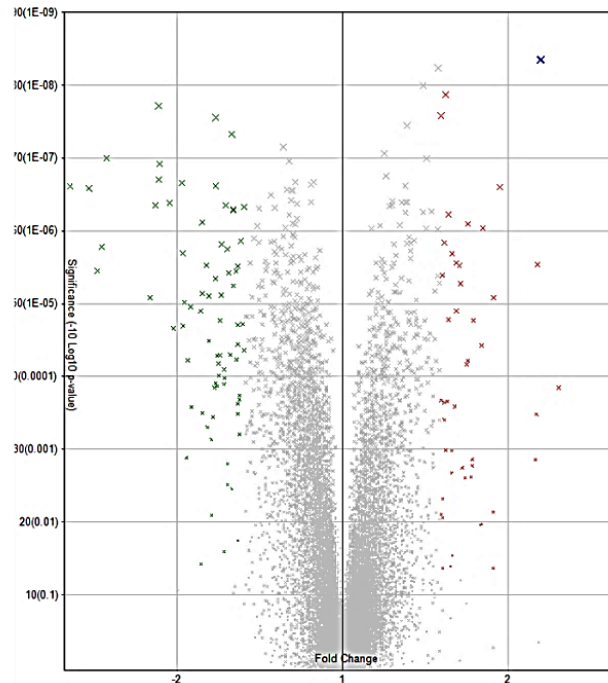
A) V 24 h vs. T 0**B) 3α-THP 24 h vs. T 0**

Figura 13. Diferencias en la expresión génica de la línea celular U87 tratada con V (A) o 3α-THP (B) durante 24 h con respecto al tiempo 0 (T 0). Cada punto representa la tasa de cambio con respecto al logaritmo del valor de significancia de las secuencias determinadas por medio de los microarreglos GeneChip® Human Gene 1.0ST de Affymetrix. Secuencias marcadas con color verde: tasa de cambio (Fold change, Fc) < 1.5 y $p < 0.05$ en la prueba de ANOVA. Secuencias marcadas con color rojo: $Fc > 1.5$ y $p < 0.05$ en la prueba de ANOVA.

Basados en los resultados anteriores de nuestro grupo de investigación donde se observó un aumento en la proliferación de las células U87 al tercer día de tratamiento (Zamora-Sánchez et al., 2017), se determinó nuevamente el perfil de expresión génica de dicha línea celular con tratamientos de vehículo, 3α-THP (10 nM), P₄ (10 nM) y un inhibidor del metabolismo de la P₄, la finasterida (F, 100 nM), bajo la hipótesis de que los cambios en el perfil de expresión génica serían más evidentes el día en el que se presentan las diferencias significativas en la proliferación celular.

8.3 Análisis de la expresión génica a 72 h de tratamiento

Para determinar el perfil de expresión génica de la línea celular U87 al ser tratada con vehículo, 3α-THP (10 nM), P₄ (10 nM) y F (100 nM) durante 72 h, se realizaron subcultivos de dicha línea celular y se sembraron 65,000 células por pozo en cajas de 12 pozos. 24 h antes de poner los

tratamientos, el medio fue cambiado a uno DMEM sin rojo de fenol y sin hormonas. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se realizó la extracción del RNA. El RNA obtenido se cuantificó y se corroboró la integridad del mismo mediante un gel de agarosa al 1.5% (**Figura 23** de la sección de anexos); las muestras presentaron una buena relación entre las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ribosoma (2:1). Además, se realizaron los análisis por electroforesis capilar mediante un bioanalizador (Agilent 2100 Bioanalyser) y el software 2100 Expert y se obtuvo un valor de RIN mayor a 8.0 (**Tabla 11** de la sección 12 de anexos). Lo anterior fue un fuerte indicativo de que podían ser utilizadas para la generación del correspondiente cRNA para su hibridación con los microarreglos.

Nuevamente, se emplearon los microarreglos GeneChip® Human Gene 1.0 ST de Affymetrix. Una vez obtenidos los archivos de salida, se realizó la normalización de éstos con el software Expression Console™ 1.4.1 de Affymetrix a fin de obtener nuevos archivos (.CHP) a partir de los cuales, se realizaron diferentes contrastes estadísticos para obtener los genes diferencialmente expresados en los diferentes tratamientos. En la **Figura 14** se muestran los gráficos de distribución de las señales de cada microarreglo, antes y después de la normalización de los datos.

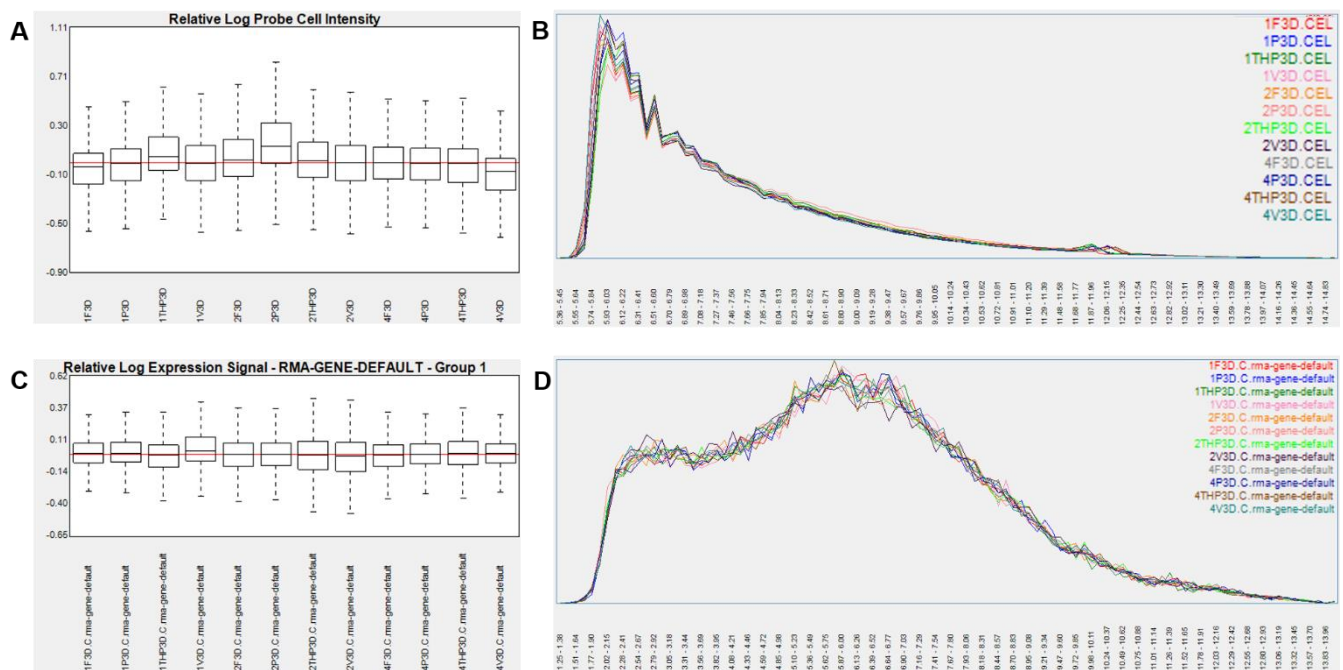


Figura 14. Histogramas y gráficas de distribución de los microarreglos de las células U87 tratadas durante 72 h, antes y después de la normalización. Gráfica de cajas (A) y distribución de las señales (B) de los

microarreglos antes de ser normalizados. Gráfica de cajas (C) y distribución de las señales (D) de los microarreglos después de ser normalizados.

El análisis estadístico se realizó en el software TAC. Se consideraron como diferencialmente expresados, aquellos genes con un valor de $F_c \geq 1.5$ y de $p < 0.05$. Los contrastes realizados y el número de genes diferencialmente expresados con respecto al vehículo fueron las que aparecen en la **Tabla 7**. No todas las secuencias que aparecen en la tabla, están anotadas, es decir, no han sido asignadas a genes o función alguna hasta este momento, sólo aquellas que se muestran entre paréntesis. Los genes que resultaron diferencialmente expresados en los contrastes de la **Tabla 7** se encuentran en la sección de anexos.

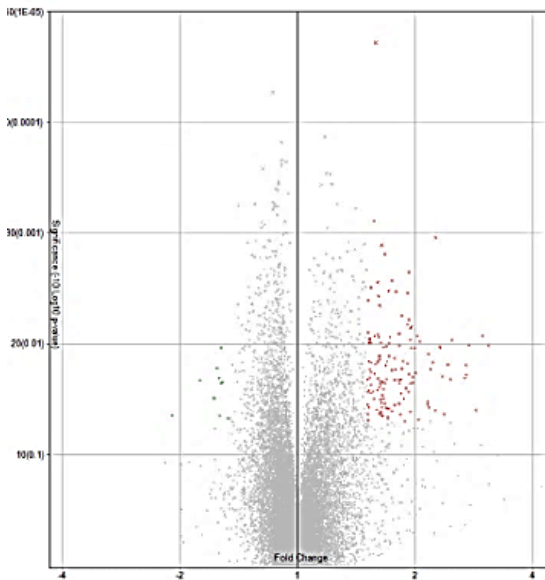
Tabla 7. Número de secuencias diferencialmente expresadas al contrastar estadísticamente a los diferentes tratamientos a 72 h.

Contraste	No. de secuencias sobre-expresadas	No. de secuencias sub-expresadas
3α-THP vs. V	143 (110)	10 (4)
P₄ vs. V	10 (3)	1 (1)
F vs. V	62 (37)	10 (4)
P₄ vs 3α-THP	27 (19)	2 (0)
P₄ vs. F	10 (4)	7 (4)
3α-THP vs F	5(2)	5 (3)

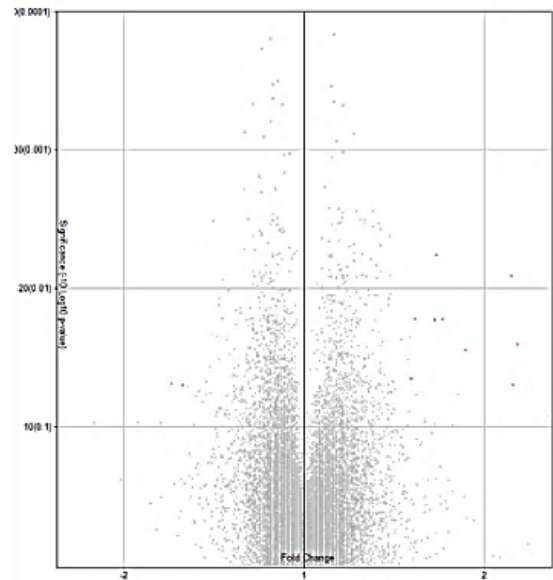
Nota: El número de secuencias entre paréntesis sí están anotadas.

En la **Figura 15** se muestran los gráficos de volcán de las comparaciones de 3 α -THP, P₄ y F con respecto al V, éstos fueron calculados por del software TAC de Affymetrix. Nuevamente, cada punto representa la tasa de cambio con respecto al logaritmo del valor de p de las secuencias evaluadas por el microarreglo. Las secuencias cuya expresión fue modificada significativamente debido a alguno de los tratamientos aparecen en color verde (subexpresados) o rojo (sobreexpresados). De manera consistente con lo que se reportó en la **Tabla 6**, se observa la 3 α -THP y la F tienen el mayor efecto sobre la expresión génica de la línea celular U87 que la P₄ después de 72 h de tratamiento.

A) 3 α -THP vs. V (72 h)



B) P4 vs. V (72 h)



C) F vs. V (72 h)

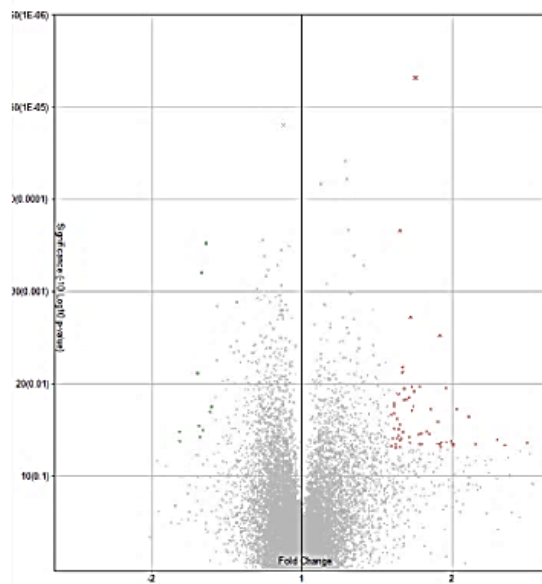


Figura 15. Efecto de la 3-THP (A), P4 (B) y F (C) sobre el perfil de expresión génica de la línea celular U87 a las 72 h de tratamiento. Cada punto representa la tasa de cambio con respecto al logaritmo del valor de significancia de las secuencias determinadas mediante los microarreglos GeneChip® Human Gene 1.0ST de Affymetrix. Puntos marcados con verde: tasa de cambio (Fold change, Fc)<-1.5 y p<0.05. Puntos marcados con rojo: Fc>1.5 y p<0.05 con respecto al V. El análisis estadístico realizado fue ANOVA.

Dado que la 3 α -THP y la F regularon la expresión de un alto número de genes, se realizó una comparación entre los genes que regulan la 3 α -THP y la F con respecto al vehículo. En la **Figura 16** se presenta el diagrama de Venn de dicha comparación, en el que se puede observar que existen 28 genes que están regulados tanto por 3 α -THP como por la F. Mientras que 85 y 13 genes están regulados sólo por 3 α -THP o por F, respectivamente.

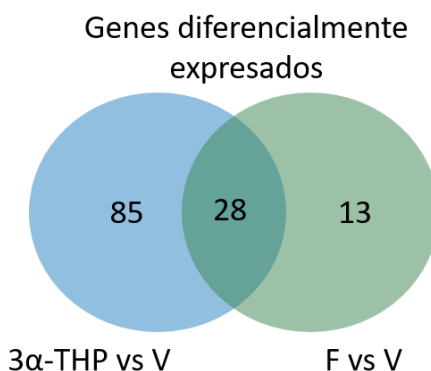


Figura 16. Comparación de los genes que son regulados por la 3 α -THP y por la F. Diagrama de Venn que muestra las secuencias que están anotadas y que están sobre- o subexpresadas con los tratamientos de 3 α -THP vs. V (círculo de color azul), de F vs. V (círculo de color verde) o que son reguladas por ambos (intersección de ambos conjuntos).

A partir de los resultados de los microarreglos y usando las herramientas del software TAC, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes. Lo anterior se realizó para determinar en qué procesos participan los productos génicos que se expresaron de manera diferencial con los tratamientos de 3 α -THP y F con respecto al vehículo. A partir de dicho análisis se encontraron expresados diferencialmente, a nivel de mRNA, proteínas que participan en: regulación de la transcripción, mitosis, reparación de daño a DNA y regulación de la organización del citoesqueleto. A partir de estos resultados, se eligieron algunos genes para validar su expresión por RT-qPCR. Dichos genes debían tener relevancia dentro de los procesos mencionados anteriormente y, además, mostrar una tasa de cambio mayor en los tratamientos de 3 α -THP y/o F con respecto al vehículo. Los genes elegidos y sus principales características se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Genes elegidos para validación, función y características.

Gen/ Localización	Nombre completo, características y función
<p>ROCK1 18q11.1</p>	<p><i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1</i></p> <p>Gen que codifica para una cinasa de serina/treonina. Guarda un 65% de identidad con la cinasa ROCK2 y un 92% de identidad con el dominio de cinasa de dicha proteína (Chin et al., 2015).</p> <p>ROCK1 es un efector de la GTPasa Rho y participa en la fosforilación de muchos sustratos en común con ROCK2. Fosforila a la cadena ligera de la miosina, misma que interacciona con otras proteínas promoviendo la formación de fibras de adhesión y regulando la organización del citoesqueleto de actina (Julian & Olson, 2014). Su sobreexpresión está correlacionada con un aumento en la invasión, migración, metástasis y proliferación en líneas celulares de cáncer de mama y pulmón (Hsu, Chang, & Lee, 2015; Li et al., 2006). Al mismo tiempo, la vía de Rho/ROCK se ha caracterizado como una de las más importantes en el control de la migración y la invasión en glioblastomas (Zohrabian, Forzani, Chau, Murali, & Jhanwar-Uniyal, 2009).</p>
<p>ROCK2 2p25.1</p>	<p><i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2</i></p> <p>Cinasa de serina/treonina, de la misma familia que ROCK1. Regula la división celular, la formación de filamentos de actina y la activación del factor de respuesta a c-fos. Contrario a ROCK1, se expresa mayoritariamente en SNC (Yin et al., 2015). Se encuentra asociado a los microfilamentos de actina; también se localiza en el núcleo de células el crecimiento, en las fibras de estrés (Hsu et al., 2015; Kato, Kano, & Noda, 2011).</p>
<p>CCDC91 12q11.22</p>	<p><i>Coiled-coil domain containing 91, proteína accesoria P56</i></p> <p>Participa en el transporte de proteínas en el aparato de Golgi. Se expresa ampliamente en líneas celulares de neuroblastoma, neuroepiteliales, de melanoma y fibroblastos; en ellas, interacciona con proteínas monoméricas GGA (por su nombre el inglés: Golgi-localized, gamma-ear containing, ADP-ribosylation factor binding) (C Gonzalo A. et al., 2007), juntas, participan en el transporte trans-Golgi y de endosomas (Bonifacino, 2004; Ghosh & Kornfeld, 2004).</p>

<p>DYNC2H1 11q22.3</p>	<p><i>Dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1</i></p> <p>Este gen codifica para la cadena pesada 1 de la dineina 2; se encuentra altamente conservado entre los vertebrados y está expresado de manera abundante en células ciliadas. La proteína forma homodímeros y se asocia con la cadena ligera intermedia DYNC2LI1 (Mikami et al., 2002). Tiene actividad de ATPasa y está involucrada en el transporte retrógrado de cilios y en el ensamblado de cilios y flagelos (Pfister et al., 2006). También podría participar en el transporte de proteínas en el aparato de Golgi, sin embargo, esto no se ha dilucidado completamente hasta el momento (Vaisberg, Grissom, & McIntosh, 1996).</p>
<p>REV3L 6q21</p>	<p><i>REV3-like, DNA directed polymerase zeta catalytic subunit</i></p> <p>Gen ortólogo del gen REV3 de <i>S. cerevisiae</i>, codifica para la subunidad catalítica de la polimerasa ζ, su secuencia en mamíferos se encuentra altamente conservada y es indispensable durante el desarrollo -su delección en ratones causa muerte embrionaria- (Makarova & Burgers, 2015). La polimerasa ζ es un complejo heterotetramérico constituido por: un heterodímero de REV3, REV7 y otras dos proteínas accesorias que comparte con la Pol δ (Baranovskiy et al., 2012). Está implicada en la reparación del daño al DNA de doble cadena, sin embargo, no tiene actividad de 3'→5' exonucleasa. Por lo tanto, mantiene la integridad del genoma a costa de la introducción de mutaciones, de ahí que, esté asociada al potencial tumorigénico de las células y/o a la progresión del cáncer (X. Zhu et al., 2016). Además, los ratones knockouts para REV3L presentan tumores espontáneos (Wittschieben et al., 2010).</p>
<p>RIF1 2q23.3</p>	<p><i>Replication timing regulatory factor 1</i></p> <p>Este gen codificante para la proteína RIF1, se caracterizó primero en levaduras, posteriormente, se vio que está altamente conservado entre especies (Smogorzewska & de Lange, 2004). RIF1 es un regulador positivo de la replicación del DNA (Hiraga et al., 2016) y además, participa en la reparación del DNA de doble cadena. Durante la anafase, RIF1 es reclutado, principalmente en la región centromérica, en donde las cadenas de DNA permanecen concatenadas antes de que la topoisomerasa II las separe; el silenciamiento de RIF1 se asocia a la formación de micronúcleos (Hengeveld et al., 2015). Asimismo, está involucrada en la reparación del DNA; se localiza en telómeros aberrantes y promueve la reparación del daño (Xu & Blackburn, 2004).</p>

<p>PCM1 8p22</p>	<p><i>Material pericentriolar 1</i></p> <p>La proteína codificante por este gen es un componente importante de los satélites pericentriolares. Se mantiene unida al centrosoma durante las fases G1, S y al inicio de la fase G2 (Balczon, Bao, & Zimmer, 1994). Es esencial para la localización de proteínas en el centrosoma y para el anclaje de los microtúbulos al centrosoma ya que recluta a la cinasa Pkl1 al material pericentriolar dependiendo de la dinámica de los cilios primarios (G. Wang et al., 2013). Aberraciones cromosómicas de este gen se han asociado con leucemia y cáncer de mama de aparición previa a la menopausia (Armes et al., 2004).</p>
<p>TPR 1q31.1</p>	<p><i>Translocated promoter region, nuclear basket protein</i></p> <p>Proteína que forma filamentos intracelulares anclados a la superficie del poro nuclear hacia la cara interna del núcleo, forma dímeros a través de su dominio N-terminal. Se requiere para la exportación de ARNm y proteínas del núcleo hacia el citoplasma (Ben-Efraim, Frosst, & Gerace, 2009). En la línea celular HeLa, el silenciamiento de TPR promueve el arresto del ciclo celular en G0-G1, la aparición de un fenotipo tipo senescente y la acumulación de P53 en el núcleo (David-Watine, 2011).</p>
<p>ESF1 20p12.1</p>	<p><i>ESF1 nucleolar pre-rRNA processing protein homolog</i></p> <p>Codifica para una proteína también denominada proteína asociada al activador de la transcripción basal 1 (ABT1) que se encuentra altamente conservada en una variedad de organismos (Peng et al., 2004). La proteína se localiza principalmente en el nucléolo, donde participa en la regulación de la transcripción de genes por la RNAPol II al unirse directamente y reprimir a la proteína ABT1 (Oda et al., 2004).</p>

8.4 Validación experimental del análisis por microarreglos.

Para comprobar algunos de los resultados obtenidos por medio de los microarreglos de expresión de la línea celular U87 tratada con V, 3 α -THP, P₄ o F durante 72 h, se evaluó la expresión, mediante RT-qPCR, de los genes descritos en la sección anterior. Éstos, se presentan agrupados de acuerdo a los procesos celulares en los que participan. En la **Tabla 9** se resumen los resultados de expresión de los genes elegidos para la validación; se reporta la tasa de cambio de acuerdo al tratamiento evaluado con respecto al vehículo y se designa con

una B, si la expresión del gen en cuestión presentó una expresión basal con respecto al vehículo.

Tabla 9. Genes con expresión diferencial y su tasa de cambio entre los distintos tratamientos comparados con el vehículo. P₄: progesterona (10 nM); 3 α -THP: alopregnanolona (10 nM); F: finasterina (100 nM) B: Expresión basal con respecto al vehículo (V).

Gen	Microarreglos			RT-qPCR				
	Tratamiento vs. V (tasa de cambio)			Tratamiento vs. V (Tasa de cambio)				
	P ₄	3 α -THP	F	P ₄	3 α -THP	F	3 α -THP+F	P ₄ +F
ROCK1	B	1.94	2.04	B	1.6	B	B	B
ROCK2	B	1.94	1.8	B	1.71	B	B	B
CCDC91	B	1.63	B	B	B	B		
DYNC2H1	B	1.64	1.55	B	2.40	2.25	B	1.96
REV3L	B	1.86	B					
RIF1	B	2.69	B					
TPR	B	2.75	B					
PCM1	B	1.68	1.54					
ESF1	B	3.07	2.01					

Para fines de la validación, además de los tratamientos de V, 3 α -THP, P₄ y F, se realizaron dos tratamientos conjuntos: P₄+F y 3 α -THP+F a las concentraciones utilizadas para los tratamientos individuales. El tratamiento de P₄+F se realizó con el fin de observar conjuntamente el efecto de la inhibición de la 5 α R y el de la P₄ sobre la expresión de genes específicos. El tratamiento de 3 α -THP+F se realizó para descartar que la F pudiera afectar las acciones de la 3 α -THP sola sobre la expresión de los genes validados. En cada figura se muestran barras sombreadas, éstas corresponden a los tratamientos en los que se observó un cambio en la expresión con respecto al vehículo por medio de los microarreglos, es decir, corresponden a los tratamientos en los que se esperaba obtener un cambio en la expresión, por lo menos, con respecto al vehículo mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados obtenidos mediante RT-qPCR se reportan como expresión relativa calculada mediante el método de Δ CT del gen de interés con respecto al rRNA 18S. Los genes se muestran agrupados de acuerdo al proceso celular en el que participan.

En la **Figura 17** se observan los resultados de la validación de ROCK1 y ROCK2, mismos que participan en la remodelación del citoesqueleto de actina. De acuerdo a los resultados de los microarreglos, se esperaba que tanto el tratamiento con 3 α -THP como el de F promovieran un aumento en la expresión de ambos genes (**Tabla 9**). Sin embargo, al realizar la validación por RT-qPCR, sólo el tratamiento de 3 α -THP promovió un aumento significativo en la expresión: 1.6 y 1.7 veces en cambio para ROCK1 y ROCK2, respectivamente. En el caso de ROCK2, la F presenta una ligera tendencia a aumentar la expresión de dicho gen. De manera interesante, el tratamiento de F inhibió el efecto de la 3 α -THP sobre la expresión de ROCK2, como puede observarse con el tratamiento conjunto (3 α -THP+F) en la **Figura 17b**, a pesar de que se observa esta misma tendencia en el caso de ROCK1 (**Figura 17a**), dicha diferencia no fue significativa.

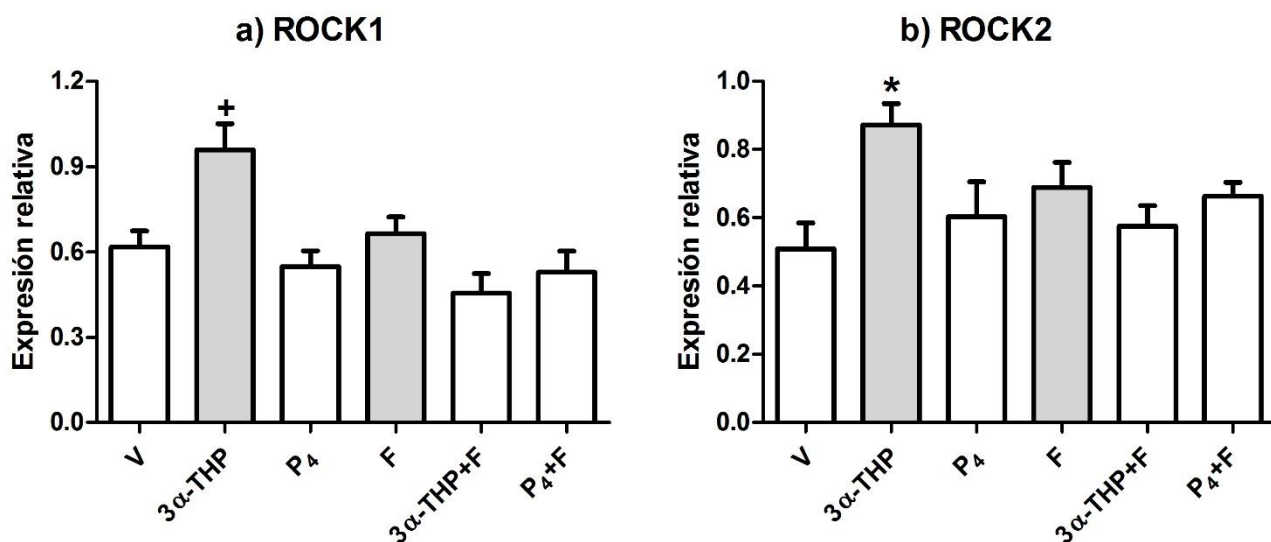


Figura 17. Efecto de la 3 α -THP, P₄ y F sobre la expresión de genes involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina. Se muestra la expresión relativa de ROCK1 y ROCK2 con respecto a la expresión del 18S. Cada barra representa la media \pm E.E.M considerando n = 5. ⁺p<0.05 vs V, P₄, F, 3 α -THP+F, P₄+F; ^{*}p<0.05 vs V y 3 α -THP+F. El análisis estadístico realizado fue ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

En la **Figura 18** se muestran los resultados de cambios en la expresión génica de DYNC2H1 y CCDC91, que están implicados en el transporte de proteínas del Aparato de Golgi. En el caso de DYNC2H1, tanto la 3 α -THP como la F aumentaron la expresión del gen (2.40 y

2.25 veces, respectivamente), lo cual, concuerda con los resultados de los microarreglos en donde se obtuvo una tasa de cambio de 1.64 en el caso de la 3 α -THP y 1.55 con el tratamiento de F; también la P₄ presentó una tendencia a aumentar dicha expresión, sin embargo, este aumento no fue significativo. Por otro lado, con tratamiento conjunto de P₄+F se observó un aumento de 1.96 veces en la expresión de DYNC2H1; mientras que con el tratamiento de 3 α -THP+F hubo un ligero aumento en la expresión del gen con respecto al V, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (**Figura 18a**). Con respecto a CCDC91, de acuerdo a los microarreglos, se esperaba que su expresión aumentara con el tratamiento de 3 α -THP, sin embargo, solo mostró una tendencia a aumentar con los tratamientos de 3 α -THP y con F. De manera interesante, los tratamientos de 3 α -THP+F y P₄+F disminuyeron la expresión de dicho gen con respecto a todos los demás tratamientos (**Figura 18b**).

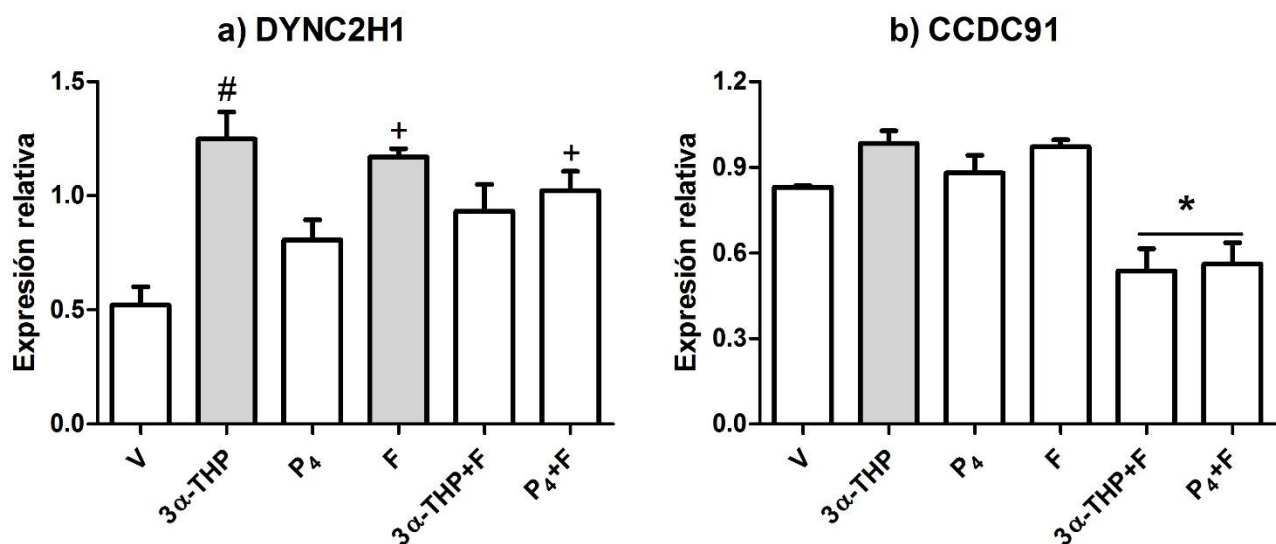


Figura 18. Efectos de la 3 α -THP, P₄ y F sobre la expresión relativa de los genes DYNC2H1 y CCDC91 con respecto al 18S. Cada barra representa la media \pm E.E.M y una n=5. #p<0.05 vs. V y P₄; +p<0.05 vs. V; *p<0.05 vs. V, 3 α -THP, P₄ y F.

En la **Figura 19** se presentan los resultados de expresión de REV3L y RIF1, que participan en la reparación del DNA. En el caso de ambos genes, sólo la 3 α -THP promovió su expresión mediante microarreglos. Como se puede observar en la **Figura 19a**, la expresión de REV3L fue aumentada 1.84 veces por la 3 α -THP, como se esperaba. También los tratamientos conjuntos

de 3 α -THP+F y P₄+F aumentaron su expresión (1.99 y 1.91 veces, respectivamente), los tratamientos de P₄ y de F no tuvieron efecto. Asimismo, la expresión de RIF1 (**Figura 19b**) fue inducida por la 3 α -THP (1.71 veces) y por la F (1.75 veces); el tratamiento conjunto de 3 α -THP+F también presentó una tendencia de aumentar la expresión de este gen, sin embargo, este aumento no fue significativo. Los tratamientos de P₄ y de P₄+F, no tuvieron efecto sobre la expresión de RIF1.

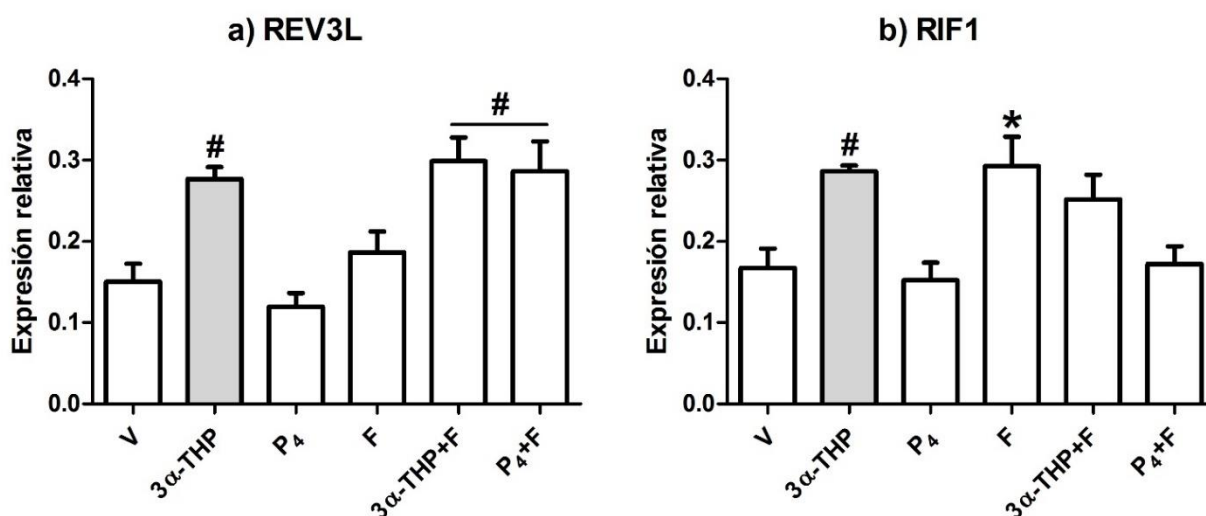


Figura 19. Efectos de la 3 α -THP, P₄ y F sobre la expresión relativa de genes involucrados en la reparación al DNA: REV3L y RIF1 con respecto a la expresión del 18S. Cada barra representa la media \pm el E.E.M. y una n=4 en el caso de REV3L y n=5 en el caso de RIF1. [#]p<0.05 V y P₄; ^{*}p<0.05 vs. V, P₄ y P₄+F.

Los genes PCM1 y TPR son importantes el mantenimiento de la estructura del núcleo y la división celular. Por medio de los microarreglos, se observó que la expresión de PCM1 era inducida por la 3 α -THP y por la F, mientras que la expresión de TPR se indujo únicamente por la 3 α -THP. Como puede observarse en la **Figura 20**, sólo la P₄ aumentó la expresión de PCM1 y de TPR, lo cual, no se esperaba. Además, la F inhibió el efecto de la P₄ sobre ambos genes, como puede observarse en las barras que corresponden al tratamiento conjunto de P₄+F.

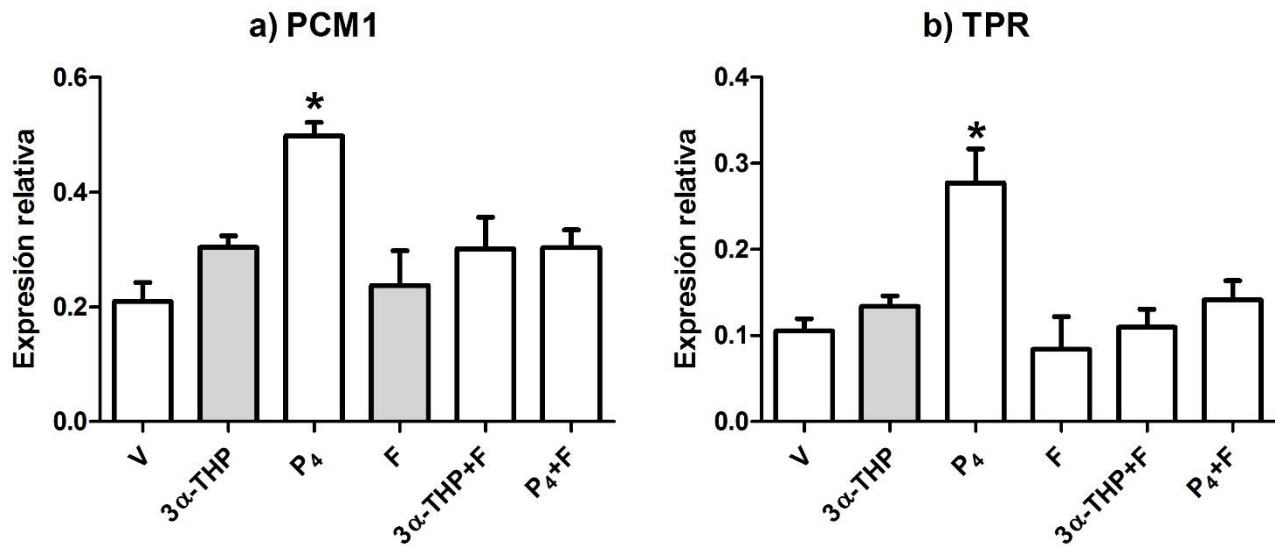


Figura 20. Efecto de la 3α-THP, P₄ y F sobre la expresión relativa de genes involucrados en la división celular: PCM1 y TPR con respecto al 18S. Cada barra representa la media ± el E.E.M. y una n=5 en el caso de PCM y n=4 en el caso de TPR. *p<0.05 vs. V, 3α-THP, F, P₄+F y 3α-THP+F.

En el caso de ESF1, implicado en la regulación de la transcripción, se observó que tanto la 3α-THP como la F indujeron la expresión de este gen en los experimentos de microarreglos. Por medio de la técnica de RT-qPCR se obtuvo un aumento significativo en la expresión de este gen con los tratamientos de 3α-THP y 3α-THP+F, como se observa en la **Figura 21**.

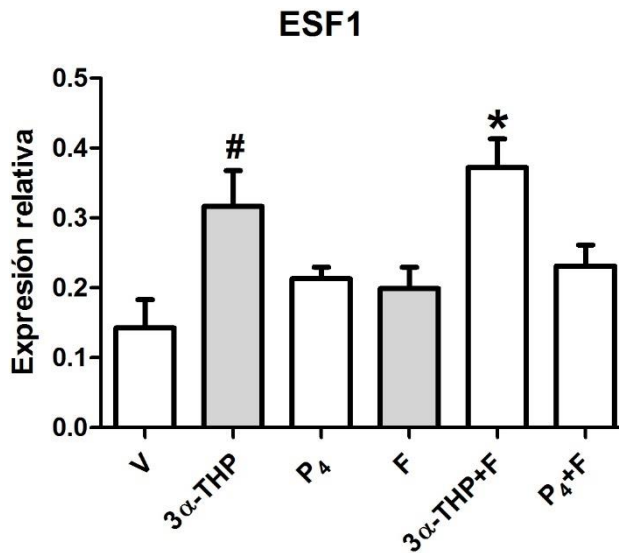


Figura 21. Efecto de la 3α-THP, P₄ y F sobre la expresión relativa de ESF1 con respecto al 18S. Cada barra representa la media ± el E.E.M. y una n=4. #p<0.05 vs. V; *p<0.05 vs. V, P₄ y F.

9. Discusión

Anteriormente, se reportó que las células U87, expresan a las isoformas de la 5 α R y que la 3 α -THP induce la proliferación y la expresión de genes importantes en el desarrollo de los gliomas humanos (ciclina D1, VEGF, EGFR y TGF β 1) (Zamora-Sánchez et al., 2017). También, se había reportado que diversas líneas celulares y de biopsias derivadas de gliomas, expresan a las enzimas necesarias para el metabolismo de la P₄ (Azzouni et al., 2012; R C Melcangi et al., 1998; B. Stoffel-Wagner et al., 2000). Lo anterior, es un indicativo de que los efectos de la P₄ sobre la proliferación (González-Agüero et al., 2007), invasión y migración de células derivadas de astrocitomas (Piña-Medina et al., 2016), podrían estar dados no sólo por la P₄, sino también por sus metabolitos, como se ha empezado a estudiar en cáncer de mama (John P. Wiebe et al., 2015; John P Wiebe et al., 2013). En este trabajo se evaluó el efecto de la 3 α -THP sobre el perfil de expresión génica de una línea celular derivada de un glioblastoma humano, a pesar de que aún no se conocen los mecanismos a través de los cuales, la 3 α -THP participa en el desarrollo de gliomas, este es un paso para determinar en qué tipo de procesos celulares está involucrado.

Antes de determinar el perfil de expresión génica de la línea celular U87 con los diferentes tratamientos, se realizó el genotipado de STR para verificar la autenticidad del cultivo celular con el que se cuenta en el laboratorio. Los STR son secuencias cortas (de 2 a 7 bases) que se repiten de 10 hasta 1000 veces, son heredables y altamente polimórficos dentro de una población, se pueden separar en clases discretas de alelos (2) y por el número de repeticiones que presentan. El uso de los STR que se detectaron y reportaron en la **Tabla 5** corresponden a los loci que fueron aprobados desde la década de 1990 por el proyecto CODIS del FBI para la determinación de la identidad de un individuo por medio de PCR multiplex (Butler, 2007; Jobling & Gill, 2004; Moretti et al., 2001). Con esta prueba, se obtuvo una concordancia del 96.55% con la línea celular U87 con características de GBM humano reportado en la ATCC. La única inconsistencia encontrada en nuestra línea celular con respecto a la reportada está en el STR D18S51 para el que reportamos los alelos 11.2 y 13. Sin embargo, el alelo 13 fue reportado anteriormente (Bady et al., 2012), pero el 11.2 no, lo cual podría deberse a las diferentes

metodologías y condiciones utilizadas para la detección de los STR o a los pases del cultivo de cada laboratorio.

Dada la identidad de la línea celular en nuestro laboratorio, ésta se utilizó para hacer una primera aproximación sobre el efecto de la 3 α -THP y del metabolismo de la P₄ sobre la línea celular U87 derivada de un GBM. Dados los efectos de la 3 α -THP que se reportan en este trabajo, sería interesante corroborar los resultados, que se discutirán a continuación, en cultivos celulares derivados de biopsias de GBMs y bajo condiciones libres de suero. Bajo dichas condiciones, se ha visto que las células retienen mejor unas características fenotípicas más similares al tumor de origen (Allen, Bjerke, Edlund, Nelander, & Westermark, 2016; Lee et al., 2006; Pollard et al., 2009).

Con el primer diseño experimental para evaluar las diferencias en la expresión génica de las células U87 tratadas con vehículo o 3 α -THP durante 10 minutos (denominado tiempo 0 a lo largo de todo el trabajo) y 24 h, se observó una marcada diferencia en la expresión debida al tiempo del cultivo y no a los tratamientos (**Tabla 6**). Esto, se debe a un fuerte efecto de lote en las muestras, es decir, a la diferencia que existe debida al tiempo de colecta de las muestras. A pesar de que se llevó a cabo la normalización de los datos, como suele hacerse cuando se presenta un efecto de lote (C. Chen et al., 2011; Walker et al., 2008), éste no se pudo corregir, por lo tanto, tampoco se pudo establecer una comparación clara entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, previamente se observó que dicho metabolito promueve la expresión de la ciclina D1 y VEGF a las 24 h de tratamiento (Zamora-Sánchez et al., 2017); a pesar de que se trata sólo de dos genes, debe considerarse que su determinación se realizó con una técnica mucho más precisa que los microarreglos (RT-qPCR), como se discutirá más adelante.

Haciendo una comparación entre los tratamientos a 24 h con respecto al tiempo 0, se encontró una mayor cantidad de genes subexpresados que sobreexpresados, como se reporta en la **Tabla 5** de los resultados. Algunos genes que se subexpresaron eran: genes codificantes para variantes de histonas, modificadores de histonas, genes asociados a senescencia, componentes integrales de membrana, receptores acoplados a proteínas G y la subunidad ϵ del receptor GABA_A. Entre los que se encontraron sobreexpresados están: genes codificantes para proteínas transmembranales de la familia de transportadores SLC, genes que regulan positivamente a la angiogénesis y señales de supervivencia mediadas por HIF1 (**Tablas 12 y**

13 de la sección de anexos). Estos últimos, forman parte de los genes que ya se sabe, están sobreexpresados en los glioblastomas (Iwadate, 2016; Rich et al., 2005; Urbańska, Sokołowska, Szmidt, & Sysa, 2014).

Dados los resultados anteriores, se partió del antecedente obtenido previamente en nuestro laboratorio para establecer los cambios en la expresión génica de las células U87 en un punto en el tiempo de tratamiento en el que ya se había observado un cambio en un proceso celular. En dicho estudio, se observó que la 3 α -THP indujo el aumento en el número de células y la proliferación a las 72 h de tratamiento (Zamora-Sánchez et al., 2017). Además de la 3 α -THP, se incluyeron los tratamientos de P₄ (que también promueve la proliferación celular a las 72 h de tratamiento) y la F, que no modifica la proliferación con respecto al V.

Como se observa en la **Figura 16**, por lo menos 25 genes se indujeron no sólo por la 3 α -THP, sino por la F. Hasta el momento, sólo hay reportes poco concluyentes sobre el efecto de la F sobre algún receptor nuclear o algún mecanismo que pudiera activar directamente la expresión génica. En cáncer de próstata se ha visto que podría modificar la expresión del receptor a andrógenos, tras la administración crónica de la F en pacientes (Bauman et al., 2014); también se ha reportado una disminución de la expresión de VEGF en la microvasculatura de pacientes con este tipo de cáncer (Pareek et al., 2003) y en tejido renal de ratas diabéticas (Tian et al., 2015). Dado lo anterior, se asume que sus efectos sobre la expresión génica de las células U87 se deben principalmente a su efecto sobre de la inhibición de la 5 α R.

La 5 α R controla la reducción de un número importante de metabolitos esteroides. Éstos deben tener una estructura de 19-21 átomos de carbono, un grupo 3-ceto (grupo carbonilo en el C3) y un enlace $\Delta^{4,5}$ (doble enlace entre el C4 y C5). La 5 α R requiere del cofactor NADPH para romper del doble enlace entre los C4 y C5 de los esteroides e insertar el anión H⁻ en la cara α del C5 y un protón en la cara β del C4. Basadas en dichas características, los sustratos de la 5 α R, además de la P₄ son: la testosterona, la androstenediona, la aldosterona, el cortisol y la desoxicorticosterona (Azzouni et al., 2012). En líneas celulares de gliomas –como la C6 derivada de un glioma de rata o la 1321N1 derivada de un astrocitoma–, la 5 α R no sólo se expresa, sino que utiliza como sustrato preferencial a la P₄ (a partir de la cual se produce la 5 α -DHP) y no a la testosterona (Maayan et al., 2004); de manera interesante, en éstas células,

la concentración de 3 α -THP es muy similar a la de 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol, el metabolito producido de la reducción de dihidrotestosterona (Birgit Stoffel-Wagner et al., 2003). Cabe señalar que varios metabolitos esteroides 5 α -reducidos, pueden unirse a los mismos receptores que la 3 α -THP y ejercer efectos muy similares a esta, como el 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol que también es un modulador positivo del receptor GABA_A (Reddy & Jian, 2010).

Asimismo, existen muchos otros metabolitos de la P₄ cuya síntesis no depende de la 5 α R, sino de otras enzimas. Por lo tanto, la inhibición de la 5 α R por medio de la F podría promover vías alternas de metabolismo de la P₄, de tal forma que éstos tengan un efecto sobre la expresión génica similar al de la 3 α -THP. La 3 α -hidroxi-4-pregnen-20-ona, por ejemplo, se genera por acción directa de la 3 α HSD sobre la P₄ (J P Wiebe et al., 2000) (**Figura 8** de los antecedentes) y, modula positivamente al receptor GABA_A (Beck et al., 1997). Por su estructura, estos metabolitos podrían ejercer algún efecto sobre los mPRs, sin embargo, esto no se ha evaluado. Cabe mencionar que la activación del receptor GABA_A o de los mPRs convergen en cascadas de señalización que activan, por fosforilación, al factor de transcripción CREB (Brinton, 2013; Valadez-Cosmes et al., 2016). Se sabe que CREB se encuentra sobreexpresado en biopsias y en líneas celulares de astrocitomas, de manera directamente proporcional al grado de malignidad del tumor (Daniel et al., 2014).

A partir de los genes que resultaron diferencialmente expresados bajo tratamientos de 3 α -THP y de F, se llevó a cabo la elección de genes para su validación. La elección de éstos se basó en la tasa de cambio que presentaron con el tratamiento de 3 α -THP o F con respecto al vehículo, así como el proceso celular en el cual participan. Al momento de realizar la validación, las células U87 fueron tratadas con V, 3 α -THP, P₄ y con los tratamientos conjuntos. Estos últimos fueron: P₄+F –con el fin de observar si los efectos de la P₄ están mediados por el metabolismo de ésta a través de la 5 α R– y 3 α -THP+F, para determinar si los efectos de la 3 α -THP sobre la expresión génica podrían depender de otros metabolitos producidos a través de la 3 α HSD, considerando que las células, de manera endógena pudieran producir a la P₄.

A las 72 h de tratamiento, la 3 α -THP indujo la expresión de ROCK1 y ROCK2 (**Figura 17**) con las dos metodologías utilizadas; la F, por sí misma, no tuvo efecto sobre la expresión de dichos genes, sin embargo, inhibió de manera significativa el efecto de la 3 α -THP sobre la

expresión de ROCK1 y ROCK2, como se observó con el tratamiento conjunto. Lo anterior, sugiere que no sólo la 3 α -THP, sino otros metabolitos de la P₄ –como la 3 α -hidroxi-4-pregnen-20-ona o la 5 α -DHP–, cuya síntesis se ve afectada al inhibir a la 5 α R, son importantes para regular la expresión génica. Un indicio que permitiría dilucidar el posible mecanismo a través del cual, dichos esteroides regulan la expresión génica de ROCK1 y ROCK2 sería la búsqueda de elementos de respuesta a factores de transcripción –que son inducidos por los metabolitos de la P₄–, en la región promotora de éstos genes. En este sentido, es importante recordar que la 3 α -THP no se une al RP a través del cual, la P₄ lleva a cabo su mecanismo genómico, además, la 5 α -DHP también se une a dicho receptor (Schumacher et al., 2014) y puede modular también la expresión génica. Las cinasas ROCK son efectores de la GTPasa Rho, y reguladores claves de la morfología, la invasión, la migración y la proliferación celular (Hsu et al., 2015; Katoh et al., 2011; Li et al., 2006). La sobreexpresión de ambos genes se ha caracterizado en cáncer de mama (Hsu et al., 2015), cáncer de células pequeñas de pulmón (Li et al., 2006). Sin embargo, su sobreexpresión, no implica que haya cambios en la actividad de dichas enzimas y en el papel que tienen sobre alguno de los procesos ya mencionados, por ello, sería interesante evaluar si bajo tratamientos con 3 α -THP también hay cambios en la activación de estas proteínas y su activación puede modificar la invasión o la migración de las células U87.

Por otro lado, la 3 α -THP y la F, promueven la expresión de DYNC2H1 (**Figura 18a**). Así, la expresión de este gen parece estar regulado por diferentes metabolitos y posiblemente, por diversos mecanismos. La expresión de este gen se podría promover por diferentes miembros de la familia de proteínas de dedos de zinc (ZNF), algunos de los cuales también se vieron sobreexpresados por los tratamientos de 3 α -THP y/o F pero no se validaron. Cabe señalar que el producto de este gen se localiza principalmente en el Aparato de Golgi y en cilios (Pfister et al., 2006), y es muy importante para que el transporte de diferentes solutos. En las células U87, U251, se ha visto que la expresión de DYNC2H1 y su localización en el citoplasma está relacionada con resistencia a la temozolomida, el principal agente terapéutico utilizado en el tratamiento de los glioblastomas (H. Wang et al., 2016). La expresión de CCDC91 no fue modificada por la 3 α -THP y la F solas, sin embargo, los tratamientos conjuntos disminuyeron significativamente su expresión (**Figura 18b**). Lo anterior, podría estar relacionado con el tipo

de factor de transcripción o de correpresores que son reclutados a la región promotora de dicho gen para reprimir su expresión.

La expresión de REV3L (**Figura 19a**) aumentó con la 3 α -THP y dicho efecto se mantuvo con el tratamiento de 3 α -THP+F y P₄+F. Ésto podría señalar que la 3 α -THP participa en la regulación de la expresión de este gen y que otros metabolitos 3 α -reducidos de la P₄ también podrían incrementar su expresión; ya que al aumentar la concentración de P₄ en el medio de cultivo e inhibir a la 5 α R, se podría favorecer la reducción directa de la P₄ a 3 α -hidroxi-4-pregnen-20-ona por la 3 α HSD (J P Wiebe et al., 2000). Dicho metabolito, como ya se mencionó, también es un agonista del receptor GABA_A (Bicikova et al., 2013). Como ya se mencionó, a través de la activación de GABA_A (o de los mPRs), se podría inducir la activación de CREB y regular la transcripción (Brinton, 2013). Cabe destacar que computacionalmente, se ha predicho la existencia de por lo menos, dos sitios de unión a CREB1 en la región promotora de REV3L (F. Zhu et al., 2003). De igual manera, la expresión de RIF1 (**Figura 19b**) aumentó con los tratamientos de 3 α -THP y de F solos. La expresión de ESF1 (**Figura 21**) presentó una tendencia similar a la descrita para REV3L y RIF1; la 3 α -THP indujo la expresión de ESF1. Dicha tendencia se mantuvo e incluso fue ligeramente mayor con el tratamiento de 3 α -THP+F, indicando que el efecto de la 3 α -THP no se modifica por la F.

De acuerdo a los resultados obtenidos con los microarreglos, se esperaba que la 3 α -THP aumentara la expresión de PCM1 y de TPR, sin embargo, ésta, fue inducida por la P₄. Además, dicho efecto fue abatido con la F, como se observa con tratamiento conjunto de P₄+F (**Figura 20**). Lo anterior indica que la P₄ modula la expresión de otros genes que no aparecieron dentro de los resultados obtenidos con los microarreglos, sin embargo, la expresión de PCM1 y TPR pareciera depender más de metabolitos 5 α -reducidos. Además, estos resultados refuerzan que, si bien, la técnica de microarreglos da una buena aproximación de los cambios en la regulación de la transcripción génica debida a diversas condiciones, también está sujeta muchas variables inherentes a la técnica que disminuyen su precisión. De ahí que cada vez más se recurra a otras técnicas como la secuenciación masiva para determinar modificaciones en el transcriptoma.

Existen diversos factores que pueden afectar la determinación de la expresión génica mediante microarreglos y que contribuyen a la adquisición de resultados falsos positivos o

negativos. Por ello, hay discrepancias entre los resultados de dicha técnica y los de la validación mediante RT-qPCR u otro tipo de técnicas. Algunas de estas variables son: la cantidad de RNA inicial, la eficiencia del marcado y de detección de la hibridación entre la muestra y las sondas en los microarreglos, así como los sesgos sistemáticos necesarios para la determinación de los niveles de expresión de cada muestra (Quackenbush, 2002). Con respecto a este último ejemplo, uno de los procesos más críticos previos a la determinación del perfil de expresión mediante microarreglos es el pre-análisis de la imagen adquirida.

El pre-análisis implica el filtrado y la normalización de los datos (Butte, 2002). El filtrado de las señales de intensidad obtenidas implica descartar el “ruido de fondo”, o la señal de fluorescencia basal y como las señales de hibridación con alta variabilidad de la imagen de los microarreglos. La variabilidad en las señales de hibridación, puede deberse a su parecido con la señal de ruido de fondo o a su alta intensidad; la normalización implica el ajuste de la intensidad de las señales de hibridación intra- e inter-microarreglo, para obtener resultados comparables y con un significado no sólo estadístico, sino biológico (Quackenbush, 2002). Existen diferentes aproximaciones matemáticas que permiten realizar el pre-análisis de los datos, sin embargo, todas dependen de las variables técnicas ya mencionadas. Si bien, la tecnología de los microarreglos ha tratado de minimizar los problemas ya mencionados con la mejora de los chips y de los equipos de lectura y adquisición de la imagen, aún no se ha eliminado del todo la adquisición de resultados falsos positivos o negativos. En las **Figuras 12 y 14**, se muestran los gráficos resultantes del pre-análisis de los microarreglos de células U87 tratadas durante 0-24 h y durante 72 h respectivamente, en el, se observa un gran parecido de los resultados de intensidad globales entre los diferentes microarreglos, lo cual permitió realizar la comparación entre todos los microarreglos utilizados.

Con el diseño experimental planteado se trató solventar al máximo la variación técnica entre las muestras. Se realizaron tres experimentos independientes por condición y la mezcla de los extractos celulares, seguido de la extracción del RNA total. Además, se utilizaron tres microarreglos por cada condición evaluada. A pesar de lo anterior, no se puede descartar la pérdida de resultados de expresión, sobre todo, de genes que se expresan muy poco. Esto último, ya se ha demostrado en un estudio comparativo entre la técnica de microarreglos y la de secuenciación (RNA-Seq) utilizando plataformas de Affymetrix (Zhao, Fung-Leung, Bittner,

Ngo, & Liu, 2014), y nuevamente, esto se debe a las características inherentes a los microarreglos.

Debe considerarse que la tasa de cambio de los genes diferencialmente expresados en este estudio, son pequeñas. A pesar de la sensibilidad de la técnica empleada para la validación de los resultados (RT-qPCR), se ha visto una baja correlación entre los resultados de expresión de los microarreglos con respecto a la técnica de RT-qPCR para genes cuya tasa de cambio es menor a 2 (Dallas et al., 2005; Morey, Ryan, & Van Dolah, 2006), como sucede con la mayoría de los resultados obtenidos. Sin embargo, la mayoría de los genes sobreexpresados con los tratamientos de 3 α -THP y que validamos mediante RT-qPCR, mostraron resultados de expresión similares a los obtenidos con los microarreglos. Esto refuerza la idea de que se partió de un diseño experimental, un manejo de las muestras y un análisis estadístico adecuados.

Bajo el diseño experimental planteado, la 3 α -THP modificó la expresión de un gran número de genes que están altamente enriquecidos en componentes del núcleo y la membrana nuclear, tal como TPR, elegido para la validación. Algunos genes cuyos cambios en los niveles de expresión no se validó por RT-qPCR, sin embargo, parecieran estar sobreexpresados con el tratamiento de 3 α -THP en los microarreglos, son: los dominios ricos en AT- de la proteína 4A y 4B (ARID4A y ARID4B) y la proteína de unión a retinoblastoma 6 (RBBP6) –la tasa de cambio de éstas se muestra en la **Tabla 15** en los anexos–. ARID4A y ARID4B, junto con la proteína retinoblastoma (Rb), y las proteínas de unión a retinoblastoma, son parte de un complejo de desacetilasas de histonas. La expresión de estas proteínas está regulado por hormonas esteroides, por ejemplo, la RBBP1, que está regulada por el estradiol en un modelo de osteosarcoma humano (Monroe et al., 2006). Dicho complejo de desacetilasas de histonas, es un fuerte represor transcripcional a través de modificaciones epigenéticas. En cáncer de mama, ARID4A interactuar con BRMS1 –que también forma parte del complejo– y reprime la expresión de genes como EGFR e inhibe de la metástasis (Hurst et al., 2008). Además, en dicho tipo de cáncer, se ha visto una relación inversamente proporcional entre la expresión de BRMS1 y el RP; mientras que el RP se encuentra altamente expresado en metástasis de cáncer de mama, la expresión de BRMS1 disminuye (Hicks et al., 2006). En el caso de los astrocitomas, se ha visto que la expresión del RP es directamente proporcional al grado de malignidad del tumor, siendo en los astrocitomas de grado IV (glioblastomas) en donde se encuentra más expresado

(Cabrera-Muñoz, Hernández-Hernández, & Camacho-Arroyo, 2011). Lo anterior, es un fuerte indicador de que las hormonas esteroideas, y los metabolitos de la P₄ son reguladores importantes de la malignidad de diversos tipos de cáncer. Asimismo, sería interesante validar la expresión de ARID4A y ARID4B a nivel transcripcional y traduccional y determinar si estas proteínas participan en la regulación de otros genes que se vieron modificados por los tratamientos evaluados en este estudio.

Por otro lado, muchos otros genes sobreexpresados por la 3 α -THP están relacionados con promover la estabilidad cromosómica ante el estrés de la replicación génica, algunos ejemplos de esto son RAD50, BOD1L1, REV3L y ESCO1, mismos que podrían participar en el mantenimiento tumoral al evitar la muerte celular inducida por la inestabilidad del DNA propia del genoma de las células cancerosas. Asimismo, un aumento en la expresión de éstos podría estar correlacionada con un aumento en la proliferación celular que induce la 3 α -THP a las 72 h de tratamiento, como se reportó previamente por nuestro laboratorio (Zamora-Sánchez et al., 2017).

Finalmente, debe considerarse que éste es uno de los primeros estudios sobre el papel de los metabolitos de la P₄ en los glioblastomas, y que si bien, la determinación del perfil génico mediante los microarreglos, permite generar nuevas hipótesis, es necesario llevar a cabo más experimentos a fin de determinar si los resultados de este trabajo son representativos de lo que ocurre en las células tumorales de glioblastomas y de ser así, es necesario determinar a través de qué mecanismos, los metabolitos de la P₄ llevan a cabo sus efectos sobre la regulación de la transcripción.

10. Conclusiones

1. La 3 α -THP promueve la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la estabilidad del material genético en respuesta al daño al DNA, con la replicación del DNA, con la regulación del citoesqueleto y el transporte de proteínas en el aparato de Golgi, de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano.
2. La F bloqueó los efectos de la P₄ sobre la expresión de genes involucrados en la división celular (PCM1 y TPR) lo cual sugiere que los metabolitos de la P₄ participan en la regulación de dichos genes. Además, la F promueve la expresión de genes que también se inducen por la 3 α -THP. Lo cual sugiere que al inhibir a la 5 α R podrían afectarse vías alternas de síntesis de metabolitos de la P₄ que también participan en regular la expresión génica.

11. Referencias

- Adams, J. M., Thomas, P., & Smart, T. G. (2015). Modulation of neurosteroid potentiation by protein kinases at synaptic- and extrasynaptic-type GABAA receptors. *Neuropharmacology*.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., ... Parada, L. F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*, 15(1), 45–56.
- Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S., & Westermark, B. (2016). Origin of the U87MG glioma cell line : Good news and bad news. *Science Translational Medicine*, 354(8), 1–4.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., ... Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–116.
- Armes, J. E., Hammet, F., de Silva, M., Ciciulla, J., Ramus, S. J., Soo, W.-K., ... Venter, D. J. (2004). Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. *Oncogene*, 23(33), 5697–702.
- Atif, F., Yousuf, S., & Stein, D. G. (2015). Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 146.
- Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., & Mohler, J. (2012). The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Advances in Urology*, 2012, 530121.
- Bady, P., Diserens, A.-C., Castella, V., Kalt, S., Heinimann, K., Hamou, M.-F., ... Hegi, M. E. (2012). DNA fingerprinting of glioma cell lines and considerations on similarity measurements. *Neuro-Oncology*, 14(6), 701–711.
- Balczon, R., Bao, L., & Zimmer, W. E. (1994). PCM-1, a 228-kD centrosome autoantigen with a distinct cell cycle distribution. *Journal of Cell Biology*, 124(5), 783–793.
- Baranovskiy, A. G., Lada, A. G., Siebler, H. M., Zhang, Y., Pavlov, Y. I., & Tahirov, T. H. (2012). DNA polymerase δ and ζ switch by sharing accessory subunits of DNA polymerase δ . *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17281–17287.
- Baulieu, E. E. (1999). Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement*, 88(433), 78–80.
- Bauman, T. M., Sehgal, P. D., Johnson, K. A., Pier, T., Bruskewitz, R. C., Ricke, W. A., & Huang, W. (2014). Finasteride treatment alters tissue specific androgen receptor expression in prostate tissues. *The Prostate*, 74(9), 923–32.
- Beck, C. A., Wolfe, M., Murphy, L. D., & Wiebe, J. P. (1997). Acute, nongenomic actions of the neuroactive gonadal steroid, 3 alpha-hydroxy-4-pregnen-20-one (3 alpha HP), on FSH release in perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrine*, 6(3), 221–229.
- Belelli, D., Harrison, N. L., Maguire, J., Macdonald, R. L., Walker, M. C., & Cope, D. W. (2009). Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *The Journal of Neuroscience* :

The Official Journal of the Society for Neuroscience, 29(41), 12757–63.

- Belyaeva, O. V., Chetyrkin, S. V., Clark, A. L., Kostereva, N. V., SantaCruz, K. S., Chronwall, B. M., & Kedishvili, N. Y. (2007). Role of microsomal retinol/sterol dehydrogenase-like short-chain dehydrogenases/reductases in the oxidation and epimerization of 3 α -hydroxysteroids in human tissues. *Endocrinology*, 148(5), 2148–2156.
- Ben-Efraim, I., Frosst, P. D., & Gerace, L. (2009). Karyopherin binding interactions and nuclear import mechanism of nuclear pore complex protein Tpr. *BMC Cell Biology*, 10, 74.
- Bender, A. S., & Norenberg, M. D. (1998). Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 54(5), 673–80.
- Bicikova, M., Hill, M., Ripova, D., Mohr, P., & Hampl, R. (2013). Determination of steroid metabolome as a possible tool for laboratory diagnosis of schizophrenia. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 133(1), 77–83.
- Bonifacino, J. S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(1), 23–32.
- Brinton, R. D. (2013). Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(4), 241–50.
- Bristol, R. E. (2009). Low-grade glial tumors: are they all the same? *Seminars in Pediatric Neurology*, 16(1), 23–6.
- Buckner, J. C., Brown, P. D., O'Neill, B. P., Meyer, F. B., Wetmore, C. J., & Uhm, J. H. (2007). Central nervous system tumors. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(10), 1271–86.
- Butler, J. M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*, 43(4).
- Butte, A. (2002). The use and analysis of microarray data. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(12), 951–960.
- Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O. T., & Camacho-Arroyo, I. (2011). Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(13), 1663–7.
- Camacho-Arroyo, I., González-Agüero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., & Ondarza, R. (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 49(1), 1–7.
- Cantagrel, V., Lefeber, D. J., Ng, B. G., Guan, Z., Silhavy, J. L., Bielas, S. L., ... Gleeson, J. G. (2010). SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*, 142(2), 203–17.
- Gonzalo A. Mardones, Patricia V. Burgos, Doug A. Brooks, Emma Parkinson-Lawrence, Rafael Mattered, and J. S. B. (2007). The Trans-Golgi Network Accessory Protein p56 Promotes Long-Range Movement of GGA/Clathrin-containing Transport Carriers and Lysosomal Enzyme Sorting. *Molecular Biology of the Cell*, 18(1), 3486–3501.
- Chen, C., Grennan, K., Badner, J., Zhang, D., Gershon, E., Jin, L., & Liu, C. (2011). Removing batch effects in analysis of expression microarray data: An evaluation of six batch adjustment methods. *PLoS ONE*, 6(2).

- Chen, S., Wang, J. M., Irwin, R. W., Yao, J., Liu, L., & Brinton, R. D. (2011). Allopregnanolone Promotes Regeneration and Reduces β -Amyloid Burden in a Preclinical Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 6(8), e24293.
- Chen, Y.-H., & Gutmann, D. H. (2014). The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene*, 33(16), 2019–26.
- Chin, V. T., Nagrial, A. M., Chou, A., Biankin, A. V, Gill, A. J., Timpson, P., & Pajic, M. (2015). Rho-associated kinase signalling and the cancer microenvironment: novel biological implications and therapeutic opportunities. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17, e17.
- Clark, M. J., Homer, N., O'Connor, B. D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., ... Nelson, S. F. (2010). U87MG decoded: The genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genetics*, 6(1).
- Dallas, P. B., Gottardo, N. G., Firth, M. J., Beesley, A. H., Hoffmann, K., Terry, P. a, ... Kees, U. R. (2005). Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics*, 6(5), 59.
- Daniel, P., Filiz, G., Brown, D. V, Hollande, F., Gonzales, M., D'Abaco, G., ... Mantamadiotis, T. (2014). Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation. *Oncogenesis*, 3(April), e108.
- David-Watine, B. (2011). Silencing nuclear pore protein Tpr elicits a senescent-like phenotype in cancer cells. *PLoS ONE*, 6(7).
- Djebaili, M., Guo, Q., Pettus, E. H., Hoffman, S. W., & Stein, D. G. (2005). The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 22(1), 106–18.
- Dressing, G. E., Knutson, T. P., Schiewer, M. J., Daniel, A. R., Hagan, C. R., Diep, C. H., ... Lange, C. A. (2014). Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycle-dependent transcriptional programs in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(4), 442–57.
- Faivre, E., Skildum, A., Pierson-Mullany, L., & Lange, C. A. (2005). Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: Role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids*, 70(5–7 SPEC. ISS.), 418–426.
- Faroni, A., & Magnaghi, V. (2011). The neurosteroid allopregnanolone modulates specific functions in central and peripheral glial cells. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 103.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., ... Verma, I. M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6110), 1080–4.
- Frye, C. A., Manjarrez, J., & Camacho-Arroyo, I. (2000). Infusion of 3a, 5a-THP to the pontine reticular formation attenuates PTZ-induced seizures. *Brain Research*, 881, 98–102.
- Frye, C. a, Koonce, C. J., & Walf, A. a. (2014). Novel receptor targets for production and action of allopregnanolone in the central nervous system: a focus on pregnane xenobiotic receptor. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(April), 106.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., ... Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes &*

Development, 21(21), 2683–710.

- Ghosh, P., & Kornfeld, S. (2004). The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *European Journal of Cell Biology*, 83(6), 257–262.
- Giatti, S., Romano, S., Pesaresi, M., Cermenati, G., Mitro, N., Caruso, D., ... Melcangi, R. C. (2015). Neuroactive steroids and the peripheral nervous system: An update. *Steroids*.
- Godard, S., Getz, G., Delorenzi, M., Farmer, P., Kobayashi, H., Desbaillets, I., ... Hegi, M. E. (2003). Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Research*, 63(20), 6613–6625.
- González-Agüero, G., Gutiérrez, A. a, González-Espinosa, D., Solano, J. D., Morales, R., González-Arenas, A., ... Camacho-Arroyo, I. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, 32(2), 129–135.
- González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., Camacho-Arroyo, I., Gamboa-Domínguez, a, ... Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Research Bulletin*, 56(1), 43–48.
- Guennoun, R., Labombarda, F., Gonzalez Deniselle, M. C. C., Liere, P., De Nicola, a. F. F., & Schumacher, M. (2015). Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 146, 48–61.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, M. A. R., Camacho-Arroyo, I., & Garcia-Segura, L. M. (2007). Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein tau in the rat cerebellum. *Developmental Neurobiology*, 67(4), 510–20.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, M. A. R., Pinto-Almazán, R., González-Arenas, A., Campos, M. G., & Garcia-Segura, L. M. (2009). Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 87(2), 470–81.
- Hadjipanayis, C. G., & Van Meir, E. G. (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in Molecular Medicine*, 15(11), 519–530.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74.
- Hengeveld, R. C. C., de Boer, H. R., Schoonen, P. M., de Vries, E. G. E., Lens, S. M. A., & van Vugt, M. A. T. M. (2015). Rif1 Is Required for Resolution of Ultrafine DNA Bridges in Anaphase to Ensure Genomic Stability. *Developmental Cell*, 34(4), 466–474.
- Hicks, D. G., Yoder, B. J., Short, S., Tarr, S., Prescott, N., Crowe, J. P., ... Casey, G. (2006). Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 protein expression predicts reduced disease-free survival in subsets of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(22), 6702–8.
- Hiraga, S., Ly, T., Garzón, J., Hořejší, Z., Ohkubo, Y., Endo, A., ... Anne, D. (2016). Human RIF1 and Protein Phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation. *EMBO Reports*, 18(3), 403–419.

- Hsu, C.-Y., Chang, Z.-F., & Lee, H.-H. (2015). Immunohistochemical evaluation of ROCK activation in invasive breast cancer. *BMC Cancer*, *15*(1), 943.
- Hurst, D. R., Xie, Y., Vaidya, K. S., Mehta, A., Moore, B. P., Accavitti-Loper, M. A., ... Welch, D. R. (2008). Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(12), 7438–7444.
- Ignacio Camacho-Arroyo, Valeria Hansberg-Pastor, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez, M. C. (2017). *Mechanism of Progesterone Action in the Brain* (Vol. 3).
- Iwadate, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology Letters*, *11*(3), 1615–1620.
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. *Nature Reviews. Genetics*, *5*(10), 739–751.
- Julian, L., & Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, *5*(1), e29846.
- Katoh, K., Kano, Y., & Noda, Y. (2011). Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, *8*(56), 305–311.
- Kim, T. S., Halliday, A. L., Hedley-Whyte, E. T., & Convery, K. (1991). Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *Journal of Neurosurgery*, *74*(1), 27–37.
- Langmade, S. J., Gale, S. E., Frolov, A., Mohri, I., Suzuki, K., Mellon, S. H., ... Ory, D. S. (2006). Pregnane X receptor (PXR) activation: A mechanism for neuroprotection in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(37), 13807–13812.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., ... Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, *9*(5), 391–403.
- Li, B., Zhao, W.-D., Tan, Z.-M., Fang, W.-G., Zhu, L., & Chen, Y.-H. (2006). Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells. *FEBS Letters*, *580*(17), 4252–4260.
- Liu, J., Rone, M. B., & Papadopoulos, V. (2006). Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(50), 38879–38893.
- Lockhart, E. M., Warner, D. S., Pearlstein, R. D., Penning, D. H., Mehrabani, S., & Boustany, R. M. (2002). Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture. *Neuroscience Letters*, *328*(1), 33–36.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97–109.
- Macconnaill, L. E., & Garraway, L. A. (2010). Clinical implications of the cancer genome. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(35), 5219–28.

- Mackowiak, B., & Wang, H. (2015). Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(9), 1130–1140.
- Makarova, A. V., & Burgers, P. M. (2015). Eukaryotic DNA polymerase ζ . *DNA Repair*, 29(5), 47–55.
- Marinis, E. De, Ascenzi, P., & Marino, M. (2009). Molecular Aspects of Medicine Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(5), 297–343.
- Melcangi, R. C., Cavarretta, I., Magnaghi, V., Ballabio, M., Martini, L., & Motta, M. (1998). Crosstalk between normal and tumoral brain cells. Effect on sex steroid metabolism. *Endocrine*, 8(1), 65–71.
- Melcangi, R. C., Cavarretta, I. T. R., Ballabio, M., Leonelli, E., Schenone, A., Azcoitia, I., ... Magnaghi, V. (2005). Peripheral nerves: A target for the action of neuroactive steroids. *Brain Research Reviews*, 48(2), 328–338.
- Melcangi, R. C., Celotti, F., & Martini, L. (1994). Progesterone 5- α -reduction in neuronal and in different types of glial cell cultures: type 1 and 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Brain Research* (Vol. 639).
- Melcangi, R. C., Giatti, S., Calabrese, D., Pesaresi, M., Cermenati, G., Mitro, N., ... Caruso, D. (2014). Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology*, 113, 56–69.
- Mikami, A., Tynan, S. H., Hama, T., Luby-Phelps, K., Saito, T., Crandall, J. E., ... Vallee, R. B. (2002). Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells. *J Cell Sci*, 115(Pt 24), 4801–4808.
- Monroe, D. G., Secreto, F. J., Hawse, J. R., Subramaniam, M., Khosla, S., & Spelsberg, T. C. (2006). Estrogen receptor isoform-specific regulation of the retinoblastoma-binding protein 1 (RBBP1) gene: Roles of AF1 and enhancer elements. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 28596–28604.
- Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Smerick, J. B., & Budowle, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46(3), 647–60.
- Morey, J. S., Ryan, J. C., & Van Dolah, F. M. (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8(1), 175–93.
- Morita, K., Tsuruo, Y., Ishimura, K., Her, S., & Ann, R. (1999). Influence of serum-free culture conditions on steroid 5 α -reductase mRNA expression in rat C6 glioma cells, 179–182.
- Nguyen, P. N., Billiards, S. S., Walker, D. W., & Hirst, J. J. (2003). Changes in 5 α -pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatric Research*, 53(6), 956–964.
- Nussey, S., & Whitehead, S. (2001). Principles of endocrinology. In *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Oda, T., Fukuda, A., Hagiwara, H., Masuho, Y., Muramatsu, M. A., Hisatake, K., & Yamashita, T. (2004). ABT1-associated protein (ABTAP), a novel nuclear protein conserved from yeast to mammals, represses transcriptional activation by ABT1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(4), 788–806.

- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., ... Barnholtz-Sloan, J. (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 14(suppl 5(February)), 1–57.
- Pang, Y., Dong, J., & Thomas, P. (2013). Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 154(1), 283–295.
- Pareek, G., Shevchuk, M., Armenakas, N. a, Vasjovic, L., Hochberg, D. a, Basillote, J. B., & Fracchia, J. a. (2003). The effect of finasteride on the expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density: a possible mechanism for decreased prostatic bleeding in treated patients. *The Journal of Urology*, 169(1), 20–3.
- Paris, J. J., Brunton, P. J., Russell, J. A., Walf, A. A., & Frye, C. A. (2011). Inhibition of 5 α -reductase activity in late pregnancy decreases gestational length and fecundity and impairs object memory and central progesterone milieu of juvenile rat offspring. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(11), 1079–1090.
- Pelletier, G. (2010). Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Progress in Brain Research*, 181, 193–207.
- Peng, W. T., Krogan, N. J., Richards, D. P., Greenblatt, J. F., & Hughes, T. R. (2004). ESF1 is required for 18S rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 32(6), 1993–1999.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2003–2007.
- Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A. A., ... Fisher, E. M. C. (2006). Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genetics*, 2(1), 11–26.
- Piña-Medina, A. G., Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Cerbón, M., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*, 105, 19–25.
- Pollard, S. M., Yoshikawa, K., Clarke, I. D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., ... Dirks, P. (2009). Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell*, 4(6), 568–580.
- Puia, G., Ravazzini, F., Castelnovo, L. F., & Magnaghi, V. (2015). PKC ϵ and allopregnanolone: functional cross-talk at the GABAA receptor level. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 1–6.
- Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*, 32(Sup), 496–501.
- Reddy, D. S., & Jian, K. (2010). The Testosterone-Derived Neurosteroid Androstanediol Is a Positive Allosteric Modulator of GABA A Receptors, 334(3), 1031–1041.
- Rich, J. N., Hans, C., Jones, B., Iversen, E. S., McLendon, R. E., Rasheed, B. K., ... West, M. (2005). Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.*, 65(10), 4051–4058.
- Rossetti, M. F., Cambiasso, M. J., Holschbach, M. A., & Cabrera, R. (2016). Oestrogens and Progesteragens: Synthesis and Action in the Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(7).

- Rupprecht, R., Reul, J. M. H. M., Trapp, T., Steensel, B. van, Wetzel, C., Damm, K., ... Holsboer, F. (1993). Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron*, *11*(3), 523–530.
- Saradhi, M., Sengupta, A., Mukhopadhyay, G., & Tyagi, R. K. (2005). Pregnane and Xenobiotic Receptor (PXR/SXR) resides predominantly in the nuclear compartment of the interphase cell and associates with the condensed chromosomes during mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1746*(2), 85–94.
- Sarkar, C., Jain, a, & Suri, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*, *46*(2), 108.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108.
- Schumacher, M., & Guennoun, R. (2010). Progesterone: Synthesis, metabolism, mechanisms of action, and effects in the nervous system: An overview. In *Hormones, Brain and Behavior Online* (Vol. 3, pp. 1505–1561).
- Schumacher, M., Mattern, C., Ghoumari, A., Oudinet, J. P., Liere, P., Labombarda, F., ... Guennoun, R. (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Progress in Neurobiology*, *113*, 6–39.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice. Neurology*, *2*(9), 494–503; quiz 1 p following 516.
- Sieghart, W. (2015). *Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 72). Elsevier Inc.
- Smith, J. L., Kupchak, B. R., Garitaonandia, I., Hoang, L. K., Maina, A. S., Regalla, L. M., & Lyons, T. J. (2008). Heterologous expression of human mPR α , mPR β and mPR γ in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*, *73*(11), 1160–1173.
- Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *73*, 177–208.
- Stiles, A. R., & Russell, D. W. (2010). SRD5A3: A surprising role in glycosylation. *Cell*, *142*(2), 196–8.
- Stoffel-Wagner, B., Beyenburg, S., Watzka, M., Blumcke, I., Bauer, J., Schramm, J., ... Elger, C. E. (2000). Expression of 5 α -Reductase and 3 α -Hydroxysteroid Oxidoreductase in the Hippocampus of Patients with Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia*, *41*(2), 140–147.
- Stoffel-Wagner, B., Watzka, M., Steckelbroeck, S., Ludwig, M., Clusmann, H., Bidlingmaier, F., ... Beyenburg, S. (2003). Allopregnanolone serum levels and expression of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in hippocampal and temporal cortex of patients with epilepsy. *Epilepsy Research*, *54*(1), 11–19.
- Tang, Y. T., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J. M., Emtage, P. C., & Funk, W. D. (2005). PAQR proteins: A novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *Journal of Molecular Evolution*, *61*(3), 372–380.
- Taylor, R. L., Arno, G., Poulter, J. A., Khan, K. N., Morarji, J., Hull, S., ... Black, G. C. (2017). Association of Steroid 5 α -Reductase Type 3 Congenital Disorder of Glycosylation With Early-Onset Retinal Dystrophy. *JAMA Ophthalmology*, *135*(4), 339.

- Thomas, P., & Pang, Y. (2012). Membrane Progesterone Receptors: Evidence for Neuroprotective, Neurosteroid Signaling and Neuroendocrine Functions in Neuronal Cells. *Neuroendocrinology*, 96(2), 162–171.
- Tian, H., Zhao, C., Wu, H., Xu, Z., Wei, L., Zhao, R., & Jin, D. (2015). Finasteride reduces microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in renal tissue of diabetic rats. *The American Journal of the Medical Sciences*, 349(6), 516–520.
- Trauger, J. W., Jiang, A., Stearns, B. A., & LoGrasso, P. V. (2002). Kinetics of allopregnanolone formation catalyzed by human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type III (AKR1C2). *Biochemistry*, 41(45), 13451–13459.
- Uemura, M., Tamura, K., Chung, S., Honma, S., Okuyama, A., Nakamura, Y., & Nakagawa, H. (2008). Novel 5 α -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Science*, 99(1), 81–86.
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary Oncology (Poznań, Poland)*, 18(5), 307–12.
- Vaisberg, E. A., Grissom, P. M., & McIntosh, J. R. (1996). Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are colocalized to different cytoplasmic organelles, 133(4), 831–842.
- Valadez-Cosmes, P., Germán-Castelán, L., González-Arenas, A., Velasco-Velázquez, M. A., Hansberg-Pastor, V., & Camacho-Arroyo, I. (2015). Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 176–185.
- Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E. R., Cerbón, M., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434, 166–175.
- Walker, W. L., Liao, I. H., Gilbert, D. L., Wong, B., Pollard, K. S., McCulloch, C. E., ... Sharp, F. R. (2008). Empirical Bayes accommodation of batch-effects in microarray data using identical replicate reference samples: application to RNA expression profiling of blood from Duchenne muscular dystrophy patients. *BMC Genomics*, 9(1), 494.
- Wang, G., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, B., Zhuo, X., Liu, J., ... Zhang, C. (2013). PCM1 recruits Plk1 to the pericentriolar matrix to promote primary cilia disassembly before mitotic entry. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 6), 1355–65.
- Wang, H., Feng, W., Lu, Y., Li, H., Xiang, W., Chen, Z., ... Liu, Y. (2016). Expression of dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 (DHC2) associated with glioblastoma cell resistance to temozolomide. *Scientific Reports*, 6(August 2015), 28948.
- Wang, J. M., Johnston, P. B., Ball, B. G., & Brinton, R. D. (2005). The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(19), 4706–18.
- Wang, J. M., Liu, L., Irwin, R. W., Chen, S., & Brinton, R. D. (2008). Regenerative potential of allopregnanolone. *Brain Research Reviews*, 57(2), 398–409.
- Wegman-Ostrosky, T., Reynoso-Novern, N., Mejía-Pérez, S. I., Sánchez-Correa, T. E., Alvarez-

- Gómez, R. M., Vidal-Millán, S., ... Corona-Vázquez, T. (2016). Clinical prognostic factors in adults with astrocytoma: Historic cohort. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 146, 116–122.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., ... Reifenberger, G. (2015). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15017.
- What Is Cancer? - National Cancer Institute. (n.d.). Retrieved April 1, 2015, from <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>
- Wiebe, J. P., Muzia, D., Hu, J., Szwajcer, D., Hill, S. A., & Seachrist, J. L. (2000). The 4-pregnene and 5 α -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Research*, 60(4), 936–43.
- Wiebe, J. P., Rivas, M. a., Mercogliano, M. F., Elizalde, P. V., & Schillaci, R. (2015). Progesterone-induced stimulation of mammary tumorigenesis is due to the progesterone metabolite, 5 α -dihydroprogesterone (5 α P) and can be suppressed by the 5 α -reductase inhibitor, finasteride. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 149, 27–34.
- Wiebe, J. P., Zhang, G., Welch, I., & Cadieux-Pitre, H.-A. T. (2013). Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors. *Breast Cancer Research : BCR*, 15(3), R38.
- Wittschieben, J. P., Patil, V., Glushets, V., Robinson, L. J., Kusewitt, D. F., & Wood, R. D. (2010). Loss of DNA polymerase zeta enhances spontaneous tumorigenesis. *Cancer Research*, 70(7), 2770–2778.
- Xu, L., & Blackburn, E. H. (2004). Human Rif1 protein binds aberrant telomeres and aligns along anaphase midzone microtubules. *Journal of Cell Biology*, 167(5), 819–830.
- Yamana, K., Labrie, F., & Luu-The, V. (2010). Human type 3 5 α -reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2(3).
- Yin, H., Hou, X., Tao, T., Lv, X., Zhang, L., & Duan, W. (2015). Neurite outgrowth resistance to rho kinase inhibitors in PC12 Adh cell. *Cell Biology International*, 39(5), 563–576.
- Zamora-Sánchez, C. J., Hansberg-Pastor, V., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., & Camacho-Arroyo, I. (2017). Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids*, 119, 36–42.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.-P., Bittner, A., Ngo, K., & Liu, X. (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PloS One*, 9(1), e78644.
- Zhu, F., Yang, J., Xu, F., & Yu, Y. (2003). [Cloning and bioinformatics of human REV3 gene promoter region and its response to carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Zhejiang University. Medical Sciences*, 32(5), 393–7.
- Zhu, X., Zou, S., Zhou, J., Zhu, H., Zhang, S., Shang, Z., ... Chen, Y. (2016). REV3L, the catalytic subunit of DNA polymerase ζ , is involved in the progression and chemoresistance of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 35(3), 1664–1670.
- Zohrabian, V. M., Forzani, B., Chau, Z., Murali, R., & Jhanwar-Uniyal, M. (2009). Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. *Anticancer Research*, 29(1), 119–23.

12. Anexos

12.1 Determinación de la integridad del RNA utilizado para los microarreglos.

Una vez cuantificado, se verificó la integridad del RNA extraído mediante un gel de agarosa 1.5% en buffer TBE. En cada pozo se cargó el volumen equivalente a 1 µg de RNA por muestra. En la **Figura 22** se señalan las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

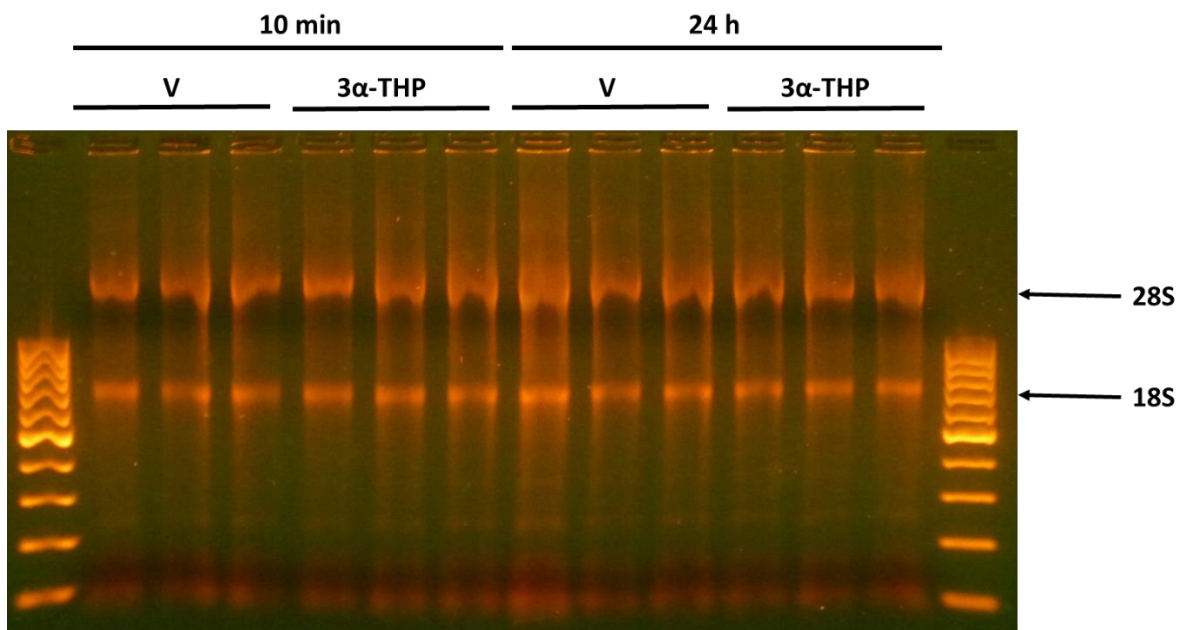


Figura 22. Gel de agarosa 1.5% para determinar la integridad de las muestras a ser analizadas mediante microarreglos, en cada carril se colocó el volumen de RNA equivalente a 1 µg de muestra en 2 µL de buffer de carga.

En la **Tabla 10** se observa que el valor del RIN en cada caso estuvo entre el 8.8 y 9.3 por lo que fueron aptas para continuar con el tratamiento necesario para la hibridación con los microarreglos.

Tabla 10. Resultados del RIN del RNA total de las células U87 con diferentes tratamientos a 0 y 24 h.

Código de muestra	RIN	[RNA] ng/uL	OBSERVACIONES
0V1	8.9	102.21	
0V2	9.1	107.39	
0V3	9.2	107.1	
0THP1	9.2	103.47	
0THP2	9.2	80.82	
0THP3	9.3	89.46	
24hV1	9.1	96.9	
24hV2	8.9	98.71	
24hV3	8.8	92.62	
24hTHP1	9	96.61	
24hTHP2	8.8	99.37	
24hTHP3	N/A	85.94	Corrida adelantada. Por comparación se estima RIN no menor a 8.5

Durante la segunda fase de los experimentos de microarreglos en donde se emplearon tratamientos de vehículo, 3 α -THP (10 nM), P4 (10 nM), F (100 nM) durante 72 h también se extrajo el RNA y se preparó un gel de agarosa para observar la integridad del RNA, como se muestra en la **Figura 23**.

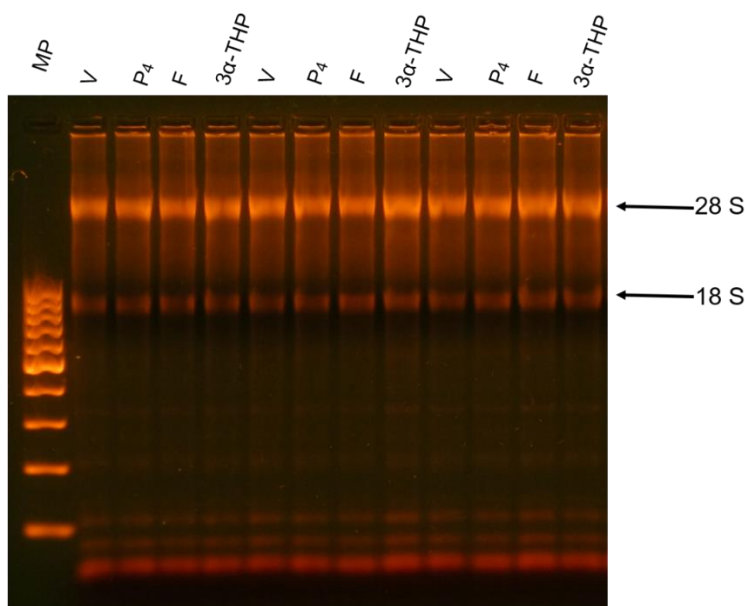


Figura 23. Gel de agarosa 1.5% para determinar la integridad de las muestras a ser analizadas mediante microarreglos, en cada carril se colocó el volumen de RNA equivalente a 1 μ g de muestra en 2 μ L de buffer de carga.

En la **Tabla 11** se muestra el valor del RIN de cada muestra, así como las características espectrofotométricas del RNA empleado para la segunda hibridación de microarreglos.

Tabla 11. Resultados del RIN para las muestras de RNA obtenidas después de 72 h de tratamiento.

Código de muestra	RIN	[RNA] ng/uL
1 V	8.80	85
1 P4	8.90	93
1 F	8.90	103
1 3α-THP	9.10	91
2 V	9	102
2 P4	8.80	119
2 F	8.90	117
2 3α-THP	8.90	118
3 V	8.70	118
3 P4	8.90	120
3 F	8.80	107
3 3α-THP	8.90	118

12.2 Listas de genes diferencialmente expresados

A continuación, se reportan los resultados de expresión diferencial de la línea celular U87 tratada con V o 3 α -THP durante 24 h con respecto a las células tratadas durante un breve periodo de tiempo (Tiempo 0), así como la comparación los resultados de la comparación entre la 3 α -THP y el V durante 24 h.

Tabla 12. Expresión diferencial de genes con el tratamiento de V (24 h) respecto al Tiempo 0.

V (24 h) vs Tiempo 0									
#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	ADM	2,31	1,73E-10	0,000005	44	KCNE4	1,63	0,000027	0,002738
2	TAF9B	-1,56	6,01E-09	0,000058	45	KCNJ15	-1,54	0,000027	0,002755
3	TAF9B	-1,56	6,01E-09	0,000058	46	HIST1H1A	-1,78	0,000028	0,002777
4	STC1	1,55	1,15E-08	0,000067	47	DNAJC15	-1,55	0,000037	0,003270
5	SLC6A8	1,56	3,95E-08	0,000145	48	ZCCHC5	-1,62	0,000037	0,003270
6	PRSS35	-1,69	5,17E-08	0,000150	49	HILPDA	2,06	0,000050	0,003813

7	GABRQ	-2,32	1,05E-07	0,000234	50	TRNAF14P	1,82	0,000063	0,004417
8	SLC6A8	1,55	1,16E-07	0,000242	51	TRA2A	1,59	0,000067	0,004529
9	VEGFA	1,62	2,29E-07	0,000371	52	GPR85	-1,77	0,000070	0,004598
10	TXNIP	1,6	3,00E-07	0,000405	53	EVI2A	-1,78	0,000071	0,004671
11	CA9	2,27	3,02E-07	0,000405	54	CLTC-IT1	1,63	0,000082	0,005046
12	NRN1	1,89	4,41E-07	0,000443	55	TRNAQ51P	-1,76	0,000103	0,005754
13	GPR183	-3,06	4,81E-07	0,000467	56	SERPINB5	-1,6	0,000112	0,005995
14	S100A3	-1,56	6,05E-07	0,000530	57	TSHZ2	1,61	0,000124	0,006294
15	CHI3L1	1,73	0,000001	0,000684	58	ABCA13	1,56	0,000133	0,006560
16	DDIT4	1,72	0,000001	0,000779	59	LOC100130713	1,55	0,000147	0,006900
17	PPP1R3C	2,1	0,000001	0,000779	60	MIR145	1,58	0,000161	0,007230
18	IL6	-1,58	0,000002	0,000806	61	NRIP3	-1,55	0,000265	0,009373
19	NETO2	-2,57	0,000002	0,000904	62	TMEM100	-1,94	0,000293	0,009970
20	GLDN	-1,52	0,000003	0,000990	63	CDRT1	-1,6	0,000441	0,012797
21	CGB7	-1,83	0,000003	0,001007	64	ACTBL2	-1,52	0,000484	0,013572
22	CYBASC3	-1,56	0,000003	0,001099	65	C9orf64	-1,61	0,000677	0,016335
23	CPA4	1,58	0,000004	0,001137	66	PPEF1	-1,53	0,000687	0,016433
24	APOBEC3B	-1,88	0,000004	0,001209	67	TNIP3	-1,69	0,000733	0,017052
25	IGFBP3	1,52	0,000005	0,001209	68	GULP1	-1,53	0,001259	0,023476
26	CXCL10	-1,84	0,000005	0,001220	69	TAS2R4	1,51	0,001347	0,024212
27	CLK1	1,98	0,000005	0,001227	70	BNIP3P1	1,55	0,003003	0,038869
28	CGB5	-1,64	0,000005	0,001233	71	BLID	1,51	0,004358	0,048875
29	CD180	1,61	0,000005	0,001233	72	RNU5E-4P	-1,56	0,008465	0,073000
30	CGB7	-1,93	0,000005	0,001274	73	TAS2R19	1,57	0,008622	0,073892
31	CGB5	-1,79	0,000006	0,001307	74	TRNAU2	-1,51	0,008868	0,074962
32	CGB5	-1,92	0,000007	0,001383	75	FSD2	1,75	0,011153	0,086184
33	SLC2A3	1,56	0,000007	0,001475	76	KLRC4-KLRK1	1,7	0,012666	0,092686
34	HIST1H2BM	-2,52	0,000008	0,001475	77	SNORD45C	-1,52	0,019149	0,120886
35	CDK15	-1,53	0,000008	0,001528	78	RNY3P3	1,75	0,047015	0,208690
36	LRRN3	-2,07	0,000009	0,001590	79	TAS2R50	1,54	0,052280	0,221707
37	TNFRSF9	-1,58	0,000010	0,001788	80	RN5S63	1,62	0,057897	0,235735
38	CGB5	-1,95	0,000011	0,001876	81	CDRT1	-1,64	0,075141	0,276433
39	MSC	-1,57	0,000013	0,002048	82	RN5S297	1,51	0,093205	0,312360
40	INSIG2	1,53	0,000014	0,002100	83	SNORA56	1,66	0,112460	0,346744
41	SLC43A3	-1,64	0,000015	0,002134	84	ACAA1	-1,56	0,291408	0,580631
42	PTGIS	-1,51	0,000024	0,002591	85	TRNASUP1	1,53	0,375008	0,657541
43	C10orf10	2	0,000026	0,002692	86	TRNAK36P	-1,55	0,567813	0,798286

Tabla 13. Expresión diferencial de genes con el tratamiento de 3 α -THP (24 h) respecto al Tiempo 0.

3 α -THP (24 h) vs Tiempo 0									
#	Gene Symbol	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gene Symbol	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	ADM	2,29	4,47E-09	0,000085	48	HIST1H1A	-2,24	0,000008	0,001298
2	SLC6A8	1,54	1,34E-08	0,000098	49	EVI2A	-1,94	0,000010	0,001415
3	APOBEC3B	-2,16	1,93E-08	0,000112	50	TRNAQ51P	-1,89	0,000011	0,001545
4	SLC6A8	1,51	2,63E-08	0,000116	51	DNAJC15	-1,81	0,000013	0,001613
5	PRSS35	-1,7	2,78E-08	0,000116	52	KCNE4	1,56	0,000017	0,001805
6	SCG5	-1,59	4,71E-08	0,000152	53	CLK1	1,73	0,000017	0,001827
7	GABRQ	-2,68	1,00E-07	0,000227	54	SERPINB5	-1,67	0,000017	0,001827
8	CGB7	-2,15	1,21E-07	0,000235	55	HECW2	-1,55	0,000020	0,001938
9	CGB5	-2,16	1,98E-07	0,000270	56	GPR85	-1,95	0,000020	0,001953
10	CGB7	-1,96	2,21E-07	0,000270	57	CDK15	-2,03	0,000022	0,002028
11	HIST1H4J	-1,7	2,42E-07	0,000270	58	PTGIS	-1,75	0,000032	0,002508
12	GPR183	-3,13	2,44E-07	0,000270	59	MIR145	1,79	0,000038	0,002736
13	PPP1R3C	1,93	2,51E-07	0,000270	60	KCNJ15	-1,51	0,000044	0,002945
14	HIST1H2BM	-2,89	2,60E-07	0,000270	61	FAM198B	-1,6	0,000050	0,003195
15	CGB5	-2,06	4,15E-07	0,000309	62	MBNL3	-1,69	0,000052	0,003251
16	S100A3	-1,63	4,45E-07	0,000309	63	PAX6	-1,56	0,000059	0,003459
17	CGB5	-2,19	4,46E-07	0,000309	64	CXCL10	-1,91	0,000060	0,003539
18	MARCH3	-1,51	4,76E-07	0,000312	65	HILPDA	1,69	0,000060	0,003539
19	GLDN	-1,58	5,07E-07	0,000314	66	LGR5	-1,68	0,000067	0,003674
20	TAF9B	-1,58	5,29E-07	0,000314	67	TRA2A	1,68	0,000069	0,003752
21	TAF9B	-1,58	5,29E-07	0,000314	68	CACNA2D1	-1,64	0,000080	0,004097
22	TXNIP	1,56	5,97E-07	0,000328	69	KYNU	-1,64	0,000106	0,004557
23	CGB5	-1,8	7,70E-07	0,000400	70	MSL3P1	-1,7	0,000123	0,005010
24	DDIT4	1,69	8,12E-07	0,000402	71	C3AR1	-1,64	0,000127	0,005114
25	NRN1	1,8	9,24E-07	0,000408	72	C9orf64	-1,69	0,000135	0,005301
26	ACTA2	-1,53	0,000001	0,000531	73	CPNE8	-1,71	0,000142	0,005420
27	SNORD30	-1,66	0,000002	0,000531	74	GUCY1B3	-1,54	0,000206	0,006651
28	NETO2	-2,74	0,000002	0,000565	75	LOC100130713	1,55	0,000220	0,006970
29	CYBASC3	-1,62	0,000002	0,000583	76	PLEKHH2	1,53	0,000228	0,007075
30	SLC43A3	-1,95	0,000002	0,000638	77	TBX15	-1,55	0,000239	0,007260
31	EFNA3	1,58	0,000002	0,000638	78	GRAMD1C	1,6	0,000259	0,007598
32	CHI3L1	1,61	0,000003	0,000710	79	TMEM100	-1,88	0,000264	0,007682
33	CA9	2,26	0,000003	0,000739	80	TNIP3	-1,8	0,000315	0,008501
34	MSC	-1,77	0,000003	0,000739	81	STEAP1	-1,72	0,000364	0,009189
35	CD180	1,63	0,000003	0,000739	82	SNHG1	-1,76	0,000499	0,011026
36	IL6	-1,55	0,000003	0,000749	83	VRK2	-1,54	0,000629	0,012537
37	LRRN3	-2,79	0,000004	0,000790	84	GULP1	-1,73	0,000736	0,013742
38	TMEM185B	-1,56	0,000004	0,000790	85	CDRT1	-1,92	0,001312	0,019430

39	MT1E	-1,61	0,000004	0,000807	86	OTOGL	-1,62	0,001590	0,021719
40	VEGFA	1,52	0,000004	0,000856	87	TRNAF14P	1,67	0,002467	0,029215
41	PLAU	-1,7	0,000005	0,000918	88	SNORD45C	-1,62	0,003057	0,033732
42	IGFBP3	1,64	0,000005	0,000992	89	SNORA20	1,52	0,004813	0,045674
43	CREB3L1	-1,58	0,000006	0,001036	90	DUSP5P	1,52	0,008717	0,066907
44	IL7R	-1,8	0,000007	0,001205	91	RPL34-AS1	-1,64	0,025409	0,131327
45	ZCCHC5	-1,66	0,000008	0,001246	92	RN5S297	1,58	0,028695	0,141318
46	TNFRSF9	-1,75	0,000008	0,001254	93	FSD2	1,57	0,040444	0,176096
47	C10orf10	1,88	0,000008	0,001298	94	SNORA14A	1,88	0,042847	0,182796

Tabla 14. Expresión diferencial de genes con el tratamiento de 3 α -THP (24 h) respecto a V (24 h).

3 α -THP (24 h) vs V (24 h)									
#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	KLRC4-KLRK1	-2,39	0,003614	0,979032	3	LOC100509445	-1,65	0,044231	0,979032
2	MSL3P1	-1,6	0,004019	0,979032	4	ZNF578	1,84	0,051077	0,979032

En esta sección se muestran 6 tablas de los genes diferencialmente expresados al comparar los tratamientos de 3 α -THP, P₄ o F con respecto al V o como resultado de las comparaciones entre los tratamientos durante 72 h. No se muestran las secuencias sin anotación, es decir, que aún no son asociadas a un gen o función, pero que presentan cambios en su expresión bajo los tratamientos evaluados.

Tabla 15. Expresión diferencial de genes con el tratamiento de 3 α -THP respecto a V.

3 α -THP vs V (72 h de tratamiento)									
#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	C12orf35	1,57	0,000776	0,776489	57	ANKRD36	1,57	0,018631	0,826767
2	OR5M6P	2,26	0,001100	0,793959	58	GOLGA4	1,93	0,018816	0,826767
3	DYNC2H1	1,64	0,001284	0,793959	59	SAMD9	2,7	0,019055	0,826767
4	TRNAK36P	1,67	0,001538	0,793959	60	ATRX	2,34	0,019600	0,826767
5	CLEC2D	1,54	0,003074	0,795220	61	ZNF267	1,97	0,019860	0,826767
6	ANKRD20A12P	1,71	0,003347	0,795220	62	KTN1	2,68	0,020332	0,826767
7	TAS2R20	1,91	0,003480	0,795220	63	SCAF11	1,53	0,020356	0,826767
8	ANKRD36C	1,61	0,003698	0,802061	64	KIAA2026	1,6	0,020523	0,826767
9	OR4F3	1,52	0,004022	0,802061	65	HNRNPU-AS1	1,69	0,020733	0,826767
10	ARID4B	1,62	0,004473	0,802061	66	RB1CC1	2,46	0,020861	0,826767

11	JMJD1C	1,85	0,005572	0,802061	67	RN5S217	1,51	0,021016	0,826767
12	ATRX	1,91	0,006640	0,802061	68	RBM41	1,82	0,021152	0,826767
13	GCC2	1,94	0,007224	0,802061	69	CEP290	1,67	0,022512	0,826767
14	NBEAL1	1,51	0,007851	0,802061	70	RNY4P21	-1,57	0,022594	0,826767
15	ZNF292	1,82	0,008075	0,802061	71	USP53	1,82	0,022627	0,826767
16	CCDC88A	2,97	0,008438	0,802061	72	ZC3H13	1,94	0,023006	0,826767
17	PRO2012	2,02	0,008482	0,802061	73	ESCO1	1,63	0,023018	0,826767
18	ZNF638	1,57	0,008511	0,802061	74	BAZ2B	1,54	0,023527	0,827631
19	BDP1	1,72	0,008619	0,802061	75	TAF1D	1,89	0,025071	0,829338
20	DLEU2	1,61	0,008625	0,802061	76	N4BP2	1,9	0,025502	0,830453
21	SMC5	1,53	0,009000	0,802061	77	OR4F15	1,6	0,026130	0,834459
22	ROCK1	1,94	0,009129	0,802061	78	MANEA	1,52	0,026382	0,834459
23	ANKRD30B	1,53	0,009131	0,802061	79	ANKRD36B	1,56	0,026980	0,837012
24	C10orf118	2,48	0,009256	0,802061	80	CWC22	1,51	0,026984	0,837012
25	ANKRD36C	1,53	0,009435	0,802061	81	NEMF	1,92	0,027133	0,837537
26	PPIG	2,05	0,009523	0,802061	82	ANKRD12	1,54	0,027802	0,837537
27	OR4F14P	1,54	0,009797	0,802061	83	ACAA1	-1,64	0,030779	0,849573
28	RALGAPA1	1,52	0,009861	0,802061	84	ETAA1	1,66	0,031081	0,849573
29	BDP1	1,71	0,009935	0,802061	85	MIR186	1,87	0,031098	0,849573
30	TPR	2,75	0,010266	0,802061	86	ZNF518A	1,63	0,031791	0,852119
31	ESF1	3,07	0,010348	0,802061	87	VPS13A	2,15	0,033512	0,852119
32	PIBF1	1,69	0,010481	0,802061	88	HMG5	1,64	0,033931	0,852119
33	RAD50	2,31	0,010596	0,802061	89	ZNF480	2,15	0,035492	0,852119
34	TAS2R19	1,99	0,010828	0,802061	90	ZNF117	1,77	0,035596	0,852119
35	TAS2R31	2,32	0,010920	0,802061	91	BLID	1,64	0,037330	0,852119
36	ZBTB41	1,95	0,010934	0,802061	92	LRRCC1	2,17	0,037470	0,852119
37	TRIP11	2,16	0,012401	0,816118	93	THOC2	1,52	0,037610	0,852119
38	NSRP1	1,62	0,012571	0,816118	94	PCM1	1,68	0,037829	0,852119
39	TAS2R50	1,71	0,012837	0,816118	95	KIAA1731	1,71	0,038244	0,852119
40	GOLGB1	1,77	0,013445	0,816118	96	RBBP6	1,59	0,039267	0,852119
41	RN5S129	1,62	0,013892	0,816118	97	EIF5B	2,85	0,039486	0,852119
42	ZNF107	1,6	0,014200	0,816118	98	NIPBL	2,25	0,039730	0,852119
43	REV3L	1,86	0,014226	0,816118	99	SAMD9L	1,74	0,040398	0,852119
44	OCR1	1,69	0,014354	0,816118	100	KCNT2	1,63	0,041097	0,852119
45	MMP16	1,6	0,014668	0,816118	101	ROCK2	1,94	0,041114	0,852119
46	BOD1L1	2,22	0,014682	0,816118	102	CCDC91	1,63	0,042242	0,852119
47	ODF2L	1,54	0,014874	0,816118	103	FAM216B	1,62	0,042542	0,852119
48	AKAP9	1,58	0,015220	0,816118	104	CHML	2,37	0,042914	0,852119
49	EEA1	2,42	0,015302	0,816118	105	RN5S33	1,51	0,042998	0,852119
50	RIF1	2,69	0,015539	0,816118	106	RN5S268	1,83	0,043268	0,852119
51	UACA	1,68	0,015683	0,817749	107	CNTLN	1,64	0,044803	0,852119
52	FAM99A	-1,61	0,016651	0,822902	108	RBM7	-1,58	0,044859	0,852119
53	TAS2R14	1,85	0,016731	0,822902	109	ARID4A	1,7	0,045099	0,852119

54	PHF3	2,19	0,016890	0,822902	110	VPS13C	1,7	0,047617	0,852119
55	TAS2R13	1,53	0,017046	0,822902	111	RN5S172	2,04	0,048235	0,852119
56	RBM1B	1,74	0,017269	0,822902	112	RN5S241	1,51	0,049197	0,852119
					113	MIR181B1	1,88	0,049790	0,852119

Tabla 16. Expresión diferencial de genes después de 72 h de tratamiento con P₄ vs V.

P4 vs V (72 h de tratamiento)									
#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	LAMP5	1,53	0,016476	0,999989	3	ENAM	2,27	0,025173	0,999989
2	LCN1	1,7	0,016677	0,999989	4	RN5S354	-1,6	0,049947	0,999989

Tabla 17. Expresión diferencial de genes después de 72 h de tratamiento con F respecto a V.

F vs V (72 h de tratamiento)									
#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gen	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	PIBF1	1,59	0,006592	0,999113	21	METTL15	1,64	0,037719	0,999113
2	LIPK	-1,62	0,007637	0,999113	22	NBEAL1	1,55	0,038544	0,999113
3	RNY3P6	1,66	0,010742	0,999113	23	ZNF37A	1,58	0,038546	0,999113
4	CEP112	1,72	0,010743	0,999113	24	MANEA	1,52	0,038656	0,999113
5	OR4F14P	1,94	0,011049	0,999113	25	RB1CC1	2,46	0,039609	0,999113
6	KIAA1009	1,62	0,014595	0,999113	26	TAF1D	1,57	0,040727	0,999113
7	ZNF721	1,67	0,017500	0,999113	27	JMJD1C	1,99	0,042233	0,999113
8	RNU5A-1	-1,52	0,017713	0,999113	28	FLJ31958	-1,76	0,042250	0,999113
9	ANKRD36C	1,81	0,018647	0,999113	29	RBM41	1,9	0,042566	0,999113
10	ROCK1	2,04	0,018822	0,999113	30	LRRCC1	1,95	0,042886	0,999113
11	BIVM	-1,53	0,019846	0,999113	31	C10orf118	2,83	0,043493	0,999113
12	ZNF638	1,51	0,021554	0,999113	32	ESF1	2,01	0,044062	0,999113
13	RAD50	2,16	0,022618	0,999113	33	PCM1	1,54	0,044449	0,999113
14	DYNC2H1	1,55	0,023943	0,999113	34	TAS2R50	1,72	0,044722	0,999113
15	SCAF11	1,53	0,030389	0,999113	35	TAS2R31	2,23	0,044798	0,999113
16	KIAA2026	1,56	0,031052	0,999113	36	ZC3H13	1,74	0,045139	0,999113
17	ESCO1	1,78	0,032594	0,999113	37	KTN1	2,55	0,045713	0,999113
18	TMF1	1,59	0,033212	0,999113	38	RBM1B	2,01	0,046637	0,999113
19	ROCK2	1,8	0,034704	0,999113	39	CCDC14	1,51	0,047221	0,999113
20	HMG5	1,56	0,036308	0,999113	40	PPIG	1,9	0,047859	0,999113
					41	NBEAL1	1,57	0,048186	0,999113

Tabla 18. Expresión diferencial de genes con tratamientos de 3 α -THP vs P₄.

3α-THP vs P₄ (72 h de tratamiento)									
#	Gene Symbol	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR	#	Gene Symbol	Tasa de cambio	p-value ANOVA	p-value FDR
1	OR5M6P	2,05	0,001694	0,999014	10	RAD50	1,7	0,036498	0,999014
2	FMO8P	2,38	0,004480	0,999014	11	ESF1	2,13	0,040495	0,999014
3	C12orf35	1,55	0,006725	0,999014	12	RNU6-14	1,7	0,040709	0,999014
4	PYROXD1	1,58	0,007300	0,999014	13	BDP1	1,68	0,042302	0,999014
5	TAF1D	1,68	0,018757	0,999014	14	BDP1	1,69	0,042711	0,999014
6	RIF1	2,05	0,027982	0,999014	15	LRRCC1	1,86	0,043996	0,999014
7	REV3L	1,51	0,028621	0,999014	16	CCDC18	1,82	0,044192	0,999014
8	N4BP2	1,71	0,030804	0,999014	17	BOD1L1	1,73	0,046273	0,999014
9	TPR	1,95	0,035383	0,999014	18	ROCK1	1,54	0,049058	0,999014
					19	CCDC88A	2,33	0,049483	0,999014

12.3 Artículos publicados durante la maestría



Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells



Carmen J. Zamora-Sánchez^a, Valeria Hansberg-Pastor^b, Ivan Salido-Guadarrama^c,
Mauricio Rodríguez-Dorantes^c, Ignacio Camacho-Arroyo^{a,*}

^aUnidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^bFacultad de Química, Departamento de Biología, UNAM, Mexico

^cInstituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 August 2016

Received in revised form 18 November 2016

Accepted 12 January 2017

Available online 22 January 2017

Chemical compounds studied in this article:

Allopregnanolone (PubChem CID: 92787)

Progesterone (PubChem CID: 5994)

Finasteride (PubChem CID: 57363)

Mifepristone (PubChem CID: 55245)

Keywords:

Allopregnanolone

Progesterone

5 α -Reductase

Proliferation

Human astrocytomas

Glioblastomas

ABSTRACT

Allopregnanolone (3 α -THP) is one of the main reduced progesterone (P₄) metabolites that is recognized as a neuroprotective and myelinating agent. 3 α -THP also induces proliferation of different neural cells. It has been shown that P₄ favors the progression of glioblastomas (GBM), the most common and aggressive primary brain tumors. However, the role of 3 α -THP in the growth of GBMs is unknown. Here, we studied the effects of 3 α -THP on the number of cells, proliferation and gene expression in U87 cell line derived from a human GBM. 3 α -THP (10, 100 nM and 1 μ M) increased the number of U87 cells, and at 10 nM exerted a similar increase in both the number of total and proliferative U87 cells as compared with P₄ (10 nM). Interestingly, finasteride (F; 100 nM), an inhibitor of 5 α -reductase (5 α R), an enzyme necessary to metabolize P₄ and produce 3 α -THP, blocked the increase in the number of U87 cells induced by P₄. By using RT-qPCR, we determined that U87 cells express 5 α -R isoenzymes 1 and 2 (5 α R1 and 5 α R2), being 5 α R1 the predominant one in these cells. 3 α -THP (10 nM) increased the expression of TGF β 1, EGFR, VEGF and cyclin D1 genes. P₄ increased TGF β 1 and EGFR expression, and this effect was blocked by F. These data provide evidence that P₄, through its metabolite 3 α -THP, can promote in part cell proliferation of human GBM cells by changing the expression of genes involved in tumor progression.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Astrocytic tumors (astrocytomas) are the most common malignancies of the Central Nervous System (CNS). According to the World Health Organization (WHO), astrocytomas are classified into four grades (WHO I–IV) of malignancy based on diverse histopathologic and molecular aspects [1]. Astrocytomas grade IV, also known as glioblastomas (GBM), are the most frequent and malignant primary brain tumors. Their malignancy is due to the highly invasive potential, abundant mitotic events, vascularity, and resistance to chemotherapy and radiotherapy. In most cases, it is not possible to surgically remove the tumor [2–5]. In spite of all the recent advances in chemo- and radiotherapy and surgical tech-

niques, the prognosis of patients is still poor, and their survival after diagnosis is about 10–15 months [6,7,3].

There are many factors related to the growth and progression of GBM, such as sex steroid hormones. We and others have reported that progesterone (P₄) promotes cell proliferation, migration, and infiltration of GBM [8–10]. P₄ can be synthesized and metabolized in the CNS, and it is known that their metabolites can prolong, increase or antagonize P₄ effects through different mechanisms of action under physiological or pathological conditions such as cancer [11–13], however, there is no evidence about the effects of P₄ metabolites in GBM growth.

Two primary enzymes are responsible for the metabolism of P₄ and other steroid hormones: 5 α -reductase isoforms (5 α R1 and 5 α R2) reduce P₄ in the position 5 giving rise to 5 α -dihydroprogesterone (5 α -DHP), then, 3 α -hydroxyxysteroid dehydrogenases convert 5 α -DHP into allopregnanolone (3 α -THP). There is evidence that rodent C6 and human 1321N1 astrocytoma cell lines express these enzymes, and use P₄ as a preferential substrate instead of testosterone [14–16].

* Corresponding author at: Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Coyoacán 04510, México, CDMX, Mexico.

E-mail address: camachoarroyo@gmail.com (I. Camacho-Arroyo).

3 α -THP participates in diverse physiological and pathological processes in the CNS [13,17] through different mechanisms that have not been yet well elucidated. At least three main mechanisms of 3 α -THP actions have been identified in the CNS: through the allosteric modulation of GABA_A receptors (GABA_AR) in mature neurons and neural progenitor cells; by its binding to the seven transmembrane class of progesterone-binding receptors (mPRs) in glial cells [18–20]; and by its interaction with the pregnane xenobiotic receptor (PXR) expressed in different areas of the CNS [21].

It has been reported that 3 α -THP increases the expression of different genes related to regeneration, proliferation, and protection against cell death in diverse CNS cell types such as human and rodent neural progenitor cells or oligodendrocyte precursor cells. These effects occur in a stereospecific way compared with its isomers epiallopregnanolone (5 α -pregnan-3 β -ol-20-one) and epipregnanolone (5 β -pregnan-3 β -ol-20-one) [22–25]. Besides, there is a correlation between P₄ α -reduced metabolites and increased malignancy in breast cancer cells [11,26,27]. Despite the protective and proliferative role of 3 α -THP in several cell types, there is no information about its relevance in the progression of GBM.

The aim of this study was to know the effects of 3 α -THP on cell number, proliferation, and gene expression in U87 human GBM cell line. We also determined if U87 cells expressed 5 α R1 and 5 α R2, the key enzymes involved in P₄ metabolism and 3 α -THP formation.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

The human glioblastoma cell line U87 (ATCC, VA, USA) was grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 0.1 mM non-essential amino acids at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. For RT-qPCR experiments 3 × 10⁵ cells were plated in 6-well plates, for cell growth experiments 1 × 10⁵ cells were plated in 24-well plates, and for the proliferation assays 5 × 10³ cells were plated in 4-well glass slides. The medium was changed by DMEM phenol red free medium supplemented with 10% FBS without steroid hormones under the same conditions as described above during 24 h. For determining 5 α R1 and 5 α R2 basal expression, no treatments were performed. To evaluate the effects of 3 α -THP and P₄ on cell growth, U87 cells were treated with 3 α -THP (1, 10, 100 nM and 1 μ M), P₄ (10 nM), the 5 α R inhibitor finasteride (F, 100 nM), P₄ + F, 3 α -THP (10 nM) + F, and vehicle (V; 0.01% DMSO). To determine the effects of P₄ metabolism on cell proliferation and gene expression, cells were treated with: vehicle (V, 0.01% DMSO), 3 α -THP (10 nM), P₄, the progesterone receptor antagonist, mifepristone (RU486, 1 μ M), P₄ + F, 3 α -THP + F, and 3 α -THP + RU486. Each experiment was performed in at least three independent cultures. All steroids were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) and DMSO was purchased from J.T. Baker (PA, USA).

2.2. Cell growth

Treated U87 cells were harvested from incubation every day during five consecutive days with 1 mL PBS 1 × + EDTA (1 mM). Then, cells were resuspended in the same solution and added 10 μ L of 0.4% trypan blue solution. The number of living cells was determined by the trypan blue dye exclusion assay using a hemocytometer and a microscope (Olympus BX41, PA, USA).

2.3. Proliferation assay

The 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation kit (11296736001 Roche, IN, USA) was used according to the manufacturer's recommendations to determine U87 cell line proliferation. Cells cultured in the 4-well glass slides were treated for three days and afterward the cell culture medium was replaced by the BrdU labeling medium for 40 min. After cell fixation, BrdU incorporation was detected by immunofluorescence using a monoclonal antibody against it and a fluorochrome-conjugated secondary antibody. Additionally, nuclei were stained with Hoechst 33342 solution (1 μ g/mL). Cell nuclei stained with Hoechst and positive BrdU cells were visualized in an Olympus Bx43F microscope (Olympus, PA, USA). Cell counting was done with the ImageJ software 1.45S (National Institutes of Health, USA).

2.4. RNA isolation and RT-qPCR

Total RNA extraction was performed with TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. The quantity and purity of RNA were measured using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA). RNA integrity was determined by electrophoresis of 1 μ g of each RNA sample in a 1.5% agarose gel with 0.5 × TBE buffer, and only total RNA samples with excellent purity and integrity were used for RT-qPCR. First-strand cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA by using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA) and oligo (dT)_{12–18} primers (Sigma-Aldrich, MO, USA) according to its protocol. 2 μ L of this reaction were subjected to qPCR in order to amplify 5 α R1, 5 α R2, TGF β 1, VEGF, EGFR and cyclin D1. Sense and antisense primers of 5 α R1 and 5 α R2 were purchased from Uniparts (CDMX, MEX) and TGF β 1, VEGF, EGFR, and cyclin D1 primers were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Table 1 contains all the information of the primers for qPCR. The results were analyzed by the Δ Ct method [28,29], and the 18S ribosomal gene was used as an expression control gene. At least, three independent experiments were performed in duplicate for each sample, and a reaction without RT was used as a negative control for each qPCR.

2.5. Statistical analysis

All data were analyzed and plotted using the GraphPad Prism 5.0 software for Windows XP (GraphPad Software, CA, USA). Statis-

Table 1
Primers used for different gene amplifications.

Gene	Primer sequence	Amplified fragment
5 α R1	FW: 5'-CAGTGTATGCTGATGACTGGG-3'	152
5 α R1	RV: 5'-GCCTCCCCTGGTATTTTGT-3'	
5 α R2	FW: 5'-CCACAAGGTGGCTTGTTTACG-3'	155
5 α R2	RV: 5'-TGGTGGTGAAGAGCTCGCA-3'	
EGFR	FW: 5'-GCCTTGACTGAGGACAGGCAT-3'	152
EGFR	RV: 5'-TGGTAGTGTGGCTCTCTGCT-3'	
Cyclin D1	FW: 5'-TGCATAACCCTGAGCGGTGG-3'	146
Cyclin D1	RV: 5'-TCTCCCGAGACGCTCCTTT-3'	
VEGF	FW: 5'-CCACACCATCACCATCGACA-3'	153
VEGF	RV: 5'-CCAATTCGAAGAGGACCGT-3'	
TGF β 1	FW: 5'-CTGGCCCTGTACAACCAGCA-3'	148
TGF β 1	RV: 5'-ACTTGCAGGAGCGCACGA-3'	
18S	FW: 5'-AGTAAATGCAATGGCTC-3'	167
18S	RV: 5'-CTGACCGGTTGGTTTGTAT-3'	

Note: 5 α R1 = 5 α -Reductase 1; 5 α R2 = 5 α -Reductase 2; EGFR = Epidermal growth factor receptor; VEGF = Vascular endothelial growth factor; TGF β 1 = Transforming growth factor β 1; 18S = 18S ribosomal RNA; FW = forward primer; RV = reverse primer.

tical analysis was performed using one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test for the number of cells assays, and for the gene expression experiments the post hoc test was Bonferroni. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. The effects of 3α -THP, P_4 and F on the number of U87 cells

As a first approach to characterize 3α -THP effects on GMB cell number, we performed a time-course experiment with different 3α -THP concentrations (1 nM–1 μ M) during 5 days. We observed that all concentrations of 3α -THP increased the number of U87 cells. Although the lowest dose of 3α -THP (1 nM) augmented the number of cells from day 1 of treatment, the 10 nM was the lowest concentration of the ones that presented a more consistent effect from day 3 to day 5 of the experiment (Fig. 1). Additionally, cell viability was calculated and neither of the 3α -THP concentrations modified cell viability (data not shown).

To evaluate if U87 cell line is capable of metabolizing P_4 , we studied the expression of 5α R1 and 5α R2 by RT-qPCR. U87 cells differentially express 5α R1 and 5α R2, but the isozyme with the highest expression was 5α R1 (Fig. 2A). Then, we determined whether P_4 or its metabolism affected the number of U87 cells. In a time course experiment, 3α -THP (10 nM) increased the number of cells in a similar manner to P_4 (10 nM) from day 3 to day 5 (Fig. 2B), and F alone did not modify the number of cells. Interestingly, F (100 nM) blocked the effects of P_4 (Fig. 2B). None of the treatments changed cell viability (data not shown).

3.2. The effects of 3α -THP, P_4 , RU486 and F on U87 cell proliferation

Since 3α -THP and P_4 significantly increased the number of U87 cells on day 3, we evaluated cell proliferation through a BrdU incorporation assay on this specific day. 3α -THP and P_4 (10 nM) increased BrdU incorporation, while F (100 nM) and RU486 (1 μ M) alone did not modify cell proliferation. However, F presented a tendency to reduce P_4 effects (22%) and unexpectedly, completely blocked the effect of 3α -THP. Besides, RU486 also exhibited a non-significant tendency to reduce the effect of 3α -THP (Fig. 3).

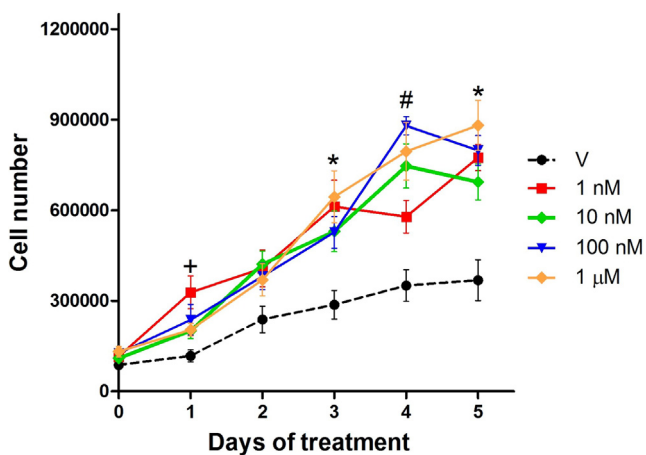


Fig. 1. The effects of allopregnanolone (3α -THP) on the number of U87 cells. Cells were treated with different 3α -THP concentrations (1, 10, 100 nM and 1 μ M) or vehicle (V; 0.01% DMSO) and the number of U87 cells was assessed each day for 5 consecutive days by the trypan blue exclusion assay. Each point represents the mean \pm SEM; $n = 7$. * $p < 0.05$ 3α -THP 1 nM vs. V; # $p < 0.05$ 3α -THP (all concentrations) vs. V; * $p < 0.05$ 3α -THP (10, 100 nM and 1 μ M) vs. V.

3.3. 3α -THP and P_4 differentially regulate TGF β 1, EGFR, VEGF and cyclin D1 gene expression in U87 cells

We determined the effects of 3α -THP, P_4 , F, RU486, P_4 + F, 3α -THP + F, and 3α -THP + RU486 on the expression of TGF β 1, EGFR, VEGF and cyclin D1 in U87 cells at 12 and 24 h of treatment by RT-qPCR. 3α -THP and P_4 significantly increased the expression of TGF β 1 at 12 h, and F blocked the effect of P_4 (Fig. 4A). EGFR gene expression was increased by 3α -THP at 12 h of treatment, and interestingly, F and RU486 blocked this effect, while P_4 increased EGFR expression at 24 h, which was blocked by F (Fig. 4B). VEGF expression was induced by 3α -THP at 12 and 24 h, and both F and RU486 only presented a non-significant tendency to reduce its effects (Fig. 4C). 3α -THP augmented cyclin D1 expression at 24 h, which was blocked by F (Fig. 4D). Interestingly, 3α -THP + RU486 increased the expression of cyclin D1 at 12 h. F and RU486 alone did not alter the expression of the studied genes.

4. Discussion

There are several reports in which different cell lines have been used as models of degenerative disorders of the CNS where neurosteroids, particularly 3α -THP, show an abnormal metabolism (for review see Ref. [13]). However, until now, there are no reports of the effects of these P_4 metabolites on human GBM. In this study, we investigated the effects of 3α -THP on the number of cells, proliferation and gene expression in U87 cells, derived from a human GBM. We also determined the expression of 5α R isoenzymes and the effect of their pharmacological inhibition on U87 cell proliferation and gene expression. It has been shown that 3α -THP promotes proliferation of neural progenitor cells [23] and oligodendrocyte precursor cells through the induction of non-synaptic GABA $_A$ R and subsequent transcription of genes involved in the progression of the cell cycle [30]. In this report, we show for the first time that in addition to P_4 , its reduced metabolite 3α -THP promotes the growth and proliferation of GBM cells.

To determine if U87 cells express one of the primary enzymes involved in the production of P_4 active metabolites, we determined by RT-qPCR the expression of 5α R1 and 5α R2, which are encoded by two distinct genes, and have a differential tissue distribution [31]. U87 cells expressed both isoenzymes, which is in line with other studies where both C6 rat glioma cells and 1321N1 human GBM cells (a subclone of U-118 MG cells) express them. Interestingly, in these cells, P_4 was a preferred substrate for 5α R, even above its other natural substrate, testosterone [14]. We found a higher expression of 5α R1 than that of 5α R2 (Fig. 2A), which correlates with the predominance of 5α R1 expression in the adult brain. This enzyme subtype is expressed both at mRNA and protein levels in the CNS areas such as the temporal cortex, hippocampus, and cerebellum of adult rodents and humans [32]. In contrast, 5α R2 plays a vital role in metabolizing neurosteroids during the neonatal period [33–35]. In addition, it has been reported that astrocytoma biopsies present higher expression levels of 5α R1 than brain biopsies from patients with epilepsy or tumor-free tissue [36]. Together, these data suggest that 5α R1 is important for P_4 metabolism in GBM cells.

In U87 glioblastoma cells, 3α -THP (10 nM) increases the number of cells (Fig. 1) and even equates the effects of P_4 (10 nM). The treatment with F (100 nM), a potent 5α R inhibitor (Fig. 2B), blocks P_4 effects. It has been shown that F diminishes the levels of 3α -THP and induces apoptosis in the brain of sheep fetuses [37], while 3α -THP reduces inflammation after brain traumas and prevents apoptosis and cellular stress through several mechanisms [20,22,25,38,39]. This cell death regulation by F could contribute to modify the total number of U87 cells. Interestingly,

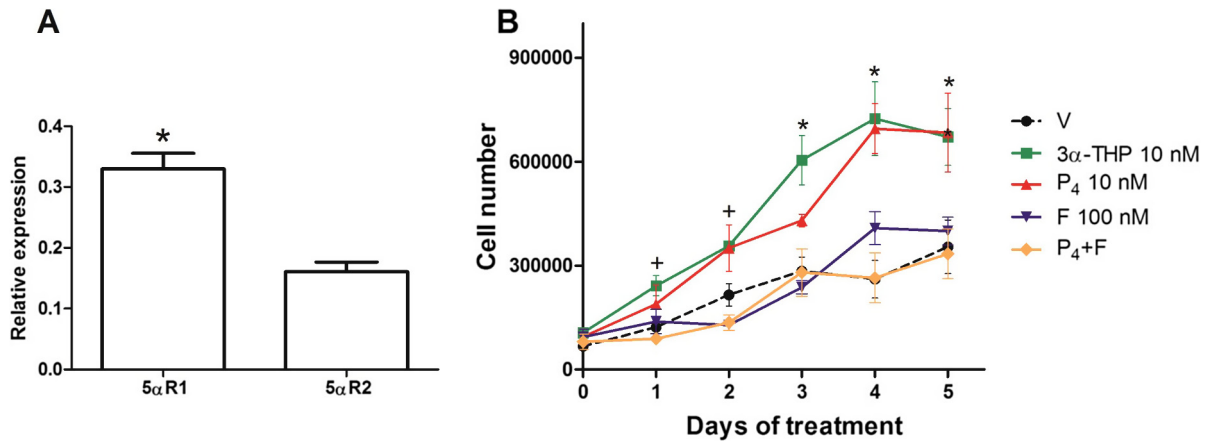


Fig. 2. P₄ metabolism and its effect on the number of U87 cells. A: Relative mRNA expression of 5αR1 and 5αR2. Cells cultured until reaching 80% of confluence were used for total RNA extraction and RT-qPCR. Each bar represents the mean ± SEM, n = 3 *p < 0.05 vs. 5αR2. B: Effects of 3α-THP, progesterone (P₄) and finasteride (F) on the number of U87 cells. Cultures were treated with V (0.01% DMSO), 3α-THP (10 nM), P₄ (10 nM), F (100 nM) or P₄ + F. The number of cells was assessed by the trypan blue exclusion assay. Each point represents the mean ± SEM of at least 4 independent experiments. *p < 0.05 3α-THP vs. V and P₄ + F; †p < 0.05 3α-THP and P₄ vs. V and P₄ + F.

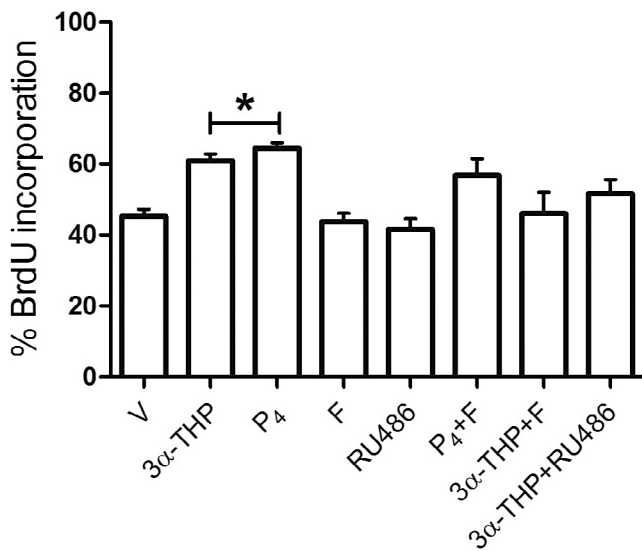


Fig. 3. P₄ and 3α-THP induce the proliferation of U87 cells. Percentage of BrdU incorporation determined as a percentage of the total number of cells stained with the nuclei dye Hoechst. Cells incorporating BrdU were treated with: V (0.01% DMSO), 3α-THP (10 nM), P₄ (10 nM), F (100 nM), RU486 (1 μM), P₄ + F, 3α-THP + F or 3α-THP + RU486 during 72 h. Each bar represents the mean ± SEM, n = 4. *p < 0.05 vs. V, F, RU486, and 3α-THP + F.

when assessing cell proliferation through BrdU labeling, F completely blocked 3α-THP effects (Fig. 3), indicating that the steroid metabolism through the actions of 5αR is necessary to promote cell proliferation in GBM cells, not only through P₄ but other metabolites. P₄ is fundamental in the promotion of cell proliferation through the genomic mechanism mediated by its intracellular receptor (PR) in different cancer cells such as astrocytoma WHO grade III [8], GBM [8,40,41] and breast cancer [42]. However, in breast cancer cell lines other 5α-reduced metabolites such as 5α-DHP bind to PR or mPRs to promote cell proliferation and their effects are abated by F [11,43].

3α-THP induces the activation of GABA_AR or improves the affinity of the receptor to its ligand [18], but this depends on the receptor subunit composition. The GABA_AR is composed of five subunits that could be α₍₁₋₆₎, β₍₁₋₃₎, γ₍₁₋₃₎, δ, ε, θ or π. The subunits α_{1,3,6}, β₁, and γ₂ increase the affinity to 3α-THP (1–30 nM), while the subunit δ, frequently found in the extrasynaptic GABA_AR, potentiates

the activity of 5α,3α-reduced steroid metabolites [44]. In neural progenitor cells or oligodendrocyte precursor cells expressing the SLC12A2 ion cotransporter, 3α-THP interacts with GABA_AR to induce Ca²⁺ signaling pathways that promote the activation of cAMP-responsive element binding protein 1 (CREB1) and the subsequent expression of genes implicated in the progression of mitosis [23]. However, the GABA_AR mediated mechanism in GBM is controversial given that GBM cells are highly proliferative, and most of the GBM biopsies evaluated lack GABA_AR activity [45], and the receptor has been implicated in the suppression of proliferative signals in GBM cell lines [46]. The status of this receptor in U87 cells is still unknown, and it would be interesting to evaluate its possible role in GBM cell proliferation.

Also, 3α-THP is an agonist of mPRδ, mPRα, and mPRβ at nanomolar concentrations (120–400 nM) as described by Peter Thomas and coworkers (2013). mPRδ is coupled to a stimulatory protein G (G_s), and mPRα and mPRβ are coupled to an inhibitory protein G (G_i) [47,48], which suggest different mechanisms of action. Recently, our group reported that U87 cells express mPRα and mPRβ at mRNA and protein levels [49], and both of them are also expressed in breast cancer cell lines [50], suggesting their involvement in the development of tumors. Together, these data indicate that not just P₄ but also 3α-THP promotes the proliferation of GBM cells through different signaling pathways.

We also determined the effect of 3α-THP and P₄ metabolism on the expression of EGFR, VEGF, cyclin D1 and TGFβ1 in U87 cells (Fig. 4). These genes play a key role in the progression of astrocytomas [51–53], and there are reports that P₄ through PR induces the expression of EGFR, VEGF and cyclin D1 in D54 GBM cell line [54]. Besides, P₄ and 3α-THP induce the expression of TGFβ1 in astrocyte cultures [55]. We found that 3α-THP and P₄ induced the expression of TGFβ1 and F blocked the effect of P₄ after 12 h of treatment (Fig 4A). These results are consistent with findings in astrocytes where both 3α-THP, 5α-DHP, and P₄ exert similar effects on TGFβ1 expression [55]. 3α-THP could be reverted into 5α-DHP, which is capable of binding and activate PR [18], and thus induce the expression of TGFβ1 in U87 cells. EGFR and VEGF were differently regulated by 3α-THP and P₄ in U87 cells, suggesting distinct mechanisms involved in the regulation of these genes. Interestingly, 3α-THP increased the expression of EGFR that was blocked by RU486. Previous reports showed that in the cell line D54, P₄ induced the expression of EGFR and VEGF at 12 h and this effect was blocked by RU486 [54]. Together, this suggests that P₄ metabolites with high affinity to the PR as well as P₄ induce

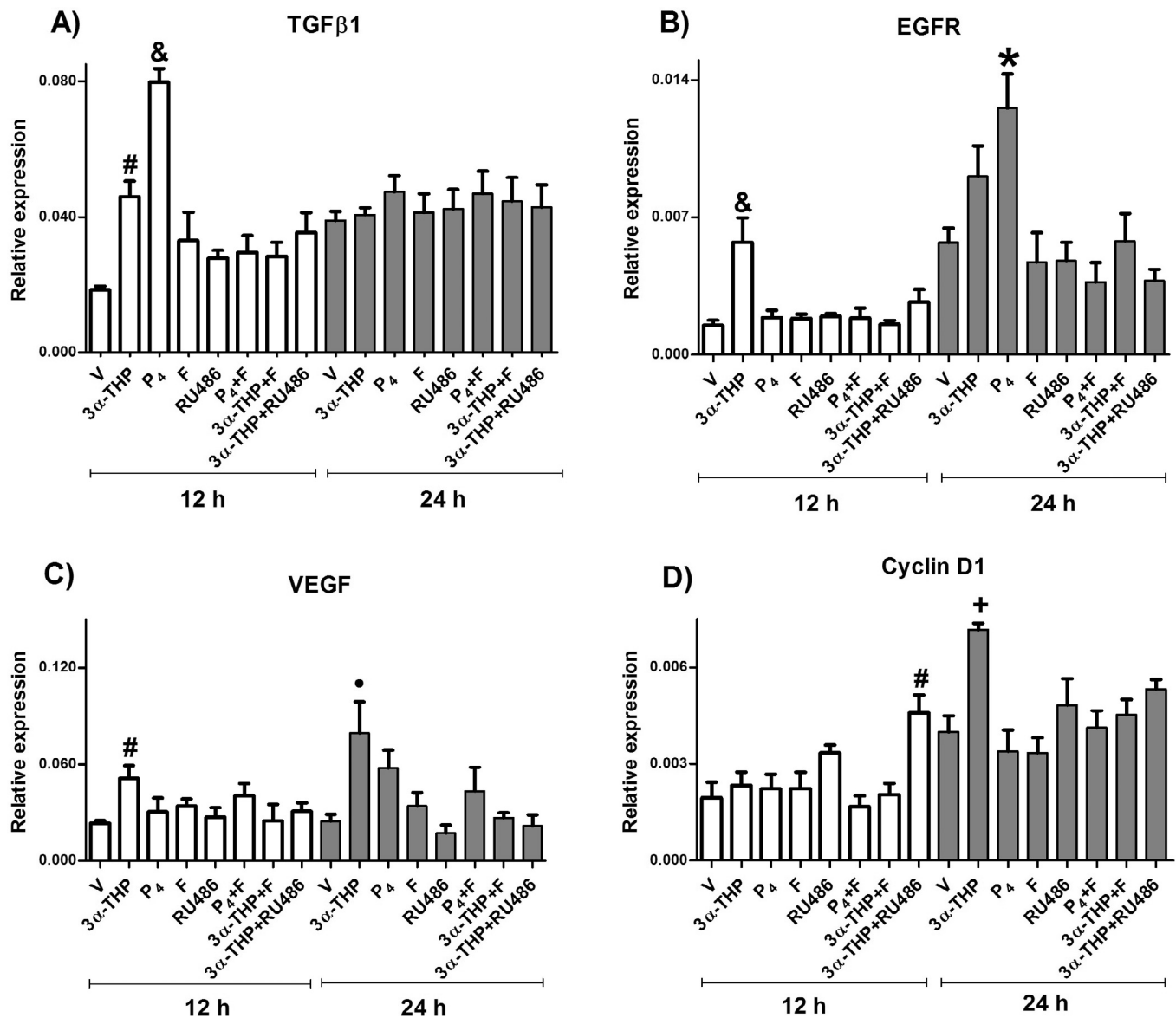


Fig. 4. TGFβ1, EGFR, VEGF and cyclin D1 expression is regulated by 3α-THP and P₄. Relative gene expression of TGFβ1 (A), EGFR (B), VEGF (C), and cyclin D1 (D) in U87 cells after 12 or 24 h treatment with V (0.01% DMSO), 3α-THP (10 nM), P₄ (10 nM), F (100 nM), RU486 (1 μM), P₄ + F, 3α-THP + F or 3α-THP + RU486. Each column represents the mean ± SEM, n = 5. #p < 0.05 vs. V; •p < 0.05 vs. V and RU486; †p < 0.05 vs. V, F, RU486, P₄ + F; *p < 0.05 vs. all treatments; +p < 0.05 vs. V, P₄, F, P₄ + F, and 3α-THP + F.

through the classic mechanisms of action the expression of EGFR. Interestingly, cyclin D1 expression was increased by RU486 + 3α-THP at 12 h, whereas 3α-THP exerted the same effect at 24 h that was blocked by F but not by RU486 (Fig. 4D). Both 3α-THP and RU486 are agonists of the PXR, a transcription factor that induces the expression of genes involved in the metabolism and transport of xenobiotics [56–58]. PXR have a similar mechanism to that of PR: the direct activation of PXR by one ligand results in the recruitment of coactivators such as SRC-1, and the binding to responsive elements in the promoter of target genes (for review see [59]). These results suggest that GBMs present a different gene expression profile that is regulated by P₄ metabolism.

5. Conclusions

In conclusion, both P₄ and 3α-THP participate in the growth of GBM, since they promote the proliferation of GBM cells through the expression of genes that are involved in cancer progression.

Declaration of interests

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by grant: 250866, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) and PAPIIT: IN201414, DGAPA, UNAM, México.

References

- [1] F.B. Furnari, T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, W.K. Cavenee, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes Dev.* 21 (2007) 2683–2710, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1596707>.
- [2] S. Alcantara Llaguno, J. Chen, C.-H. Kwon, E.L. Jackson, Y. Li, D.K. Burns, A. Alvarez-Buylla, L.F. Parada, Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model, *Cancer Cell* 15 (2009) 45–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.006>.

- [3] E.G. Van Meir, C.G. Hadjipanayis, A.D. Norden, H. Shu, P.Y. Wen, J.J. Olson, Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma, *CA Cancer J. Clin.* 60 (2010) 166–193, <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20069>.
- [4] J.N. Rich, C. Hans, B. Jones, E.S. Iversen, R.E. McLendon, B.K. Rasheed, A. Dobra, H.K. Dressman, D.D. Bigner, J.R. Nevins, M. West, Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival, *Cancer Res.* 65 (2005) 4051–4058, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3936>.
- [5] T. Tihan, M.M. Bloomer, Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective, *Semin. Diagn. Pathol.* 27 (2010) 114–121, <http://dx.doi.org/10.1053/j.semmp.2010.04.002>.
- [6] P.J. O'Halloran, T. Viel, D.W. Murray, L. Wachsmuth, K. Schwegmann, S. Wagner, K. Kopka, M.A. Jarzabek, P. Dicker, S. Hermann, C. Faber, T. Klasen, M. Schäfers, D. O'Brien, J.H.M. Prehn, A.H. Jacobs, A.T. Byrne, Mechanistic interrogation of combination bevacizumab/dual PI3K/mTOR inhibitor response in glioblastoma implementing novel MR and PET imaging biomarkers, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 43 (2016) 1673–1683, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-016-3343-3>.
- [7] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 987–996, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- [8] G. González-Agüero, A.A. Gutiérrez, D. González-Espinosa, J.D. Solano, R. Morales, A. González-Arenas, E. Cabrera-Muñoz, I. Camacho-Arroyo, Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines, *Endocrine* 32 (2007) 129–135, <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-007-9023-0>.
- [9] L. Germán-Castelán, J. Manjarrez-Marmolejo, A. González-Arenas, M.G. González-Morán, I. Camacho-Arroyo, Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 393174, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/393174>.
- [10] A.G. Piña-Medina, V. Hansberg-Pastor, A. González-Arenas, M. Cerbón, I. Camacho-Arroyo, Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells, *Steroids* 105 (2016) 19–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.11.008>.
- [11] J.P. Wiebe, G. Zhang, I. Welch, H.-A.T. Cadieux-Pitre, Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors, *Breast Cancer Res.* 15 (2013) R38, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3422>.
- [12] J.P. Wiebe, M.J. Lewis, V. Cialacu, K.J. Pawlak, G. Zhang, The role of progesterone metabolites in breast cancer: potential for new diagnostics and therapeutics, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93 (2005) 201–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.003>.
- [13] R.C. Melcangi, S. Giatti, D. Calabrese, M. Pesaresi, G. Cermenati, N. Mitro, B. Viviani, L.M. Garcia-Segura, D. Caruso, Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 56–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.07.006>.
- [14] R.C. Melcangi, I. Cavarretta, V. Magnaghi, M. Ballabio, L. Martini, M. Motta, Crosstalk between normal and tumoral brain cells. Effect on sex steroid metabolism, *Endocrine* 8 (1998) 65–71, <http://dx.doi.org/10.1385/ENDO:8:1:65>.
- [15] K. Morita, H. Arimochi, H. Itoh, S. Her, Possible involvement of 5 α -reduced neurosteroids in adrenergic and serotonergic stimulation of GFAP gene expression in rat C6 glioma cells, *Brain Res.* 1085 (2006) 49–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.033>.
- [16] K. Morita, S. Her, Progesterone pretreatment enhances serotonin-stimulated BDNF gene expression in rat C6 glioma cells through production of 5 α -reduced neurosteroids, *J. Mol. Neurosci.* 34 (2008) 193–200, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-007-9034-6>.
- [17] R.C. Melcangi, G.C. Panzica, Allopregnanolone: state of the art, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 1–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.005>.
- [18] M. Schumacher, C. Mattern, A. Ghomari, J.P. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A.F. De Nicola, R. Guennoun, Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 6–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.004>.
- [19] A. Faroni, V. Magnaghi, The neurosteroid allopregnanolone modulates specific functions in central and peripheral glial cells, *Front. Endocrinol.* 2 (2011) 103, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2011.00103>.
- [20] C. Escudero, S. Casas, F. Giuliani, V. Bazzocchini, S. García, R. Yunes, R. Cabrera, Allopregnanolone prevents memory impairment: effect on mRNA expression and enzymatic activity of hippocampal 3- α hydroxysteroid oxidase-reductase, *Brain Res. Bull.* 87 (2012) 280–285, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.019>.
- [21] C.A. Frye, C.J. Koonce, A.A. Walf, Novel receptor targets for production and action of allopregnanolone in the central nervous system: a focus on pregnane xenobiotic receptor, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 106, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00106>.
- [22] T. Ishrat, I. Sayeed, F. Atif, F. Hua, D.G. Stein, Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases, *Exp. Neurol.* 226 (2010) 183–190, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.023>.
- [23] J.M. Wang, P.B. Johnston, B.G. Ball, R.D. Brinton, The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4706–4718, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4520-04.2005>.
- [24] J.W. VanLandingham, M. Cekic, S.M. Cutler, S.W. Hoffman, E.R. Washington, S.J. Johnson, D. Miller, D.G. Stein, Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28 (2008) 1786–1794, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2008.73>.
- [25] E.M. Lockhart, D.S. Warner, R.D. Pearlstein, D.H. Penning, S. Mehrabani, R.M. Boustany, Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture, *Neurosci. Lett.* 328 (2002) 33–36, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00448-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00448-2).
- [26] M. Bičíková, I. Számel, M. Hill, J. Tallová, L. Stárka, Allopregnanolone, pregnenolone sulfate, and epitestosterone in breast cyst fluid, *Steroids* 66 (2001) 55–57, [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00140-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00140-9).
- [27] A.A. Rybczynska, P.H. Elsinga, J.W. Sijbesma, K. Ishiwata, J.R. de Jong, E.F. de Vries, R.A. Dierckx, A. van Waarde, Steroid hormones affect binding of the sigma ligand 11C-SA4503 in tumour cells and tumour-bearing rats, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 36 (2009) 1167–1175, <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-009-1076-2>.
- [28] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2003–2007, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [29] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [30] R.D. Brinton, Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications, *Nat. Rev. Endocrinol.* 9 (2013) 241–250, <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.31>.
- [31] F. Azzouini, A. Godoy, Y. Li, J. Mohler, The 5 α -reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases, *Adv. Urol.* 2012 (2012) 530121, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/530121>.
- [32] G. Pelletier, Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects, *Prog. Brain Res.* 181 (2010) 193–207, [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81011-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81011-4).
- [33] P.N. Nguyen, S.S. Billiards, D.W. Walker, J.J. Hirst, Changes in 5 α -pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep, *Pediatr. Res.* 53 (2003) 956–964, <http://dx.doi.org/10.1203/01.PDR.0000088066.47755.36>.
- [34] J.J. Paris, P.J. Brunton, J.A. Russell, A.A. Walf, C.A. Frye, Inhibition of 5 α -reductase activity in late pregnancy decreases gestational length and fecundity and impairs object memory and central progesterone milieu of juvenile rat offspring, *J. Neuroendocrinol.* 23 (2011) 1079–1090, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02219.x>.
- [35] G.-S.L. Melcangi, R.C. Giatti, Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: sex-specific features, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67 (2016) 25–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.09.023>.
- [36] B. Stoffel-Wagner, M. Watzka, S. Steckelbroeck, M. Ludwig, H. Clusmann, F. Bidlingmaier, E. Casarosa, S. Luisi, C.E. Elger, S. Beyenburg, Allopregnanolone serum levels and expression of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in hippocampal and temporal cortex of patients with epilepsy, *Epilepsy Res.* 54 (2003) 11–19, [http://dx.doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00036-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00036-6).
- [37] T. Yawno, E.B. Yan, D.W. Walker, J.J. Hirst, Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep, *Neuroscience* 146 (2007) 1726–1733, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.023>.
- [38] C.A. Frye, J. Manjarrez, I. Camacho-Arroyo, Infusion of 3 α pregnane-THP to the pontine reticular formation attenuates PTZ-induced seizures, *Brain Res.* 881 (2000) 98–102, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02897-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02897-3) [pii].
- [39] I. Sayeed, S. Parvez, B. Wali, D. Siemen, D.G. Stein, Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone, *Brain Res.* 1263 (2009) 165–173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.045>.
- [40] G. González-Agüero, R. Ondarza, A. Gamboa-Domínguez, M.A. Cerbón, I. Camacho-Arroyo, Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 43–48, [http://dx.doi.org/10.1016/S03061-9230\(01\)00590-1](http://dx.doi.org/10.1016/S03061-9230(01)00590-1).
- [41] I. Camacho-Arroyo, G. González-Agüero, A. Gamboa-Domínguez, M.A. Cerbón, R. Ondarza, Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas, *J. Neurooncol.* 49 (2000) 1–7, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006412000726>.
- [42] G.E. Dressing, T.P. Knutson, M.J. Schiewer, A.R. Daniel, C.R. Hagan, C.H. Diep, K. E. Knudsen, C.A. Lange, Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycle-dependent transcriptional programs in breast cancer cells, *Mol. Endocrinol.* 28 (2014) 442–457, <http://dx.doi.org/10.1210/me.2013-1196>.
- [43] J.P. Wiebe, M.A. Rivas, M.F. Mercogliano, P.V. Elizalde, R. Schillaci, Progesterone-induced stimulation of mammary tumorigenesis is due to the progesterone metabolite, 5 α -dihydroprogesterone (5 α P) and can be suppressed by the 5 α -reductase inhibitor, finasteride, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 149 (2015) 27–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.01.004>.

- [44] D. Bellelli, A. Casula, A. Ling, J.J. Lambert, The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABAA receptors, *Neuropharmacology* 43 (2002) 651–661, [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00172-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00172-7).
- [45] C. Labrakakis, S. Patt, J. Hartmann, H. Kettenmann, Functional GABA A receptors on human glioma cells, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 231–238.
- [46] A. Blanchart, R. Fernando, M. Häring, N. Assaife-Lopes, R.A. Romanov, M. Andäng, T. Harkany, P. Ernfors, Endogenous GABAA receptor activity suppresses glioma growth, *Oncogene* (2016) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.245>.
- [47] P. Thomas, Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions, *Front. Neuroendocrinol.* 29 (2008) 292–312, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.01.001>.
- [48] Y. Pang, J. Dong, P. Thomas, Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and epsilon (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis, *Endocrinology* 154 (2013) 283–295, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1772>.
- [49] P. Valadez-Cosmes, L. Germán-Castelán, A. González-Arenas, M.A. Velasco-Velázquez, V. Hansberg-Pastor, I. Camacho-Arroyo, Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154 (2015) 176–185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.08.006>.
- [50] Y. Pang, P. Thomas, Progesterone signals through membrane progesterone receptors (mPRs) in MDA-MB-468 and mPR-transfected MDA-MB-231 breast cancer cells which lack full-length and N-terminally truncated isoforms of the nuclear progesterone receptor, *Steroids* 76 (2011) 921–928, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2011.01.008>.
- [51] I.Z. Renault, D. Golgher, Molecular genetics of glioblastomas: defining subtypes and understanding the biology, *Neuroimaging Clin. N. Am.* 25 (2015) 97–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nic.2014.09.007>.
- [52] S. Godard, G. Getz, M. Delorenzi, P. Farmer, H. Kobayashi, I. Desbaillets, M. Nozaki, A.-C. Diserens, M.-F. Hamou, P.-Y. Dietrich, L. Regli, R.C. Janzer, P. Bucher, R. Stupp, N. de Tribolet, E. Domany, M.E. Hegi, Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes, *Cancer Res.* 63 (2003) 6613–6625. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970926)73:1<57::aid-ijc10>3.0.co.
- [53] T. Siegal, Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas, *J. Clin. Neurosci.* 22 (2015) 437–444, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2014.10.004>.
- [54] O.T. Hernández-Hernández, T.K. González-García, 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.* 132 (2012) 127–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.04.005>.
- [55] R.C. Melcangi, I. Cavarretta, V. Magnaghi, L. Martini, M. Galbiati, Interactions between growth factors and steroids in the control of LHRH-secreting neurons, *Brain Res. Rev.* 37 (2001) 223–234, [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00120-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00120-5).
- [56] S.A. Kliewer, B. Goodwin, T.M. Willson, The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism, *Endocr. Rev.* 23 (2002) 687–702, <http://dx.doi.org/10.1210/er.2001-0038>.
- [57] C.A. Frye, Novel substrates for, and sources of, progestogens for reproduction, *J. Neuroendocrinol.* 23 (2011) 961–973, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. *Investigations*.
- [58] S. Teng, V. Jekerle, M. Piquette-Miller, Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 1296–1299, <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.31.11.1296>.
- [59] B. Mackowiak, H. Wang, Mechanisms of xenobiotic receptor activation: direct vs. indirect, *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* 2015 (1859) 1130–1140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbgrm.2016.02.006>.

Las hormonas sexuales en el desarrollo de tumores cerebrales

*Dra. Araceli Gutiérrez-Rodríguez**
*Dra. Carmen Janín Zamora-Sánchez**
*Dr. Ignacio Camacho-Arroyo**

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) surgen de células que presentan anormalidades en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celulares¹. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), estos tumores se clasifican, con base en sus características histológicas, celulares y moleculares, en tumores de los nervios craneales y espinales, de las meninges, tumores de células germinales y del tejido neuroepitelial, entre otros. Los tumores del tejido neuroepitelial más comunes son los gliomas, que se clasifican de acuerdo con el tipo de célula glial con la que guardan mayor relación; ejemplo de éstos, son los astrocitomas, cuyas características histológicas corresponden a los astrocitos, un tipo de células gliales con múltiples funciones en el SNC².

Los astrocitomas son los tumores más frecuentes del SNC adulto, constituyen 70% de todos los casos de gliomas¹ y se ha observado que su frecuencia es mayor en hombres que en mujeres en una relación de 3:23. La detección de estos tumo-

res a menudo ocurre en un grado avanzado de la enfermedad, debido a que la sintomatología (dolor de cabeza, náuseas, cambio en el estado de ánimo, convulsiones, entre otros) suele ser atribuida a otras patologías, o bien porque el paciente no asiste a un servicio neurológico⁴.

Los astrocitomas se clasifican —de acuerdo con sus características histológicas (morfología, cantidad de células que se encuentran en división y número de núcleos que presentan) y su capacidad de invadir el tejido circundante— en cuatro grados de malignidad (I-IV)⁵. El grado I es el menos agresivo; estos tumores están bien delimitados y presentan baja proliferación. Los astrocitomas de grado II y III presentan mayor infiltración, son invasivos y tienden a proliferar rápidamente; generalmente evolucionan a grados más avanzados. Los astrocitomas de grado IV o glioblastoma multiforme, constituyen el tipo de astrocitoma más agresivo, con alta proliferación, vascularización y resistencia a la quimio y radiote-

*Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
 Correspondencia
 Dr. Ignacio Camacho-Arroyo,
 Unidad de Investigación en Reproducción Humana,
 Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510,
 Ciudad de México, México.

rapia, por lo que los pacientes con estos tumores tienen una supervivencia menor a 12 meses³. El tratamiento para los astrocitomas grado I es la resección quirúrgica total seguida de quimio o radioterapia, aumentando considerablemente la supervivencia de los pacientes. Para los grados II-IV el tratamiento suele ser la resección quirúrgica parcial seguida de radio o quimioterapia; sin embargo, éste ha demostrado ser poco eficaz, ya que la recurrencia de estos tumores es muy elevada y sólo 10% de los pacientes alcanza una supervivencia mayor a dos años tras la terapia¹.

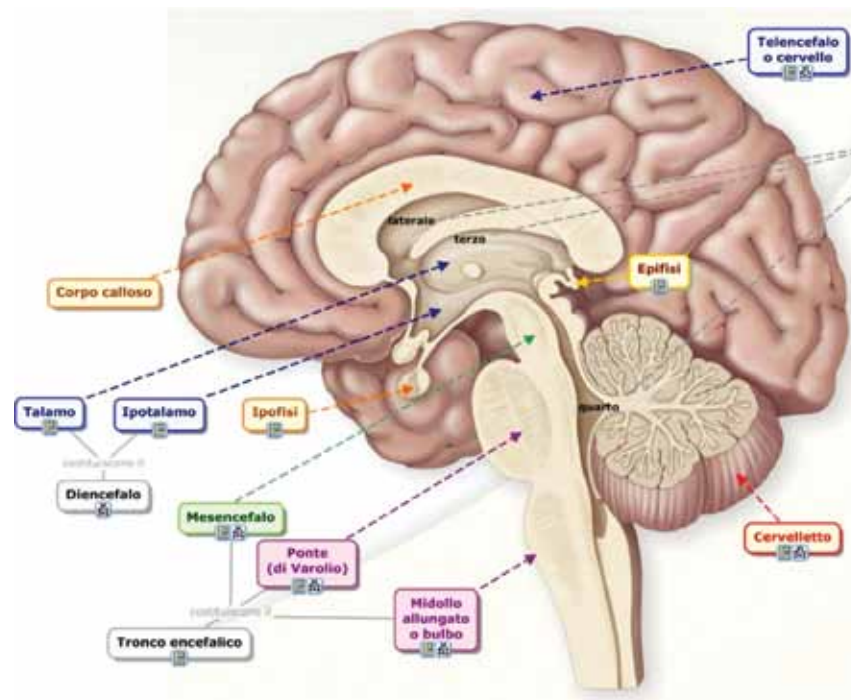
En diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, se ha observado que la estimulación endocrina llevada a cabo por acción de las hormonas sexuales, es crucial para el desarrollo y la progresión tumoral de los astrocitomas, especialmente de grados III y IV⁶. De ahí que actualmente se busquen nuevas estrategias terapéuticas menos agresivas para el paciente que puedan mejorar su calidad y esperanza de vida, basadas en el conocimiento de los mecanismos que tienen las hormonas sexuales para contribuir al rápido desarrollo y progresión de los tumores cerebrales.

Las hormonas sexuales son compuestos esteroideos derivados del colesterol que se sintetizan principalmente en las gónadas, las glándulas adrenales y en el SNC⁷. Las más importantes son los progestágenos, andrógenos y estrógenos; los miembros más activos de dichos grupos son la progesterona (P_4), testosterona (T) y el

estradiol (E_2), respectivamente⁸. A escala fisiológica estas hormonas regulan procesos como la reproducción, respuesta inmunológica, neuroprotección, el aprendizaje y la memoria. Debido a que actúan en todo el organismo, también están implicadas en procesos patológicos, como el cáncer, siendo los más estudiados el cáncer de mama y el de próstata⁹.

Las hormonas sexuales llevan a cabo sus funciones a partir de dos mecanismos: el genómico (o clásico) y el no genómico (o no clásico). A nivel del SNC, muchas de las acciones de la P_4 y el E_2 ocurren a través de su mecanismo genómico; éste requiere la interacción de las hormonas con sus proteínas receptoras: el RP para la P_4 y el RE para el E_2 . El RP presenta dos proteínas principales: el RP-B y RP-A. De manera similar al RP, las

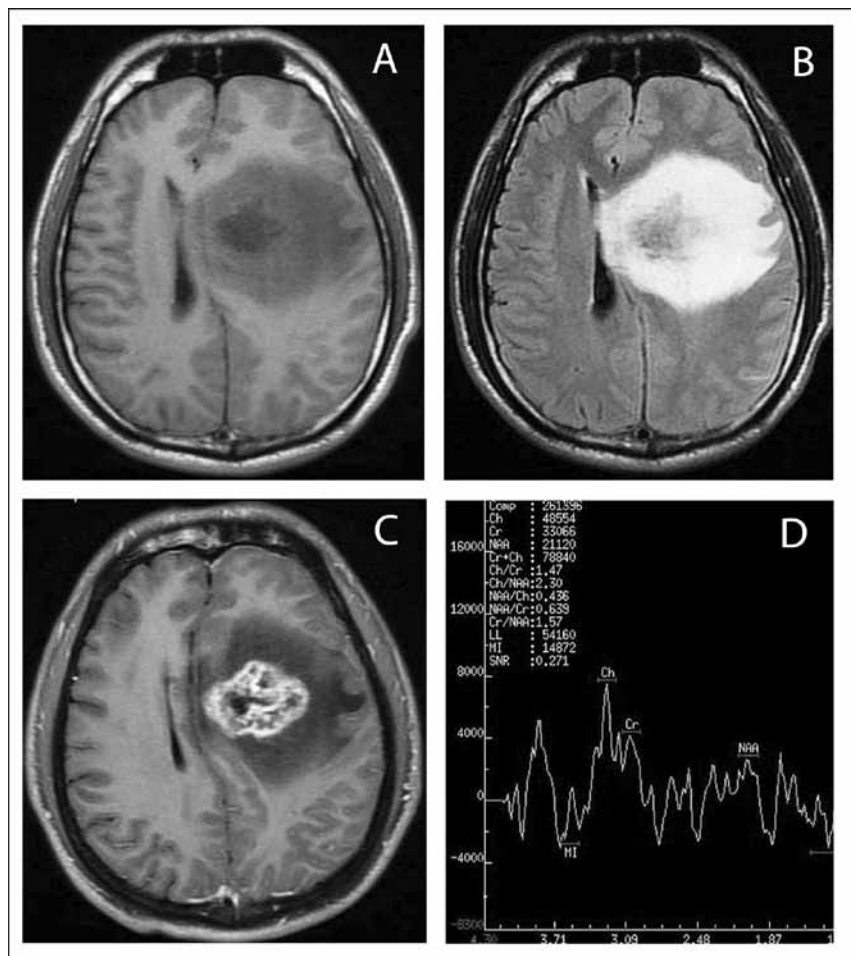
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, estos tumores se clasifican, con base en sus características histológicas, celulares y moleculares, en tumores de los nervios craneales y espinales, de las meninges, tumores de células germinales y del tejido neuroepitelial, entre otros



Anatomía del cerebro.

Fuente: <http://biologiayctma.com/blogs/1byg/unidades/sistema-nervioso/>

Las hormonas sexuales son compuestos esteroides derivados del colesterol que se sintetizan principalmente en las gónadas, las glándulas adrenales y en el SNC. Las más importantes son los progestágenos, andrógenos y estrógenos; los miembros más activos de dichos grupos son la progesterona (P_4), testosterona (T) y el estradiol (E_2), respectivamente. A escala fisiológica estas hormonas regulan procesos como la reproducción, respuesta inmunológica, neuroprotección, el aprendizaje y la memoria



Astrocitoma anaplásico.

Fuente: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-31802014005032407&script=sci_arttext

dos proteínas principales del RE son el RE- α y el RE- β ^{10,11}.

En el mecanismo genómico, una vez que la hormona ingresa a la célula por difusión a través de la membrana, se une a su receptor, este complejo receptor-hormona se une al ADN y regula la expresión de genes; en el mecanismo no genómico estas hormonas interactúan con receptores que se encuentran en la membrana y provocan cambios en los niveles de iones y mensajeros químicos intracelulares⁷.

El E_2 induce el crecimiento de astrocitomas a través del RE- α y de su regulación de la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, la an-

giogénesis (generación de vasos sanguíneos) y la metástasis (propagación del tumor a diferentes órganos y tejidos). En estudios se ha observado que la expresión de RE disminuye en células derivadas de astrocitomas de mayor grado de malignidad, esto concuerda con los resultados de biopsias de astrocitomas donde la expresión del RE se reduce durante el desarrollo del tumor. Lo anterior podría estar relacionado con una regulación diferencial de genes dependientes de estrógenos a medida que aumenta el grado del tumor¹².

La expresión del RP ha sido también determinada en biopsias de astrocitomas humanos y está

directamente relacionada con la progresión del tumor, sugiriendo que los tumores positivos a RP presentan un potencial altamente proliferativo¹³. En estudios *in vitro* en nuestro laboratorio se reportó que en células D54 y células U373 derivadas de un glioblastoma multiforme humano y de un astrocitoma humano grado III, respectivamente la P_4 , a través del RP, aumenta el número de células debido a alteraciones en mecanismos de proliferación celular, mediante cambios en la expresión genes, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular y la ciclina D1, que es una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular¹⁴.

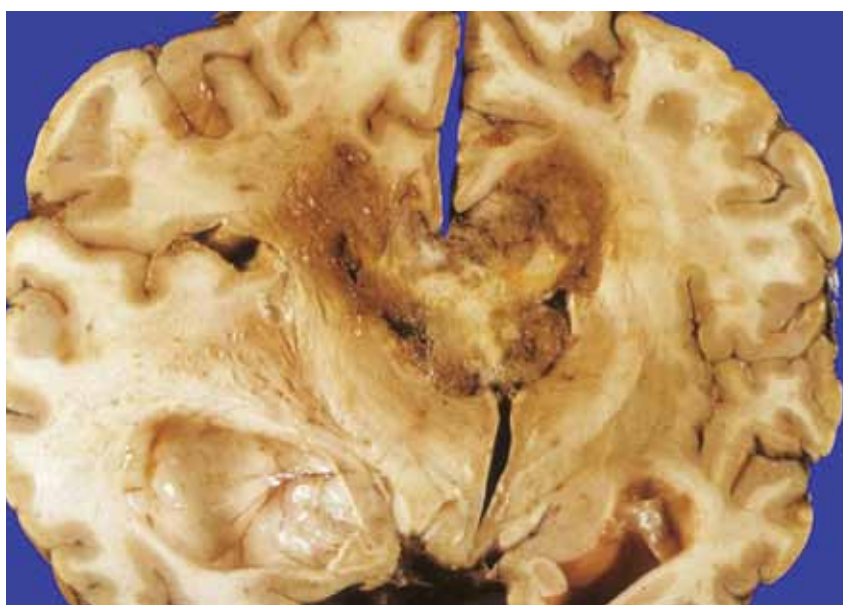
Recientemente se observó que la P_4 promueve la migración e invasión de células D54; sin embargo, los mecanismos por los que se efectúan estos procesos no han sido totalmente caracterizados. En modelos *in vivo*, reportamos que la P_4 , mediante su interacción con el RP, aumenta la proliferación e infiltración de un tumor causado por la implantación de células derivadas de un astrocitoma humano en la corteza cerebral de la rata¹⁵. Mediante análisis de microarreglos, una herramienta que permite el análisis masivo de genes contenidos en una muestra, pudo determinarse que la P_4 induce la expresión de por lo menos 30 genes diferentes en la línea celular U373, entre ellos, genes que promueven la metástasis, como

el GLIPR2 y AOC3, así como otros que han sido asociados a un aumento en la agresividad del tumor en cáncer de mama, de riñón, de próstata y de pulmón¹⁶.

En todos los estudios anteriores, los efectos de la P_4 en el aumento de número de células, proliferación celular, migración e infiltración, se vieron bloqueados por el antagonista del RP: la mifepristona (RU486)¹⁵. Este último es un compuesto que actúa como un antagonista del RP, es decir, tiene efectos contrarios a la P_4 . Lo anterior causa una inhibición en la expresión de genes en células sensibles a P_4 , lo que deriva en el bloqueo de los efectos de la P_4 , es por esta razón que se ha propuesto como un posible método terapéutico en diversos tipos de cáncer¹⁷.

En un estudio reciente se demuestran los beneficios paliativos del tratamiento oral con RU486. En un paciente con diagnóstico de

En un estudio reciente se demuestran los beneficios paliativos del tratamiento oral con RU486. En un paciente con diagnóstico de glioblastoma multiforme, el RU486 aumentó su esperanza de vida más allá del tiempo pronosticado sin el tratamiento



Corte histopatológico de tumor.

Fuente: <http://medicablogs.diariomedico.com/jmsanz/2010/08/08/tumor-solido-cerebral-por-exposicion-ocupacional-a-formaldehido/>

glioblastoma multiforme, el RU486 aumentó su esperanza de vida más allá del tiempo pronosticado sin el tratamiento¹⁸.

Hoy se idean estrategias terapéuticas para el tratamiento de los astrocitomas teniendo como objetivo la inhibición de los efectos de la P₄ sobre este tipo de tumores. Con el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos de las hormonas sexuales, en particular la P₄, se están realizando nuevas investigaciones que permitirán tener mayor comprensión sobre la influencia de las hormonas sexuales en los procesos involucrados en el desarrollo y progresión de los gliomas y que posibiliten el diseño de un mejor tratamiento para los pacientes con esta patología.

Se están realizando nuevas investigaciones que permitirán tener una mayor comprensión sobre la influencia de las hormonas sexuales en los procesos involucrados en el desarrollo y progresión de los gliomas y que posibiliten el diseño de un mejor tratamiento para los pacientes con esta patología

REFERENCIAS

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell*, 144(5), 646-674.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system". *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., Wrensch, M. (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma". *Nature Clinical Practice. Neurology*, 2(9), 494-503.
- Buckner, J. C., Brown, P. D., O'Neill, B. P., Meyer, F. B., Wetmore, C. J., Uhm, J. H. (2007). "Central nervous system tumors". *Mayo Clinic Proceedings*, 82(10), 1271-1286.
- Kim, T. S., Halliday, A. L., Hedley-Whyte, E. T., Convery, K. (1991). "Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas". *Journal of Neurosurgery*, 74(1), 27-37.
- Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O. T., Camacho-Arroyo, I. (2011). "Role of progesterone in human astrocytomas growth". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(13), 1663-1667.
- Melcangi, R.C., García-Segura, L.M., Mensah-Nyagan, A.G., (2008). "Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives". *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 777-797.
- Henley, D., Lindzey, J., Korach, K. (2005). "Steroid Hormones". In: Melmed S, Conn P (eds). *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*, 2 edn. New Jersey: Humana Press: 49-65.
- Hernández-Hernández, O. T., 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(1), 194-200.
- Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., Black, P. M. (1995). "Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms". *Neurosurgery*. 37(3), 496-503.
- Camacho-Arroyo, I., González-Agüero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., Ondarza, R. (2000). "Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas". *Journal of Neuro-Oncology*, 49(1), 1-7.
- González-Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., Cruz-Barrios, A., Rivas-Suárez, M., Camacho-Arroyo, I. (2012). "Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators". *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 379-386.
- 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, 80-84.
- Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Camacho-Arroyo, I. (2012). "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.* 132, 127-134.
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M. G., & Camacho-Arroyo, I. (2014). "Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat". *BioMed Research International*, 393174.
- González-Arenas, A., Cabrera-Wrooman, A., Díaz, N. F., González-García, K., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I. (2014). "Progesterone Receptor subcellular localization and gene expression profile in human astrocytoma cells are modified by progesterone". *Nuclear Receptor Research*, 1, 1-10.
- Chen, J., Wang, J., Shao, J., et al. (2014). "The unique pharmacological characteristics of mifepristone (RU486): from terminating pregnancy to preventing cancer metastasis". *Med Res Rev.* 34, 979-1000.
- Check, J., Wilson, C., Cohen, R., Sarumi, M. (2014). "Evidence that mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV". *Anticancer Research* 34 (5), 2385-2388.