



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LOS RECEPTORES
MEMBRANALES A PROGESTERONA EN LA
INVASIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS DE UN
GLIOBLASTOMA HUMANO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

BRENDA YENIFER BASTIDA BERISTAIN

CDMX NOVIEMBRE DE 2017

CIUDAD UNIVERSITARIA.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María de los Ángeles Granados Silvestre
VOCAL: Dr. Ignacio Camacho Arroyo
SECRETARIO: Dra. María Elena Ibarra Rubio
1er. SUPLENTE: Dr. Óscar Armando Pérez Méndez
2do. SUPLENTE: Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA: Dr. IGNACIO CAMACHO ARROYO _____

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. VALERIA HANSBERG PASTOR _____

SUSTENTANTE: BRENDA YENIFER BASTIDA BERISTAIN _____

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la autoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el financiamiento de CONACyT al proyecto número 250866.

A la Dra. Valeria Hansberg Pastor de la Facultad de Química, UNAM por su apoyo técnico y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dra. María de los Ángeles Granados Silvestre y Dra. María Elena Ibarra Rubio, por su interés al revisar y comentar esta tesis.

ÍNDICE

	Página
1. Índice de abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	4
3.1 Tumores cerebrales.....	4
3.1.1 Gliomas	4
3.1.2 Astrocitomas.....	5
3.1.3 Glioblastomas.....	6
3.1.4 Invasión de glioblastomas.....	8
3.2 Progesterona (P ₄).....	13
3.2.1 Generalidades.....	13
3.2.2 Mecanismo de acción clásico o genómico de la P ₄	14
3.2.3 Mecanismo de acción no clásico o no genómico de la P ₄	15
3.3 Receptores membranales a P ₄ (mRPs).....	17
3.3.1 Generalidades y estructura.....	17
3.3.2 Expresión, regulación y función.....	19
4. Antecedentes	21
4.1 P ₄ y glioblastomas.....	21
4.2 mRPs y glioblastomas.....	24
4.3 mRPs e invasión.....	25
5. Planteamiento del problema	27
6. Hipótesis	27
7. Objetivos	27
7.1 Objetivo general.....	27
7.2 Objetivos particulares	27
8. Metodología	28
8.1 Cultivo celular.....	28
8.2 Ensayo de invasión.....	28
8.3 Análisis estadístico.....	30
9. Resultados	31
10. Discusión	34
11. Conclusión	36
12. Perspectivas	36
13. Referencias	38

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Astrocitoma anaplásico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP_c	Adenosín monofosfato cíclico
AKT	Proteína cinasa B
CSCs	Células troncales cancerosas
Cdk1	Ciclina dependiente de cinasas 1
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
IP3	Inositol trifosfato
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Cinasa de MAPK
MMP-9	Metaloproteinasa 9
mRPα	Receptor a progesterona membranal α (PAQR7)
mRPβ	Receptor a progesterona membranal β (PAQR8)
mRPγ	Receptor a progesterona membranal γ (PAQR5)
P₄	Progesterona
PAQR	Familia de Receptores a Progestinas y Adiponectina Q
PI₃K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
RP	Receptor a progesterona
RU486	Mifepristona
SNC	Sistema nervioso central
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

2. RESUMEN

Los glioblastomas (GBM) son los tumores cerebrales más comunes y agresivos del sistema nervioso central en los seres humanos. Estos tumores neuroepiteliales derivan de los astrocitos o de células troncales cancerosas que presentan un alto grado de malignidad. Se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, se presentan mayormente en adultos entre los 45 y 70 años de edad y son más frecuentes en hombres que en mujeres (3:2).

Existen diversos factores que participan en el desarrollo de dichos tumores entre los que se encuentran las hormonas sexuales. Una de ellas es la progesterona (P_4), que es una hormona esteroide que actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos de acción denominados clásico (genómico) y no clásico (no genómico). El mecanismo clásico involucra la interacción de la hormona con su receptor intracelular (RP), el cual es un factor de transcripción activado por ligando. El mecanismo no clásico requiere de la activación de receptores de membrana (mRPs) y genera los efectos a corto plazo al modificar la conductancia de iones, inducir la formación de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico y activar cinasas como la proteína cinasa C y las cinasas activadas por mitógenos.

Se ha observado que la P_4 induce la migración e invasión de células derivadas de GBMs a través de su receptor intracelular (RP) y que el tratamiento con un antagonista del RP bloquea solo parcialmente el efecto de la hormona. Esto sugiere la participación de otras vías de señalización como aquellas reguladas por los mRPs. Recientemente se reportó que en células derivadas de un GBM humano se expresan algunas de las isoformas de los mRPs ($mRP\alpha$ y $mRP\beta$). Por lo que en este trabajo se evaluó el papel de los mRPs en la invasión de las células U87 y U251 derivadas de GBMs humanos. En la presente tesis, se utilizó un agonista selectivo de los mRPs (Org OD-02-0, 10 nM y 100 nM) para tratar a las

células U87 y U251 y evaluar su capacidad de invasión mediante el ensayo de Transwell.

Los resultados indican que el agonista de los mRPs Org OD-02-0 induce la invasión de la línea celular U251, derivada de un GBM humano, lo que sugiere la participación de los mRPs en dicho mecanismo tumoral de estas células. De forma interesante, se observó que en la línea celular U87 este proceso no involucra a los mRPs, pues no se observó algún cambio en el número de células que invadieron después de 24 h de tratamiento con el agonista comparado con el vehículo. Los datos obtenidos sugieren que la activación de los mRPs por su agonista juega un papel fundamental en la invasión de la línea U251, derivada de un glioblastoma humano.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 TUMORES CEREBRALES.

3.1.1 Gliomas

Los gliomas son tumores cerebrales caracterizados por producir diversos síntomas neurológicos y psiquiátricos como consecuencia de su tamaño, localización y su alta capacidad invasiva. Estos tumores se consideran primarios si su origen es dentro del sistema nervioso central (SNC) y secundarios si se originan fuera de éste y migran al mismo [1]. En México, los más comunes son los del tipo primario [2], y a nivel mundial la tasa de incidencia anual de los tumores cerebrales primarios es de aproximadamente 7.18 casos por cada 100,000 personas, presentando una mayor incidencia en hombres que en mujeres, así como en países desarrollados comparados con países subdesarrollados [3].

Estos tumores son los más frecuentes (50%) y agresivos del SNC y su tratamiento es actualmente uno de los mayores retos oncológicos ya que se asocian a una elevada morbilidad y mortalidad [4]. Tomando en cuenta sus características histopatológicas y la expresión de marcadores asociados al linaje celular (por ejemplo la sobre-expresión del Factor de crecimiento y diferenciación 15, GDF-15; metilación del promotor de MGMT, etc.) [5,8], los gliomas se clasifican en: astrocitomas, que representan el 75%; oligodendrogliomas que se observan en un 10-30% de los casos y ependimomas que son menos del 10% del total de los casos de gliomas [3,6-10].

Se ha sugerido que estos tumores surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se caracterizan por su alta capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse, por lo que son importantes candidatos a ser progenitores de tumores gliales. También se sabe que existen células neuronales y gliales preneoplásicas, provenientes de distintas regiones del cerebro, éstas poseen una mayor susceptibilidad a cambios genéticos que, sumados con el microambiente y las señales de las células no neoplásicas, pueden ser un factor de riesgo hacia el desarrollo de gliomas [10-12]. Por otro lado, existe evidencia

que sugiere que las neuronas y los astrocitos maduros pueden sufrir desdiferenciación en respuesta a cambios genéticos asociados a gliomas y crear un estado progenitor suficiente para iniciar la formación de estos tumores [13].

3.1.2 Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales derivados de los astrocitos o de células troncales cancerosas que presentan un alto potencial de malignidad; se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, se presentan mayoritariamente en adultos entre los 45-70 años de edad e interesantemente son más frecuentes en hombres que en mujeres (3:2) [3, 14]. La presencia de un astrocitoma puede provocar un aumento en la presión intracraneal asociado a síntomas como dolor de cabeza, vómito, cambios en el estado de ánimo y déficits neurológicos dependiendo de la localización del tumor en el cerebro del paciente [15-16].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona una clasificación de los astrocitomas basada en sus características histológicas (presencia de atipia, proporción de células en mitosis, proliferación endotelial y necrosis), capacidad de invasión y progresión, etc. en cuatro grados de malignidad, siendo los de grados I y II biológicamente menos agresivos y los de grados III y IV aquellos de mayor agresividad [6,17].

Los astrocitomas grado I o pilocíticos son tumores que se presentan principalmente en niños y adultos jóvenes. Histológicamente se caracterizan por un patrón bifásico de tejido compacto (densos agregados de astrocitos bipolares alargados) y laxo (astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos). Presentan bordes bien definidos y son tumores no-infiltrantes, aunque en ocasiones puede observarse proliferación vascular glomerular, sin embargo, no es considerada como

una señal de malignidad. La sobrevida del paciente es de 11 a 15 años [18-19, 20].

Los astrocitomas difusos o de grado II afectan comúnmente a adultos entre 30 y 40 años. Estos tumores se caracterizan por presentar un alto grado de diferenciación, bajo grado de infiltración difusa en el cerebro y bordes no definidos. Histológicamente se observa un moderado incremento celular, astrocitos bien diferenciados y células multinucleadas con atipia nuclear ocasional. Son considerados como tumores de baja malignidad, sin embargo, debido a su infiltración temprana hacia el parénquima, su resección quirúrgica es difícil por lo que requieren de quimio y/o radioterapia; además, muchos de estos tumores pasan a un grado de mayor evolución. La sobrevida de los pacientes es entre 5 y 10 años [21].

Los astrocitomas grado III o anaplásicos constituyen el 4% de todos los tumores primarios del SNC y tienden a progresar a tumores grado IV en tiempos cortos [22]. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y 70 años de edad. Están caracterizados por ser multicelulares, formados por células multinucleadas no uniformes. Este grado de tumor presenta una mayor desdiferenciación y una mayor proliferación que los de grado II, por lo que se pueden volver mortales más rápidamente, además presentan un notable pleomorfismo, anaplasia y mitosis atípicas abundantes sin presentar extensa necrosis. Generalmente el paciente muere en menos de tres años. Las terapias incluyen resección quirúrgica y quimio y/o radioterapia [1].

Los astrocitomas de grado IV, también llamados glioblastomas, pueden estar formados por diferentes tipos celulares como astrocitos y oligodendrocitos.

3.1.3 Glioblastoma

El glioblastoma es el tumor cerebral primario más frecuente y el más agresivo del SNC en los humanos. Su incidencia es de 6 a 7 casos por 100,000 habitantes por año, representando un 75% de todos los casos de astrocitomas. Existen dos

tipos de glioblastoma según su origen: primario o de *novo*, los cuales están derivados de células troncales cancerosas, estos son los más agresivos y son la forma más común de glioblastomas; secundario, son los que se originan a partir de un tumor de menor grado y evolucionan hacia grado IV. Presentan una proliferación celular descontrolada, mayor infiltración, propensión a la necrosis, angiogénesis robusta, resistencia a la apoptosis e inestabilidad genómica. También son tumores más resistentes a la quimio y/o radioterapia y son letales en un lapso de 12 meses [1, 2, 3, 14, 23].

En el desarrollo de los tumores humanos están involucrados factores que van desde el ambiente (exposición a agentes mutagénicos y/o carcinogénicos), el microambiente de las células (selección clonal por estrés a la terapia), epigenéticos (metilación del DNA), genéticos (mutaciones en genes supresores de tumores), etc. Con relación a estos últimos, para el caso de los astrocitomas humanos se ha descrito una variedad de mutaciones que afectan normalmente a los genes que participan en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la señalización de receptores a factores de crecimiento. Se ha encontrado que genes como la proteína 53 (P53), el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), la neurofibromina 1 (NF1), el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor a la proteína tirosina cinasa erbB-2 (ERBB2) y el gen del retinoblastoma (RB1) se encuentran frecuentemente mutados en los astrocitomas [24]. Además, la expresión de genes como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que promueve la angiogénesis y el EGFR que promueve la división celular, se encuentra alterada en astrocitomas humanos [25]. En la mayoría de los astrocitomas de grado IV se han identificado anomalías cromosómicas como son la presencia de una o más copias del cromosoma 7, pérdida del cromosoma 10, deleciones y translocaciones en el cromosoma 9. También se han detectado en menor grado pérdida del cromosoma 22 y deleciones en los cromosomas 1 y 7 [26].

La resistencia de los glioblastomas a las diferentes terapias se debe principalmente a su frecuente recurrencia. Para explicar su reincidencia se han planteado dos hipótesis: la de la evolución clonal [27] y la de las células troncales cancerosas [28]. La hipótesis de la evolución clonal sugiere que debido a la inestabilidad genética de los tumores, surgen subpoblaciones de células con diferentes mutaciones y que dichas subpoblaciones son seleccionadas por el microambiente generado por el propio tumor durante la progresión del cáncer y/o por los tratamientos; de esta forma, dependiendo de la presión de selección, una subpoblación puede llegar a ser la predominante y propagar el tumor. Por lo tanto, después del tratamiento con radioterapia o quimioterapia, serán seleccionadas las poblaciones resistentes a dichos tratamientos, las cuales pueden re-iniciar el tumor.

La hipótesis de las células troncales cancerosas propone que en los tumores hay células troncales capaces de propagarse, de sostener el crecimiento prolongado del tumor o de iniciar la formación de uno nuevo. Estas células son quiescentes, tienen una mayor resistencia al daño al ADN y son muy eficientes exportando moléculas como drogas terapéuticas mediante la acción de transportadores tipo ABC [29], por lo que son difíciles de eliminar con terapias convencionales que atacan células altamente proliferativas. La hipótesis de las células troncales cancerosas es de particular interés dado que puede llevar a buscar nuevas estrategias terapéuticas [30].

3.1.4 Invasión de Glioblastomas

La metástasis es considerada como un proceso fisiológico dinámico mediante el cual las células, bajo cierta estimulación parácrina y autócrina, son inducidas para salir de su ambiente fisiológico primario y viajar, ya sea localmente o a distancia, dentro del organismo para formar un nuevo foco proliferativo [31].

Este proceso se lleva a cabo por aquellas células capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes

(angiogénesis), tales como las células tumorales. Estas células degradan la membrana basal y los componentes de la matriz extracelular que las rodean (invasión), y son capaces de alcanzar el torrente sanguíneo (intravasación), sobreviven en el mismo y atraviesan las paredes de los capilares de otros órganos (extravasación), para invadir nuevamente la matriz extracelular y formar tumores secundarios (colonización) [32].

Una de las características más sobresalientes de los tumores malignos, como es el caso de los glioblastomas, es su alta capacidad para invadir los tejidos adyacentes dando como consecuencia una mayor probabilidad en la reincidencia tumoral.

Actualmente, se considera que el fenotipo invasivo le permite a las células perder sus propiedades adhesivas (por ejemplo la disminución o pérdida en la expresión de e-cadherina y keratina [33]), inducir proteólisis local y migrar, no únicamente en la membrana basal adyacente, sino en la matriz extracelular presente en diferentes partes del cerebro [34].

Este cambio de fenotipo ocurre en las células tumorales como consecuencia del mecanismo conocido como transición epitelio-mesenquimal (EMT), donde inicialmente se polariza a las células epiteliales para que posteriormente sufran una transformación morfológica y finalmente puedan llegar a ser células con fenotipo mesenquimal, caracterizadas por adquirir habilidades para migrar y degradar la matriz extracelular anormalmente [34, 41]. Después de llevarse a cabo la EMT, las células tumorales con características epiteliales exhiben un mejoramiento significativo en las habilidades de invasión y migración. Por lo tanto, la EMT juega un papel esencial en estos procesos. Se han caracterizado múltiples vías de señalización que se encargan de mediar el proceso de EMT en células tumorales, tales como Hedgehog, Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), Factor nuclear Kappa B (NF-kB), factor de crecimiento transformable-B (TGF-B) y finalmente la vía de Notch [37].

Bajo estas condiciones las células tumorales vuelven más débiles aquellas uniones que estabilizan su localización primaria para poder llevar a cabo la

invasión al tejido adyacente, en ese mismo momento, dichas células deben ser capaces de desarrollar nuevos mecanismos de adhesión al nuevo tejido circulante que les proporcione nuevas señales de supervivencia y nutrientes necesarios para su mantenimiento y progresión tumoral. Entre estos mecanismos se encuentra el incremento de la expresión de las moléculas de adhesión [31]. Estas moléculas son receptores de membrana que participan en funciones relacionadas con la circulación celular, con las interacciones célula-célula o de célula-matriz extracelular. Su función principal es la de transducir señales al interior de la célula en su interacción con sus ligandos o correceptores, desencadenando diferentes eventos celulares como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción y/o sobre-expresión de moléculas sobre la membrana celular, y cambios en la activación de la célula [31,36].

Se ha descrito que en los glioblastomas la invasión es un proceso multifactorial que involucra: la interacción entre las células tumorales y la matriz extracelular, la interacción con células adyacentes y una serie de procesos bioquímicos que permiten el movimiento celular (migración) [35].

Además de la pérdida o disminución en la expresión de moléculas de adherencia celular, otro proceso fundamental que debe ocurrir para que se lleve a cabo la invasión tumoral, es la degradación proteolítica, esta actividad se caracteriza por la degradación de la matriz extracelular adyacente a la región tumoral, por lo que se requiere de una producción, liberación y activación de una gran variedad de enzimas, que faciliten la migración y diseminación tumoral. Dichas enzimas con actividad de proteasas pueden ser secretadas bajo condiciones fisiológicas normales por células sanas o bajo condiciones tumorales por las mismas células sanas adyacentes al tumor primario o anormalmente por las células tumorales, estimuladas por la secreción de citocinas y/o factores de crecimiento; o por la producción de factores que inhiben o activan proteasas presentes en el microambiente tumoral [36]. Cabe mencionar que existe un equilibrio entre la producción y activación de las proteasas y los inhibidores endógenos de éstas.

La matriz extracelular está compuesta por dos capas fundamentales: la membrana basal y el tejido estromal intersticial. La primera es una estructura extracelular continua que separa a las células epiteliales y el endotelio del tejido estromal y proporciona un sustrato para el crecimiento de las células, además es el responsable de mantener la arquitectura tisular. Entre los componentes principales se encuentra la colágena de tipo IV (representando el 60% de las proteínas totales), glucoproteínas (tales como la laminina, fibronectina y la entactina) y proteoglucanos (tales como el heparano sulfato y el condroitino sulfato, representando el 10% de las proteínas totales), por su estructura hidrofílica, estos forman geles hidratados, por lo que ocupan un gran volumen del espacio extracelular, proporcionando un soporte mecánico a los tejidos y facilitan la migración celular [34, 38].

La matriz extracelular está bajo el control de un lento y continuo proceso de recambio en cuanto a sus componentes, mediante su síntesis y degradación y así mantener su integridad fisiológica. El proceso está altamente controlado en procesos fisiológicos normales como la invasión trofoblástica, la involución uterina tras el parto y la angiogénesis. Sin embargo, en procesos patológicos como el cáncer se observan membranas basales defectuosas en áreas localizadas donde las células tumorales aprovechan dicha deficiencia para llevar a cabo la invasión al tejido estromal circundante.

Los tejidos tumorales como en el caso de glioblastoma presentan una sobre-expresión en la actividad proteolítica en comparación con tejido normal. Dicha proteólisis se lleva a cabo por proteasas de matriz extracelular, las cuales pertenecen a cuatro subfamilias, las cuales se mencionan a continuación:

1. Serina proteasas
2. Cisteína proteasas
3. Aspartilo proteasas
4. Metaloproteasas de matriz extracelular (MMP)

Estas últimas son una familia de endopeptidasas secretadas por células del tejido conectivo, fagocitos y otras células, estas enzimas son sintetizadas como precursores de elevado peso molecular (zimógenos) que se activan a partir de la ruptura enzimática de azufre-zinc. Estas proteasas poseen un sitio de unión de iones zinc y un residuo de cisteína. Son activadas a pH neutro o ligeramente alcalino y están involucradas en procesos de remodelación tisular, tales como el crecimiento embrionario, crecimiento y reabsorción ósea, la cicatrización, la ovulación, la expresión anormal de éstas se relaciona con patologías como son la artritis reumatoide, el enfisema pulmonar, la aterosclerosis, la invasión tumoral y la metástasis. Actualmente se han identificado 15 diferentes tipos de MMP, sin embargo, en glioblastomas han tomado mayor importancia la MMP2 y MMP9 [38,39].

A su vez, las MMP se clasifican en cinco subfamilias: las colagenasas, las gelatinasas, las estromelisininas, metrilisininas y las metaloproteasas de membrana. La importancia de estas enzimas en los glioblastomas radica en que promueven la iniciación y el crecimiento del tumor primario y de los focos migratorios mediante la activación de factores de crecimiento, la formación de moléculas de adhesión y la iniciación de la angiogénesis tumoral al movilizar o activar factores pro-angiogénicos [38].

Para los glioblastomas se ha caracterizado una correlación positiva entre la adquisición del fenotipo altamente invasivo en las células cancerosas y el aumento de la expresión de las MMPs [35]. Actualmente, se sabe que existe una serie de factores que ayudan al mantenimiento y progresión de los glioblastomas, beneficiando a su vez la transformación de esas células tumorales hacia el fenotipo invasivo, dentro de dichos factores se encuentran las hormonas sexuales, donde una de las más estudiadas actualmente es la progesterona [35, 40].

3.2 PROGESTERONA

3.2.1 Generalidades

La progesterona (P_4) o 4-pregnen-3,20-diona, es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol; por lo que al igual que éste, contiene un núcleo de ciclopentanohidrofenantreno. Se sintetiza y secreta principalmente en los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), placenta y glándulas adrenales [42]. Además, puede ser sintetizada en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, ya sea de *novo* a partir del colesterol o a partir de la pregnenolona circulante [43]. Esta hormona es responsable de regular diversas funciones tales como la diferenciación y la conducta sexual, el embarazo, regulación de la ovulación, la implantación del óvulo, regulación del sistema inmunológico, estimulación de la respiración, modulación de la médula ósea, la protección al daño neuronal, desarrollo de neuronas y células gliales, reducción de la excitabilidad neuronal, memoria y aprendizaje, ciclo sueño-vigilia y en la regulación de la proliferación de diversos tumores entre los que se encuentran los astrocitomas [44, 45].

La P_4 ejerce sus efectos a través de dos mecanismos de acción denominados clásico (genómico; **Figura 1**) y no clásico (no genómico; **Figura 2**), se piensa que ambos pueden ocurrir en una misma célula y que de esta manera la hormona ejerza una regulación mucho más fina de diversas funciones celulares [47].

3.2.2 Mecanismo de acción clásico o genómico de la P_4

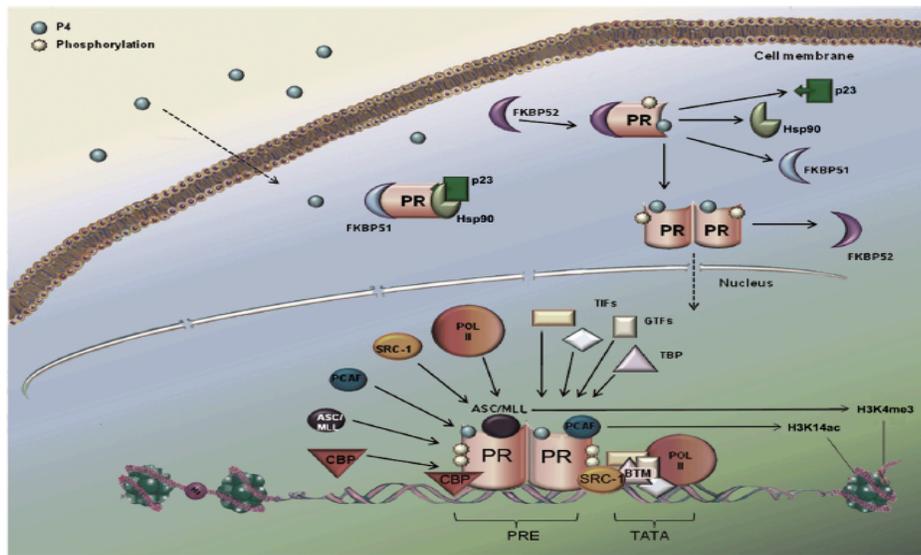


Figura 1. Mecanismo de acción clásico de la P₄. Imagen tomada de [46]

El mecanismo clásico involucra a un receptor intracelular (RP) el cual actúa como un factor de transcripción activado por ligando (tal como se muestra en la **Figura 1**). [46, 48]. Este proceso involucra la inducción de la expresión génica. En ausencia de la hormona los receptores se encuentran asociados a diversas proteínas tales como las de choque térmico (Hsp 70/90) y en una conformación específica que les permite unir a la hormona con alta afinidad. Por otro lado, gracias a su alto carácter lipofílico, la P₄ puede atravesar mediante difusión simple la membrana celular y así interactuar con el RP, lo que provoca un cambio conformacional en el receptor que promueve a su vez la disociación de las proteínas chaperonas, la dimerización del receptor y su posterior fosforilación. Finalmente, el receptor en su forma activa se une a elementos de respuesta a P₄ localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco y modulan su expresión mediante el reclutamiento de moléculas coreguladoras (ejemplo SRC-1) y de la maquinaria basal de transcripción [48]

El presente mecanismo está involucrado en los efectos a largo plazo de la hormona, mismos que están mediados por el RP, tales como el comportamiento sexual, procesos de memoria y aprendizaje, reproducción y neuroprotección, entre otros. Sin embargo, también se ha visto involucrado en procesos fisiopatológicos

como el cáncer [46]. En el caso de los glioblastomas, la expresión del RP se ha demostrado en astrocitomas humanos por diferentes grupos de investigación. En biopsias de pacientes con astrocitomas, la expresión del RP es notablemente mayor conforme avanza el grado de malignidad tumoral, lo que ha sugerido que la P_4 está involucrada en el desarrollo de estos tumores cerebrales [45, 48].

Con respecto a lo mencionado en el párrafo anterior, en nuestro laboratorio se caracterizó el efecto de la hormona y de un antagonista del RP (RU486) sobre el crecimiento de dos líneas celulares (U251 y UD54) derivadas de glioblastomas humanos. Se demostró que el tratamiento con P_4 (10 nM) incrementó el número de células y la tasa de proliferación en ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con el RU486 (10 μ M), logró bloquear parcialmente el efecto de la hormona. Este resultado sugiere que el efecto de la P_4 puede estar mediado tanto por el RP como por aquellas vía que involucra a los mRPs [49].

3.2.3 Mecanismo de acción no clásico o no genómico

Algunos de los criterios que se toman en cuenta para definir las acciones no genómicas de las hormonas sexuales están basados en la idea de que una acción no genómica es aquella que ocurre independientemente de la interacción directa del receptor con el material genético, como lo hacen los receptores nucleares, sino que induce efectos rápidos tales como la activación de diversas vías de señalización (**Figura 2**) [46, 50].

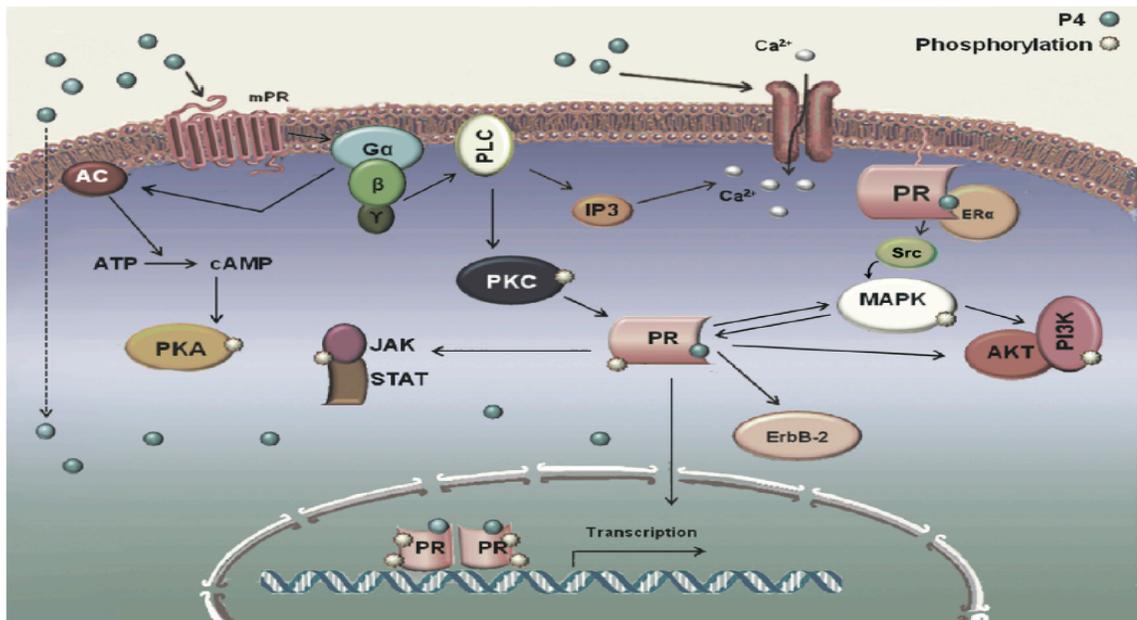


Figura 2. Mecanismo no genómico de la P₄. Imagen tomada de [46].

Dichos criterios comprenden algunos de los siguientes:

1. Acciones a corto plazo (minutos o segundos).
2. Independientes de la síntesis de ARNm y de proteínas.
3. Efectos que no son bloqueados por inhibidores de la transcripción, tales como la Actinomicina D; e inhibidores de la síntesis de proteínas, como la Cicloheximida.
4. Reproducibilidad de los efectos de análogos de las hormonas esteroides que no son permeables a la célula [51].

Con respecto a lo anterior, el segundo mecanismo de acción de la P₄ es el no clásico o también conocido como no genómico, que recibe este nombre debido a que la hormona puede ejercer algunos de sus efectos independientemente de la interacción que se lleva a cabo entre el RP y la hormona, por lo tanto, este mecanismo requiere de la activación de receptores como los mRPs (tal como se muestra en la figura 2); éste ocurre en la membrana y citoplasma y genera los efectos a corto plazo al modificar la conductancia a iones, inducir la formación de

segundos mensajeros como el AMPc, y activar cinasas como la proteína cinasa C (PKC) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) [46, 52].

De acuerdo a lo mencionado con anterioridad, la P_4 puede ejercer sus efectos no genómicos mediante mecanismos diversos, aunado a esto, en años recientes se han relacionado muchos de los efectos no clásicos de la hormona con los mRPs por lo que se le ha prestado un interés particular en el estudio de dichos receptores y el papel que juegan en distintos tipos tumorales.

3.3 Receptores membranales a P_4 (mRPs)

3.3.1 Generalidades y estructura

El estudio de los efectos no genómicos de la P_4 ha tomado mayor fuerza en las últimas dos décadas, y su importancia radica en el papel que juega este mecanismo en los procesos fisiológicos normales que comprenden un corto plazo y su posible participación en procesos fisiopatológicos como el cáncer.

La hormona puede ejercer sus efectos no genómicos mediante dos tipos de proteínas que han sido identificadas y caracterizadas recientemente, estas no están relacionadas con el RP, que median los efectos no clásicos: a) los mRPs, y b) los componentes del receptor membranal a P_4 (PGMRC) [50].

Los mRPs presentan una cierta homología con la familia de los receptores acoplados a proteínas (GPCR), sin embargo, los mRPs pertenecen a una gran y conservada familia de proteínas llamada "Familia de receptores a progestinas y adiponectina Q" (PAQR), misma que se divide a su vez en tres subgrupos basados en su estructura y las características de unión al ligando: los receptores relacionados a adiponectina (Clase I), los relacionados a los mRPs (Clase II) y los relacionados a hemolisina (Clase III) (**Figura 3**) [53-55].

En el genoma humano están presentes 11 genes que codifican para proteínas de la familia PAQR. Tomando como base la clasificación mencionada

anteriormente en los humanos, los PAQR de clase I incluyen al PAQR1, PAQR2, PAQR3 y PAQR4. Los PAQRs de clase II consisten en 5 miembros que solo se encuentran en vertebrados, de igual manera, este grupo se subdivide en dos subgrupos, uno conformado por el PAQR5 (mRP γ) y el PAQR6 (mRP δ) y el otro por el PAQR7 (mRP α), PAQR8 (mRP β) y el PAQR9 (mRP ϵ). Finalmente, el PAQR10 y el PAQR11 pertenecen a los receptores de clase III [56-57].

La homología de los mRPs con los GPCRs radica en que la familia de los PAQR está unificada por la presencia de siete dominios transmembranales (DTM) y tres regiones conservadas. El primer motivo conservado precede al primer DTM y tiene la secuencia consenso $PX_nGYRX_nEX_2NX_3H$, sin embargo, en los PAQRs de clase II dicho motivo está truncado a $EX_{2-3}NX_3H$. El segundo motivo conservado se localiza desde final del segundo DTM hasta el principio del tercer dominio y presenta la secuencia SX_3HX_nD . Finalmente el tercer motivo conservado se encuentra en el asa que precede el séptimo DTM y presenta la secuencia $PEX_3PGX_nHQX_2H$; dicho motivo está truncado en los PAQR de clase III siendo HX_3H (**Figura 3**) [58]. Sin embargo, en la actualidad existe controversia respecto a las características estructurales y topológicas de los mRPs, llegando a dudar si en verdad son tan similares a los GPCRs, estudiar a mayor profundidad este hecho posee un nivel de importancia enorme, ya que si se lograra confirmar la similitud estructural y funcional entre ambos (mediante la cristalización de alguno de los subtipos de los mRPs) y se llegara a la conclusión de que efectivamente están acoplados a una proteína G, se podrían elucidar de forma más certera algunas de las vías de señalización que utilizan dichos receptores para mediar los efectos no genómicos de la P_4 .

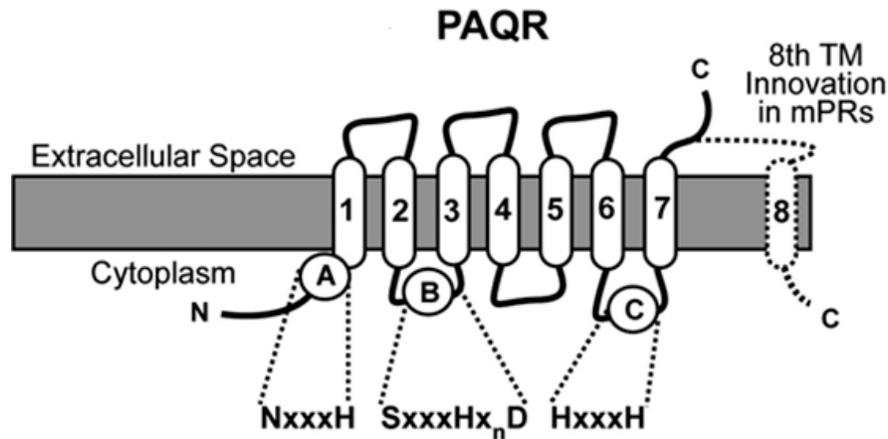


Figura 3. Modelo teórico de los 7 dominios transmembranales de los receptores a progesterona y adiponectina Q (PAQRs). Se muestran los dominios TM, así como los aminoácidos muy conservados en la familia de los PAQR: N (Asn), H (His), S (Ser), D (Asp), mientras que x representa a los aminoácidos que no están conservados. Imagen tomada de [58].

Thomas et al. (2012) observaron que al igual que los PAQR de clases I y III, los mRPs (pertenecientes a la clase II) están conformados por siete DTM, pero se diferencian de las otras dos clases al presentar el extremo amino terminal extracelular y el extremo carboxilo terminal intracelular, dicho modelo llegó para reforzar la idea de que los mRPs son receptores similares a los GPCRs [59].

3.3.2 Expresión, regulación y función

Inicialmente los mRPs fueron identificados en ovarios de teleósteos y posteriormente descubiertos en oveja, cerdo, ratón, rata y humano. En los humanos comprenden cinco subtipos: α - ϵ [58, 60], y se sabe que dichos receptores presentan una elevada afinidad ($K_d = 5$ nM), capacidad limitada, desplazable y específica a la P_4 , así como baja afinidad por agonistas y antagonistas del RP: R5020 ($K_d = 10$ μ M) y RU486 ($K_d = 8$ μ M) respectivamente,

y una competencia moderada por estrógenos y algunos de los metabolitos de la P_4 , tal como la alopregnanolona [59-60].

Al iniciar el estudio sobre la expresión de los mRPs se observó que en los humanos, el subtipo α predomina en los tejidos reproductivos, particularmente en la placenta, ovarios y testículos; el subtipo β , fue encontrado en tejidos neuronales, principalmente en cerebro y medula espinal y finalmente se encontró que el subtipo γ se expresa principalmente en riñón y el tracto gastrointestinal [61]. Interesantemente, dicho patrón de expresión coincidió con el que se presenta en otros organismos en donde también se han caracterizado dichos receptores [62]. Se ha sugerido que los subtipos δ y ϵ se expresan en distintas zonas del cerebro [60].

Al igual que el RP, en los mamíferos, los mRPs han sido relacionados con la regulación de procesos reproductivos, comunicación neuroendócrina, regulación del sistema inmune y algunos procesos fisiopatológicos como el cáncer [63].

La P_4 regula varias de sus funciones sobre el SNC, como la neuroprotección, la plasticidad neuronal y la neuroregeneración mediante el mecanismo clásico el cual involucra la interacción con el RP, sin embargo, se ha propuesto que los mRPs también participan en la regulación de estas funciones [65-66].

Los efectos no genómicos de la P_4 que se han descrito en el SNC son cambios en el transporte de iones, liberación de neurotransmisores, activación de proteínas cinasas y translocación al núcleo de la proteína Akt fosforilada [67-69]. Al igual que en los tejidos reproductivos, los niveles de expresión de mRP α y mRP β en el cerebro varían con los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo estral [70].

Las acciones de la P₄ son complejas y variadas y ésta puede activar tanto a los receptores intracelulares como a los membranales. Es de pensarse que en algunas de las funciones de la hormona podrían involucrar tanto al RP como a los mRPs (cross-talk), aunque es claro que estas dos clases de receptores pueden actuar independientemente, o que solo uno puede estar siendo funcional en las células o por lo contrario, ambos pueden estar siendo funcionales en una misma célula en el mismo periodo de tiempo. Además, dado que la afinidad de los mRPs por progestinas sintéticas (tanto agonistas como antagonistas) difiere considerablemente de los receptores clásicos a P₄, los mRPs podrían representar nuevos blancos terapéuticos para tratar distintas patologías sin afectar las acciones que son mediadas por el RP [46].

4. Antecedentes

4.1 P₄ y glioblastomas

El estudio de la expresión del RP en células derivadas de un glioblastoma humano ya ha sido demostrado por diversos grupos de investigación. Estudios que van desde biopsias de pacientes con astrocitomas, en donde se ha demostrado que la expresión del RP es directamente proporcional al grado de malignidad que presenta el astrocitoma del paciente, lo que sugiere que la P₄ está involucrada en el desarrollo de los astrocitomas [72].

En un trabajo realizado previamente por nuestro grupo de investigación se encontró que dos de los subtipos de mRPs (mRP α y mRP β ; **Figura 4**) se encuentran expresados en las células U251 y U87 derivadas de glioblastomas humanos [63]. En dicho trabajo se reportó que a nivel de ARNm hay una mayor expresión del mRP α en comparación con el subtipo β , mientras que a nivel de proteína se observó que ambos receptores tienen una expresión abundante en las células estudiadas [63].

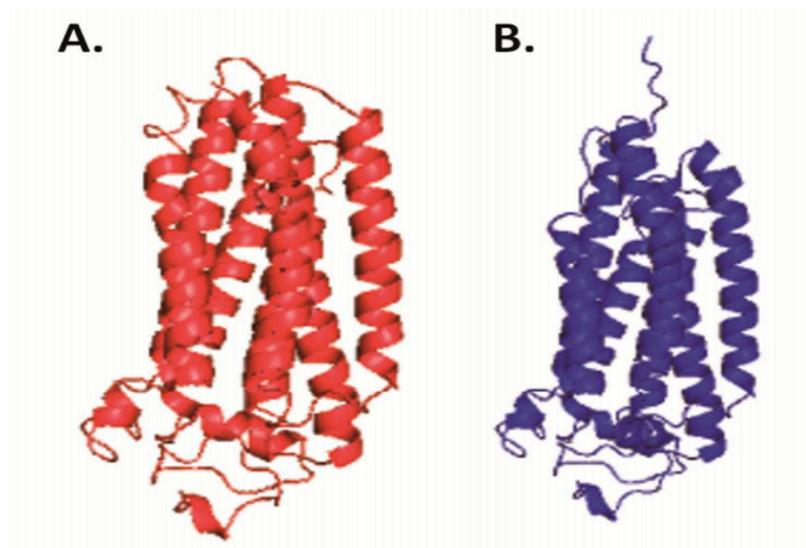


Figura 4: A) Estructura teórica del mRP α ; B) Estructura teórica del mRP β . Imagen tomada de [52].

Se mostró además que el 90% de las células estudiadas expresan al mRP β en la membrana, seguido del mRP α que se expresa aproximadamente en un 10 y 15% de las células U251 y U87 respectivamente, y finalmente el mRP γ que se expresa en menos del 5% de ambas líneas celulares en condiciones basales. El hecho de que un mayor porcentaje de células exprese al subtipo β comparado con el subtipo α sugiere que existe una regulación diferencial de dichos receptores ya sea a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional o post-traduccional [63].

Se sabe que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de diversos genes, incluyendo los de sus propios receptores. En células U87, la P₄ y el estradiol (E₂) (10 y 100 nM y 1 μ M) regulan negativamente el contenido del mRP α a las 12 h. Por lo contrario, la P₄ (100 nM y 1 μ M) y el E₂ (1 μ M) incrementan los niveles de proteína del mRP β . Dichos resultados sugieren que a pesar de la similitud estructural entre ambos receptores, éstos son regulados diferencialmente por la P₄ y el E₂, sugiriendo a

su vez que ambos subtipos de mRPs poseen funciones diferentes en las células derivadas de glioblastomas [63].

En nuestro laboratorio se caracterizó el efecto de la P_4 y del antagonista del RP, RU486, sobre el crecimiento de las líneas celulares (U373 y D54) derivadas de astrocitomas III y IV, respectivamente. El RU486 es un antagonista de la hormona que compite por el sitio activo del RP, cuya constante de afinidad media es de 1.4 nM. Este compuesto se une con gran afinidad al RP ($K_i = 1.7$ nM), mientras que la constante media de la P_4 es de 1.1 nM [73].

Se ha demostrado que el tratamiento con P_4 (10 nM) incrementa el número de células y la tasa de proliferación de ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con el RU486 bloquea solo parcialmente el efecto de la hormona, sugiriendo que los efectos de la P_4 podrían no solo estar mediados por el RP sino por aquellas vías de señalización que son dependientes de la interacción de la hormona con los mRPs [49].

En estudios “*in vivo*” se demostró que la P_4 incrementa la infiltración de células U373 implantadas en la corteza cerebral de rata, efecto que fue parcialmente bloqueado por el tratamiento con RU486. Interesantemente, otro grupo de trabajo reportó que a concentraciones relativamente altas de la hormona (20, 40 y 80 μ M) sus efectos se vuelven dañinos para distintas líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos, pues su viabilidad disminuye notablemente sin que el RU486 bloqueara dicho efecto [74].

De manera contraria, en modelos “*in vitro*” utilizados dentro del estudio de los glioblastomas, se ha observado que la inducción de la proliferación por P_4 en las células tumorales ocurre a bajas concentraciones (10 y 100 nM). Se ha reportado que en algunas líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos, la hormona induce la expresión de genes fundamentales para la regulación del ciclo celular, la proliferación, la angiogénesis (ciclina D1, EGFR, VEGF, etc.) [25].

Con respecto a lo mencionado en párrafos anteriores, se propone que, en glioblastomas humanos, la P_4 puede ejercer sus efectos mediante la activación de los mecanismos no clásicos, los cuales son independientes del RP.

4.2 mRPs y glioblastoma

Varios estudios sugieren que los mRPs están involucrados en el desarrollo del cáncer, como el de mama y el endometrial, al regular procesos como la proliferación celular, apoptosis y metástasis (migración e invasión tumoral). Dressing et al. observaron que $mRP\alpha$, $mRP\beta$ y $mRP\gamma$ se expresan en las células MCF-7 y SKBR3 ambas derivadas de cáncer de mama, y demostraron que la expresión de dichos receptores estaba asociada con la unión de la P_4 a la membrana plasmática [75]. Interesantemente, el subtipo α se encuentra sobre-expresado en dichas líneas celulares y en biopsias de tejido mamario comparado con tejido normal, lo que sugiere la participación del $mRP\alpha$ en la biología del cáncer de mama [76].

Además del cáncer de mama, los mRPs podrían tener un impacto en la biología del cáncer cervical y cáncer de ovario. Nuevamente el $mRP\alpha$ se encuentra presente en la línea celular Hela derivada de cáncer cervical [77] y $mRP\alpha$, $mRP\beta$ y $mRP\gamma$ se expresan en muestras de tejidos de cáncer de ovario humano [78]. Este hecho corrobora la participación que poseen los receptores en el desarrollo de distintos tipos de cáncer.

Finalmente, con el reciente reporte de la expresión de los mRPs (α , β y γ) en líneas celulares U251 y U87 ambas derivadas de un glioblastoma humano, y su regulación por P_4 y E_2 , surge la necesidad de estudiar el papel que juegan estos receptores en procesos fundamentales para la progresión de los glioblastomas, tales como la proliferación, la migración y la invasión.

4.3 mRPs e invasión

Actualmente, el estudio sobre los mRPs y su participación en el desarrollo de cáncer ha ido aumentando, Zou y colaboradores demostraron que en las células MDA-MB-468, derivadas de cáncer de mama, el mRP α participa en la regulación de la transición epitelio mesénquima (TEM) mediante la activación de la vía PI3K/Akt [79]. En dicho estudio se observó que la reversión de TEM es mediada por el mRP α y ocurre mediante la transactivación de EGFR, ya que ambos receptores se encuentran co-localizados en balsas de caveolina en la membrana plasmática. Mientras que trabajos anteriores sugieren que los mRPs pueden transactivar al RP [46, 80], ese ha sido el primer estudio que sugiere que los mRPs pueden transactivar receptores tipo tirosina cinasa localizados en la membrana.

Por otro lado, Chengping et al. [81], demostraron que la P₄ inhibe la migración e invasión de la línea celular A549 derivada de cáncer del pulmón humano mediante mecanismos regulados por el mRP α , los resultados del estudio sugieren que los efectos inhibitorios de la hormona se llevan a cabo mediante la inducción de una vía de señalización (Src) que induce la desfosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y la regulación negativa de la Metaloproteinasa 9 (MMP-9) [81].

Otro estudio realizado por Rong et al. demostraron que en la invasión de cáncer de mama está involucrado el mRP α , y que sus efectos son mediados por la vía de señalización PI3K/Akt. Ellos demostraron que la expresión a nivel de proteína del mRP α está directamente relacionada con el incremento de p-Akt y la expresión de MMP-9 en el tejido canceroso comparado con el tejido sano. En ese mismo estudio se encontró una correlación positiva entre la expresión del mRP α y el proto-oncogen C-erbB-2 [82].

Finalmente, Piña et al., demostraron que la P₄ (10 nM) induce la migración e invasión de la línea celular D54, derivada de un glioblastoma humano, sugiriendo que dichos efectos son mediados por el RP, sin embargo, al usar un antagonista selectivo del RP (RU486), dichos efectos se ven bloqueados pero

solo parcialmente [35], lo que sugiere la participación de otras vías activadas por la P_4 , como aquella que involucra a los mRPS.

Sin embargo, aún no existe evidencia que revele la participación de alguno de los subtipos de los mRPs en la migración e invasión en glioblastomas, por lo que nace la idea de estudiarlos en el presente trabajo. Así al conocer el papel que juegan estos receptores en dichos procesos puedan comenzarse a diseñar nuevas terapias farmacológicas o biotecnológicas dirigidas a los mRPs o a las moléculas involucradas en sus distintas vías de señalización moduladas por éstos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que la P_4 promueve la proliferación, migración e invasión de células derivadas de glioblastomas humanos por medio del RP y que el tratamiento con el antagonista de éste (RU486) bloquea solo parcialmente dicho efectos. Además, con el reciente hallazgo de la expresión de los mRPs en las líneas celulares U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos, se sugiere que en procesos proliferativos, migratorios e invasivos que están regulados por la P_4 podrían estar involucrados los mRPs. Por lo que en este trabajo se estudió si los mRPs juegan un papel en la invasión de las líneas celulares U251 y U87 derivadas de un glioblastoma humano.

6. HIPÓTESIS

El tratamiento con el agonista de los mRPS (Org OD-02-0) incrementará significativamente el efecto invasivo de las líneas celulares U87 y U251, sugiriendo que los mRPs juegan un papel importante en la invasión de dichas células.

7. OBJETIVOS.

7.1 General.

Estudiar si los receptores membranales a progesterona (mRPs) juegan un papel en la invasión de células derivadas de un glioblastoma humano.

7.2 Particulares.

- Conocer el efecto del agonista de los mRPs (OD-02-0) en la invasión de las líneas celulares U87 y U251.

- Estudiar si el efecto de invasión de las líneas celulares es dependiente de la concentración utilizada del agonista.

8. METODOLOGÍA.

8.1 Cultivo celular y tratamientos

Para alcanzar los objetivos del presente trabajo se utilizaron las líneas celulares U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos. Las células son adherentes y se cultivaron en cajas de Petri de 10 cm en medio DMEM con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 1 mM de piruvato, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina, bajo condiciones de 5% CO₂ y 95% de aire, a 37 °C. Previo a los tratamientos, las células se crecieron en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB libre de hormonas al 10%, 1 mM de piruvato, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina por 24 h.

Posterior a este tiempo las células se trataron con vehículo (V, Ciclodextrina 0.02%, DMSO al 0.01%), P₄ (10 nM) y el agonista de los mRPs, Org OD-02-0 (10 nM y 100 nM) adquirido de Axon Metchem (Groningen, Holanda). Se utilizó esta concentración del agonista de acuerdo a los ensayos previos de proliferación realizados en la línea celular U87; el efecto del agonista sobre las células se midió a las 24 h posteriores al tratamiento.

8.2 Invasión

Para evaluar el efecto del agonista de los mRPs en la invasión de las células se realizó el ensayo de invasión en Transwell o también llamado de cámara de Boyden. En este ensayo hay un cámara de cultivo llamada inserto que tiene una membrana de policarbonato en la parte inferior con un tamaño de poro definido por el cual deben poder cruzar las células bajo estudio. En dicho inserto se colocó

una matriz (Matrigel) que asemeja las condiciones de la matriz extracelular (ECM) y sobre ella se siembran las células. El inserto es colocado dentro de un pozo de una caja de cultivo generando dos compartimentos. Las células deben invadir la ECM y llegar al segundo compartimento el cual contiene medio DMEM suplementado con SFB al 10% cuya función es la de quimioatrayente celular.

Para este ensayo, las células U87 y U251 se cultivaron hasta llegar a una confluencia de 80% y 24 horas antes del ensayo se les reemplazó el medio por DMEM sin rojo fenol y adicionado con SFB al 10% libre de hormonas. En ese tiempo se colocó el Matrigel (Sigma-Aldrich, USA) en el inserto haciendo una dilución con medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB a una concentración final de 2 mg/mL. Se colocaron los insertos (Corning, USA) en cajas de cultivo de 6 pozos y se incubaron durante toda la noche a 37 °C para permitir la gelificación. Posteriormente, por cada inserto se sembraron 300,000 células disueltas en 1.5 mL de medio DMEM sin rojo de fenol y sin SFB. Simultáneamente, se les adicionaron los tratamientos con el agonista de los mPRs así como con el inhibidor de la síntesis del DNA, Ara-C (10 μ M) para inhibir la proliferación de las células. En el compartimento inferior al inserto se colocaron 2 mL de medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas como quimioatrayente. La placa se incubó a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se eliminaron el medio y Matrigel del inserto y se realizó un lavado con PBS. Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA, 4%) por 20 minutos y para quitar el excedente de PFA se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 15 minutos y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS por 10 minutos cada uno. Los insertos se dejaron secar y se observaron al microscopio, se tomaron las fotografías correspondientes con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X. Para cuantificar el número de células invasoras, aquellas que atravesaron el Matrigel, se contaron las células de 5 campos tomados al azar por cada inserto.

8.3 Análisis estadístico

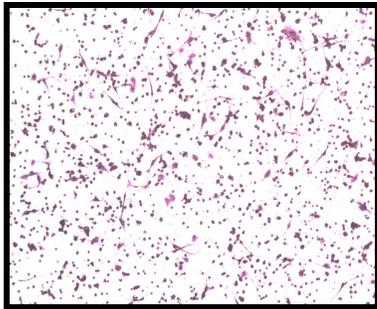
Los datos de invasión se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para todos los análisis estadísticos se empleó el programa GraphPadPrism5 para calcular los valores de probabilidad utilizando un intervalo de confianza del 95%, por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS.

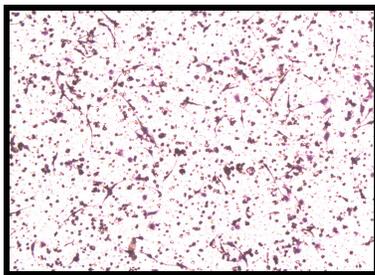
En la **Figura 6** se observa que el tratamiento con el agonista de los mRPs, OD-02-0 a una concentración de 10 nM induce un ligero aumento en el número de células U251 que invaden posterior a las 24 h de tratamiento, sin embargo, éste no resultó significativo. De forma interesante, se presentó un aumento notable en el número de células U251 que invadieron con el tratamiento del agonista a una concentración de 100 nM comparado con el vehículo.

En la **Figura 7** se muestra que el tratamiento con el agonista no modificó el número de células U87 que invaden después de 24 h en comparación con el vehículo. En el tratamiento con OD-02-0 a una concentración de 100 nM se notó una tendencia de aumentar el número de células que invaden, sin embargo, ésta no resultó significativa.

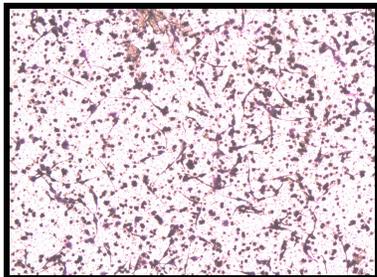
A)



Vehículo (DMSO 0.01%)



OD-02-0 (10 nM)



OD-02-0 (100 nM)

B)

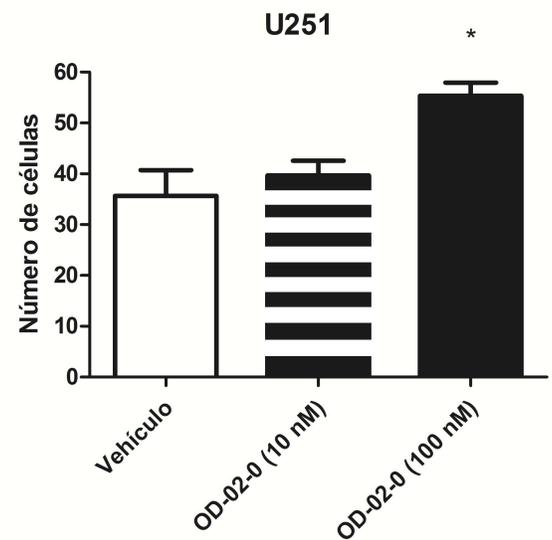
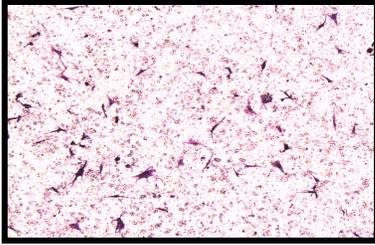
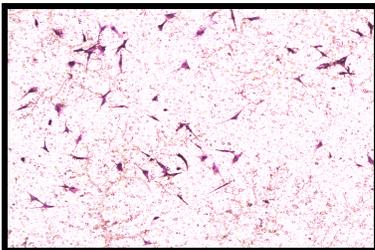


Figura 6. Efecto del OD-02-0 en la invasión de la línea celular U251. El tratamiento con el agonista OD-02-0 (100 nM) induce la invasión de las células U251. Las células fueron tratadas con vehículo (DMSO 0.01%), OD-02-0 (10 nM) y OD-02-0 (100 nM) y se evaluó la capacidad de invasión por un ensayo de Transwell. **A)** Imagen representativa de las células que invadieron a las 24 h. **B)** Conteo del número de células que invadieron después de los tratamientos. La gráfica muestra la media \pm E.S.M., $n=4$; $p<0.01$ vs. Vehículo.

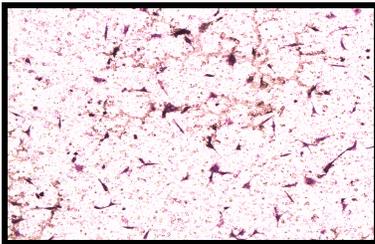
A)



Vehículo (DMSO 0.010%)



OD-02-0 (10 nM)



OD-02-0 (100 nM)

B)

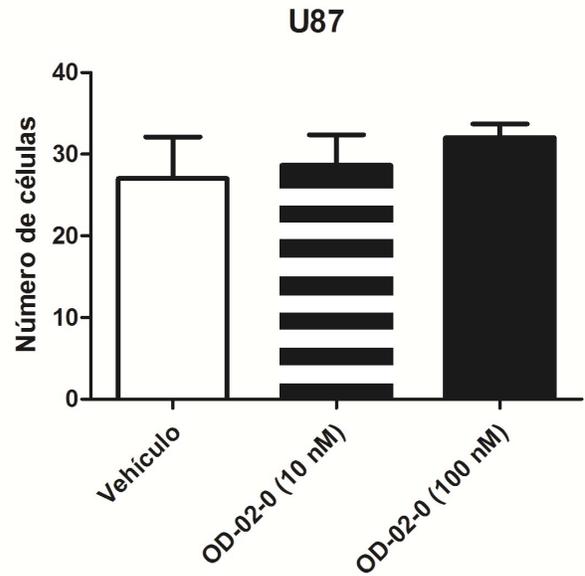


Figura 7. Efecto del OD-02-0 en la invasión de la línea celular U87. El tratamiento con OD-02-0 no induce la invasión de las células U87. Las células fueron tratadas con vehículo (DMSO 0.01%), OD-02-0 (10 nM) y OD-02-0 (100 nM), y se evaluó la capacidad de invasión por un ensayo de Transwell. **A)** Imagen representativa de las células que invadieron a las 24 h. **B)** Conteo del número de células que invadieron después de los tratamientos. La gráfica muestra la media \pm E.S.M., n=3.

10.DISCUSIÓN

Mucho se ha estudiado sobre la participación que tiene la P4 en procesos patológicos como son los tumores. Se sabe que la hormona incrementa el crecimiento de los astrocitomas lo que se atribuye a la interacción que se lleva a cabo entre la P4 y el RP. No obstante, una serie de estudios han demostrado que el uso de un antagonista específico del receptor nuclear (RU486), produce una disminución parcial de las acciones en las que se ve involucrada la P4, entre éstas el incremento en la infiltración de células de astrocitomas implantadas en la corteza cerebral de la rata [83].

Se ha observado que en algunas líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos, la P4 ejerce efectos rápidos en la regulación de algunos genes necesarios para la supervivencia de las células [84] lo cual no podría ser mediado a través del mecanismo clásico del RP. Esto sugiere que la hormona podría ejercer sus efectos sobre las células blanco mediante la interacción con otro tipo de receptores, tales como los mRPs.

Un estudio reciente, mostró la expresión de dos subtipos de mRPs (mRP α y mRP β) en células derivadas de glioblastomas humanos (líneas celulares U251 y U87). A nivel del ARNm se observó que hay una mayor expresión del mRP α en comparación con el mRP β , mientras que a nivel de proteína se observó que ambos receptores tienen una expresión abundante en las células en cuestión [63].

Aunado a lo anterior y, debido a que hasta la fecha no existían reportes en los que se haya estudiado el papel que juegan los mRPs en la invasión de células derivadas de un glioblastomas humano, en la presente tesis se estudió dicha participación, para lo cual se utilizó a un agonista de los mRPs, el Org OD-02-0, y de esta manera se excluye al mecanismo clásico en el estudio, ya que el RP no presenta afinidad por el agonista de los mRPs.

En este trabajo, se observó que el agonista de los mRPs a una concentración de 100 nM aumenta la invasión de la línea celular U251, derivada de un GBM humano posterior a las 24 h de tratamiento comparado con el vehículo, lo que sugiere la participación de los mRPs en la invasión tumoral de estas células.

De forma interesante, se observó que en la línea celular U87 el número de células invasivas no presentó cambios significativos a las 24 h de tratamiento con el agonista de los mRPs (10 y 100 nM), lo que sugiere que en esta línea celular las concentraciones y/o el tiempo experimental pudieron no ser adecuados. En los GBM, la infiltración de células tumorales hacía el tejido sano no solo depende de la capacidad motora de las células, sino que también requiere de la acción de proteínas (con actividad de proteasas) capaces de degradar a los componentes de la matriz extracelular, tales como son las metaloproteinasas de matriz (MMP) [38].

Se ha descrito que algunas de las MMPS están sobre-expresadas en GBM, en particular la MMP-1, MMP-2 y la MMP-9; la primera perteneciente al grupo de las gelatinasas, y las últimas dos pertenecientes al grupo de las colagenasas y cuyos sustratos son los mismos [85]. También, se ha caracterizado que en los procesos migratorios e invasivos de células derivadas de GBM humanos la MMP-14 está altamente involucrada [38]. Sin embargo, el nivel de expresión tanto de la MMP-1 y MMP-14 es diferente entre la línea celular U251 y U87, para la MMP-2 y MMP-9 existe una controversia entre los autores sobre la expresión de ambas MMPs entre las líneas celulares [38, 85-86]. Se ha sugerido que bajo ciertas estimulaciones como la de la IL-6, la expresión de las MMP-2 es mayor en las células U87 en comparación con la encontrada en células U251, por lo contrario, la expresión de la MMP-9 bajo ciertos estímulos como el TNF- α , puede ser mayor en las células U251 [38], sugiriendo así, que el agonista de los mRPs, OD-02-0 podría estar activando diferencialmente la expresión de las MMPs entre ambas líneas celulares.

Se ha demostrado que la P4, induce la infiltración de células derivadas de un astrocitoma humano de grado III que fueron implantadas en la corteza motora de

una rata mediante su interacción con el RP [83]. Este efecto puede estar mediado por la actividad de las MMPs, sin embargo, no está del todo clara la relación que existe entre la P4 y la expresión de las MMPs en GBM y no se ha descrito si existe una relación entre los mRPs y la expresión de las MMPs. Sin embargo, Grybos et al. (2014) demostraron que existe una correlación positiva entre la expresión de RP y la MMP-9 en tejido de cáncer endometrial [87], este hecho sugiere que la hormona puede estar involucrada en la regulación de la expresión de las MMPs.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo la diferencia en las líneas celulares podría depender tanto de los niveles de expresión de las MMPs como de los tipos de proteínas G a los que estén acoplados los subtipos de mRPs que expresan las líneas celulares.

Finalmente, valdría la pena realizar el silenciamiento de cada uno de los subtipos de los mRPs para corroborar la participación de éstos en la invasión de células derivadas de GBM humanos, y comenzar a cuestionarnos sobre el acoplamiento a proteínas G (ya sea a Gs, Gq o Gi). en el caso de estos tumores cerebrales.

11. CONCLUSIÓN.

El agonista de los mRPs a una concentración de 100 nM induce la invasión de la línea celular U251, derivada de un GBM humano.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar el silenciamiento de los subtipos de mRPs (mRP α y mRP β), para corroborar la participación de éstos en la invasión de las células U251, utilizando al agonista de los mRPs (Org OD-02-0,).

- Estudiar más a fondo las vías de señalización activadas por los mRPs para comenzar la caracterización del acoplamiento a proteínas G de estos receptores en células derivadas de GBM.
- Estudiar la expresión y actividad de las MMPs esenciales para que se lleve a cabo el proceso de invasión tumoral en GBM.

13. REFERENCIAS

- [1] Fumari F.B., Fenton T., Bachoo R.M., et al. (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21, pp. 2683-2710.
- [2] López-González L., Sotelo J. (2000) Brain tumors in México: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical Neurology Journal*, 53, pp. 157-162.
- [3] Ostrom Q. T., Gittleman H., Xu J., Kromer C., et al. (2016) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology*, 18, pp. 1-75.
- [4] Burnet N.G., Lynch A.G., Jefferies S.J., et al. (2007) High grade glioma: imaging combined with pathological grade defines management and predicts prognosis. *Radiotherapy & oncology Journal*, 85, pp. 371-378.
- [5] Roth P., Codó P., Weller M., et al. (2015) Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15. *Oncotarget*, 7, pp. 7732-7746.
- [6] Chang S., J. van den Bent M., Weller M., et al. (2016) A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neurology oncology*, 20, pp. 1-11.
- [7] Weller M., Reifenberger G., et al. (2016) Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, pp. 1-19.
- [8] Weller M., Roth P., Gramatzki D. (2017) Management of Elderly Patients with Glioblastoma. *Current neurology and neuroscience reports*, 35, pp. 1-7.
- [9] Giannini C., Scheithauer B.W., Weaver A. L., et al. (2007) Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60, pp. 248-262.
- [10] 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, pp. 97-109.
- [11] Alcantara S., Chen J., Kwon C. H., et al. (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*, 15, pp. 45-56.
- [12] Chen Y. H., Gutmann D.H., (2014) The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene*, 33, pp. 2019-2026.
- [13] Friedmann D., Bushong E. A., Soda Y., et al. (2012) Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, 338, pp. 1080-1084.

- [14] Ohgaki H., Kleihues P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathology*, 109, pp. 93-108.
- [15] Ichimura K., Ohgaki H., Kleihues P., et al. (2004) Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *Journal of Neuro-oncology*, 70, pp. 137-160.
- [16] Kleihues P., Louis D. N., Scheithauer B. W., et al. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and experimental neurology*, 61, pp. 215-225.
- [17] Daumas C., Scheithauer B., O'Fallon J., et al. (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*, 62, pp. 2152- 2165.
- [18] Bristol R. E. (2009) Low- grade glial tumors: are they all the same? *Seminars in pediatric neurology*, 16, pp. 23-26.
- [19] Tihan T., Bloomer M. M. (2010) Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Seminars in diagnostic pathology*, 21, pp. 114- 121.
- [20] López-Delgado P.D., Corrales-Gracia E.M., Martino J., Lastra-Aras E., Dueñas-Polo M.T. (2017) Diffuse low-grade glioma: a review on the new molecular classification, natural history and current management strategies. *Clinical and Translational oncology*, pp. 31-34.
- [21] Arko L., Katsyv I., Park G. E., et al. (2010) Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacology and Therapeutics*, 218, pp. 1-36.
- [22] Sarkar C., Jain A., Suri V. (2009) Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of cancer*, 46, pp. 108- 119.
- [23] Xie Z. (2009) Brain tumor stem cells. *Neurochemical research*, 34, pp. 2055-2066.
- [24] McLendon R., Friedman A., Bigner D., et al. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, pp. 1061- 1068.
- [25] Hernandez O. T., Gonzalez T. K., Camacho I. (2012) Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132, pp. 127- 134.
- [26] Bigner S. H., Mark J. Bigner D. D. (1990) Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 47, pp. 141- 154.
- [27] Nowell P. C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, pp. 23-28.
- [28] Dick J. E. (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112, pp. 4793-4807.

- [29] Fuchs D., Daniel V., Sadeghi M., et al. (2010) Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, pp. 1098-1104.
- [30] Dietrich J., Imitola J., Kesari S. (2008) Mechanisms of disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, pp. 393-404.
- [31] Rodríguez L., Jurado F. R., Reyes J. A. (2000) La proteólisis en la invasión y la metástasis de la célula tumoral. *Rev. Instituto Nacional de Cancerología*, 46, pp. 33-46.
- [32] Martínez E., Herrera (2006) Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología*, pp. 83-96.
- [33] Labernadie A., Kato T., Trepas X. (2017) A mechanically active heterotypic E-cadherin/ N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, pp.1-29
- [34] Iser I., Perreira M., Lenz G., et al. (2017) The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in Glioblastoma: An update systematic review and *in silico* investigation. *Medicinal Research Reviews*, 37, pp. 271-313.
- [35] 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, pp. 19-25.
- [36] Roa E. I., Villaseca H. M., Araya J. C., et al. (2001) Moléculas de adhesión celular y cáncer. *Rev. Chilena de cirugía*, 53, pp. 504- 510.
- [37] Zhao M., Ang L., Huang J., et al. (2017) MicroRNAs regulate the epithelial-mesenchymal transition and influence breast cancer invasion and metastasis. *Tumor Biology*, pp. 1-8.
- [38] Hagemann C., Anacker J., Vince G., et al. (2012) A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World Journal of Clinical Oncology*, 3, pp. 67-79.
- [39] Wang C., Tong X., Jiang X., et al. (2016) Effect of matrix metalloproteinase-mediated matrix degradation on glioblastoma cell behavior in 3D PEG. Based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105, pp. 770-778.
- [40] Cabrera-Muñoz E., Hernández-Hernández O.T., Camacho-Arroyo I. (2011). Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, pp. 1663–1667.

- [41] Ribatti D. (2017) Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis. *Experimental Cell Research*, pp.1-5.
- [42] Henley D., Lindzey J., Korach K. (2005) *Endocrinology. Basic and clinical principles*. In : Melmed S., Conn P. 2nd ed. Humana Press, pp. 49-65.
- [43] Genazzani A. R., Stomati M., Morittu A. et al. (2000) Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Human Reproduction*, 15, pp. 14-27.
- [44] González A., Villamar O., Camacho I., et al. (2003) Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85, pp. 25-31.
- [45] 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, pp. 166-175.
- [46] Camacho-Arroyo I., Hansberg-Pastor V., et al. (2017) Mechanism of progesterone action in the brain. *Hormones, brain, and behavior*. Oxford: Academic Press. Elsevier Inc. pp. 181-214.
- [47] Schumacher M., Corini H., Robert F., et al. (1999) Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behavioural Brain Research*, 105, pp. 37-52.
- [48] Hansberg V., González A., Camacho I. (2014) Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos. *Mensaje Bioquímico*, 51, pp. 127-144.
- [49] González G., Guitiérrez A. A., González D. et al. (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, 32, pp. 129-135.
- [50] Garg D., Maravet K., Segars J., et al. (2017) Progesterone-Mediated non-Classical signaling. *Rev. Cell Press: Trends in endocrinology and metabolism*, 20, pp.1-13.
- [51] Levin E. R. (2008) Rapid Signaling by steroid receptors. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295, pp. 1425-1430.
- [52] Moore F., Evans S. (1999) Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors: a review of evidence. *Brain, behavior and evolution*, 54, pp. 41-50.
- [53] Fernandes M. S., Pierron V., Michalovich D., et al. (2005) Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues,. *Journal of Endocrinology*, 187, pp. 89-101.

- [54] Tang Y., Hu T., Arterburn M., et al. (2005) PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *Journal of molecular evolution*, 61, pp. 372-380.
- [55] Lyons T., Villa N., Regalla L. et al. (2004) Metalloregulation of yeast membrane steroid receptor homologs. *Proceedings of the national academy of sciences of the _USA*, 101, pp. 5506-5511.
- [56] Petersen S., Moura P., Brewer D., et al. (2013) Novel progesterone receptors: neural localitation and possible functions. *Frontiers in neuroscience*, 7, pp. 1-7.
- [57] Baida G., Kuzmin N. (1996) Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica et biophysica acta*, 1284, pp. 122-124.
- [58] Smith J., Kupchak B., Garitaonandia I., et al. (2008) Heterologous expression of human mRPalpha, mRPbeta and mRPgamma in yeast confirms their ability to functions as membrane progesterone receptors. *Steroids*, 73, pp. 1160-1173.
- [59] Zhu Y., Bond J., Thomas P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proceedings of the national academy of sciences of the _USA*, 100, pp. 2237-2242.
- [60] Pang Y., Dong J. Thomas P. (2013) Characyerization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mRP δ and mRP ϵ) and mRP δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 154, pp. 283-285.
- [61] ZhuY., Rice D., Pang Y. et al. (2003) Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the national academy of sciences of the _USA*, 100, pp.2231-2236.
- [62] Cai Z., Stocco C. (2005) Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 146, pp. 5522-5532.
- [63] Valadez-Cosmes P., Germán-Castelán L., González-Arenas A., Velasco-Veázquez M. A., Hansberg-Pastor V., Camacho-Arroyo I. (2015). Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 154, pp. 176-185.
- [64] Brinton R., Thompson R., Foy M., et al. (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Front neuroendocrinology*, 29, pp. 313-339.
- [65] Towle A., Sze P. (1983) Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *Journal of steroid biochemistry*, 18, pp. 135-143.
- [66] Tischkau S., Ramírez V. (1993) A specific membrane binding protein for progesterone in rat brain: sex differences ans induction by estrogen. *Proceedings of the national academy of sciences of the _USA*, 90, pp. 1285-1289.

- [67] Frye C. (2001) The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Research Reviews*, 37, pp. 201-222.
- [68] Balasubramanian B., Portillo W., Reyna A. et al. (2008) nonclassical mechanisms of progesterone action in the brain:II Role of calmodulin-dependent protein kinase II in progesterone-mediated signaling in the hypothalamus of female rats. *Endocrinology*, 149, pp. 5518-5526.
- [69] Hwang J., Duncan R., Madry C., et al. (2009) Progesterone potentiates calcium release through IP3 receptors by an Akt-mediated mechanism in hippocampal neurons, *Cell calcium*, 45, pp. 233-242.
- [70] Camacho I., González A., González G. (2007) Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comparative biochemistry and physiology part A: molecular and integrative physiology*, 146, pp. 644-652.
- [71] Cabrera E., González A., Saqui M., et al. (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 113, pp. 80-84.
- [72] González G., Ondarza R., Gamboa A. et al. (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain research bulletin*, 56, pp. 43-48.
- [73] Raaijmakers H., Versteegh J., Uitdehaag J. (2009) The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *The journal of biological chemistry*, 284, pp. 19572-19579.
- [74] Atif F., Yousuf S., Stein D. (2014) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3/Akt/mTOR signaling. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 146. Pp. 62-73.
- [75] Dressing G., Thomas P. (2007) Identification of membrane progestin receptors in human breast cancer cell lines and biopsies and their potential involvement in breast cancer. *Steroids*, 72, pp. 111-116.
- [76] Pang Y. Thomas P. (2011) Progesterone signals through membrane progesterone receptors (mPRs) in MDA-MB-486 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, pp. 921-928.
- [77] Thomas P. (2008) Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29, pp. 292-312.
- [78] Romero M., Peiper S., Evans B. et al. (2008) Expression profile of heptahelical putative membrane progesterone receptors in epithelial ovarian tumors. *Human pathology*, 39, pp. 1026-1033.

- [79] Zuo L., Li W., You S. (2010) Progesterone reverses the mesenchymal phenotypes of basal phenotype breast cancer cells via a membrane progesterone receptor mediated pathway. *Breast cancer research*, 12, pp. 34.
- [80] Karteris E., Zervous S., Pang Y., et al. (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular endocrinology*, 148, pp. 3459-3467.
- [81] Xie M., You S., Hu C., et al. (2013) Progesterone inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells through membrane progesterone receptor α -mediated mechanisms. *Oncology research*, 29, pp. 1873-1880.
- [82] Wu X., Sun L., Ma R., et al. (2016) Breast cancer invasion and metastasis by mPR α through the PI3/Akt signaling pathway. *Pathology and oncology research*, 22, p. 471-476.
- [83] Germán L., Manjarrez J., González A., et al. (2014) Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cell implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed research international*, 2014, pp. 393-399.
- [84] González A., Valadez P., Jiménez C. (2014) Progesterone-induce blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway. *Journal of steroids biochemistry and molecular biology*, 144, pp. 463- 470.
- [85] Hagemann C., Vince G., Haas S., et al. Comparative expression pattern of matrix-metalloproteinases in human glioblastomas cell-lines and primary cultures. *BMC research notes*, 3, pp.293-294.
- [86] Yan W., You G., Jiang T., et al. (2011) Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain research*, 1411, pp. 108-115.
- [87] Grybos A., Bar J. (2014) The relationships between the immunoexpression of KAI1, MMP-2, MMP-9 and steroid receptors expression in endometrial cancer. *Folia histochemica et cytobiologica*, 52, pp. 187-194.