



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

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

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

NICOLÁS ORTEGA WALTER

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México (Abril 2018)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco al Dr. Rafael Villalobos Molina, al Dr. Carlos Pérez Plasencia, a la M. en C. Mónica Chávez Maldonado y a la Dra. Valeria Hansberg Pastor por orientarme durante el desarrollo de esta tesis y de igual manera a mi asesor el Dr. Ignacio Camacho Arroyo y al Laboratorio 107 de Comunicación Neuroendocrina de la Facultad de Química.

Índice

1. Índice de abreviaturas	4
2. Resumen	6
3. Introducción	7
3.1 Cáncer	7
3.1.1 Carcinogénesis	8
3.2 Migración celular	8
3.3 Tumores cerebrales	10
3.3.1 Generalidades	10
3.3.2 Astrocitomas	11
3.3.3 Glioblastomas	13
3.4 Progesterona	15
3.4.1 Mecanismos de acción	15
3.5 Receptores membranales a Progesterona (mRPs)	17
3.5.1 Generalidades	17
3.5.2 Expresión, regulación y función de los mPRs	20
4. Antecedentes	23
5. Planteamiento del problema	25
6. Hipótesis	25
7. Objetivos	25
7.1 Objetivos generales	25
7.2 Objetivos particulares	25
8. Metodología	25
8.1 Cultivo celular y tratamientos	26
8.2 Migración	26
8.3 Análisis estadístico	27
9. Resultados	27
10. Discusión	30
11. Conclusiones	31
12. Referencias	32

1. Índice de abreviaturas

AMPc	Adenosein monofosfato cíclico
AKT	Proteína cinasa B
Ca	Calcio
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Acido desoxirribonucleico
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
ER	Receptor a estrógenos
GBM	Glioblastoma
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MDM2	Murine doble minute 2
MEK	Cinasa de MAPK
MET	Transición epitelio mesénquima
mRPα	Receptor membranal a progesterona α (PAQR7)
mRPβ	Receptor membranal a progesterona β (PAQR8)
mRPγ	Receptor membranal a progesterona γ (PAQR5)
ORG OD-02-0	Agonista de mRPs
P16	Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina
P4	Progesterona
PAQR	Receptores a Progestinas y Adiponectina Q
Par	Familia reguladora de polaridad celular

Rac	RAs-related C3 botulinum toxin
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIP3	Fosfatidil inositol (3,4,5)-Trisfosfato
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PR	Receptor a Progesterona
RU486	Mifepristona
SNC	Sistema Nervioso Central

2. Resumen

Los glioblastomas o astrocitomas grado IV son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en humanos, presentándose principalmente en personas adultas entre 45 y 65 años de edad, siendo más común su aparición en hombres que en mujeres con una proporción de 3:2. Las hormonas sexuales como la progesterona (P4), junto con otros factores intervienen en la tumorigénesis y el desarrollo del glioblastoma. La P4 es una hormona esteroide con múltiples funciones que ejerce sus efectos sobre sus tejidos blanco mediante dos mecanismos de acción: el mecanismo clásico (genómico) a través de la interacción con su receptor intracelular (PR), que es un factor de transcripción activado por ligando que regula la expresión de diversos genes; y el mecanismo no clásico (no genómico) que implica la activación de los receptores membranales a Progesterona (mRPs) pertenecientes a una familia de proteínas que cuenta con siete dominios transmembranales capaces de mediar la activación de vías de señalización, inducir la formación de segundos mensajeros, modificar el transporte de iones, así como regular la activación de diferentes cinasas.

Se ha observado que P4 induce la migración e invasión de células de glioblastoma humano a través de la interacción con el PR; sin embargo, el uso de antagonistas del PR en células de glioblastoma tratadas con P4 inhibió sólo parcialmente el efecto de la hormona. Esto sugiere que la P4 podría ejercer sus efectos sobre estas células a través de otras vías de señalización que no están involucradas en la activación del PR, como podrían ser los mRPs.

Recientemente, se ha reportado la expresión de varios subtipos de los mRPs: mRP α , mRP β y mRP γ en las líneas celulares U87 y U251, por lo que en esta tesis se trabajó con un agonista selectivo de los mRPs (Org OD 02-0, 10 nM y 100 nM)

para evaluar el papel que tienen estos receptores en la migración inducida por P4 en estas líneas celulares.

Ensayos de “Scratch” o de cierre de herida demostraron que la activación de los mPRs mediante el agonista Org OD 02-0 a concentraciones de 10 nM y 100 nM promueve la migración en las líneas celulares U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos. El aumento se encontró a las 12 horas en la línea celular U87 y a las 24 horas en ambas líneas celulares.- Estos resultados sugieren que la P4 promueve la migración en las líneas células U87 y U251 de glioblastoma a través de un mecanismo no genómico mediado por los mRPs.

3. Introducción

3.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad o conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por un incremento descontrolado de división celular y una disminución en la muerte celular¹. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, causó 8.8 millones de defunciones y ocasionó el 13% de todas las muertes a nivel mundial².

En esta patología las células pueden formar cuerpos sólidos (tumores) o pueden ser no sólidos como las leucemias. El término malignidad hace referencia a que puede extenderse a otros tejidos cercanos, es decir que puede invadir, e incluso poder desprender fragmentos de éste y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio de los sistemas circulatorio, y linfático, y colonizar otras zonas distintas al sitio de origen del tumor origen³.

Hanahan y Weinberg en su Artículo “The hallmarks of cancer⁴” publicado en 2000 agrupan en 6 características fundamentales al cáncer, que posteriormente aumentan a 10 en una publicación de 2011⁵, estas características le aportan ventajas de supervivencia a los tumores en relación a otros tejidos adyacentes, características que se mencionan a continuación:

- señalización y proliferación sostenida

- resistencia a la muerte celular
- inmortalidad replicativa
- angiogénesis
- inestabilidad genómica
- evasión de la respuesta inmune
- desregulación metabólica
- activación de la invasión y la metástasis
- inflamación
- evasión de supresores de crecimiento

3.1.1 Carcinogénesis

La carcinogénesis es el proceso por el cual se desarrolla el cáncer desde el inicio hasta la aparición de neoplasias visibles. El proceso carcinogénico se divide en distintas etapas: iniciación, promoción y progresión, cada una con características moleculares morfológicas genéticas y epigenéticas específicas. Existen distintos modelos que intentan explicar el origen del proceso carcinogénico: El modelo mutacional que principalmente ocurre debido a carcinógenos químicos, físicos o biológicos que inician la patología generando daño en el DNA⁶; el modelo de origen de la carcinogénesis mediado por inestabilidad genómica, que engloba al conjunto de cambios genéticos ocurridos durante el proceso carcinogénico, y que estos cambios son acumulativos generando alteraciones en todo el genoma a distintos niveles, desde nucleotídico hasta cromosómico acelerando así el proceso carcinogénico^{6,7}

3.2 Migración celular

La migración celular es un complejo proceso necesario para cumplir los requerimientos del organismo, tales como morfogénesis y reparación de tejidos⁸⁻¹⁰, en los últimos años se ha observado que la propiedad de las células por migrar es dada por la capacidad de polarización de la misma⁸.

La polaridad celular es la distribución asimétrica de los componentes celulares, desde proteínas hasta organelos con la finalidad de facilitar la función a realizar por dicha célula, funciones como la interacción célula-célula, la secreción de moléculas, la función tisular, la inmunidad celular, el desarrollo embrionario, la morfogénesis y la migración celular^{8,10,11}, esta polaridad celular es mediada por muchas proteínas, orquestadas por Rac, Rho y Cdc42¹² encargadas de la reorganización del citoesqueleto, esenciales para la migración celular.

La migración celular funciona mediante un proceso complejo que se ha descrito como una serie de pasos: polarización, formación de protrusiones y retracción de la célula¹⁰. En primera instancia, la polarización regulada por el complejo PAR, como Par 6, Par 3, Cdc42 y PKC^{9,10}, posteriormente inicia el acomodo del centro organizador de microtúbulos; seguido del reacomodo de los organelos celulares y la formación de protrusiones en dirección al sitio a migrar. Estas protrusiones pueden ser: lamelipodia, filopodia, protuberancias irregulares (*blebs*), e invadopodia, generalmente dirigidas por la polimerización de actina unida a la matriz extracelular (ECM) o a células cercanas a través del citoesqueleto. Estas protrusiones funcionan como sitios de anclaje para mover a la célula, en dirección al estímulo generado por la matriz extracelular. Las protrusiones se producen al incrementarse la concentración de PIP3 en un polo de la célula, este aumento debido al aumento de PI3K en el frente de avance de la célula, y de las altas concentraciones de una fosfatasa de PIP3, PTEN, junto con miosina II en las partes laterales y trasera de la célula evitando así la formación de protrusiones en estas partes¹⁰; la retracción consta de una serie de vías de señalización que desencadenan la separación de la parte posterior de la célula^{10,13} (**Figura 1**). La migración celular es uno de los eventos más importantes en la progresión del cáncer, siendo más peligrosa en tumores altamente infiltrativos como son los glioblastomas.

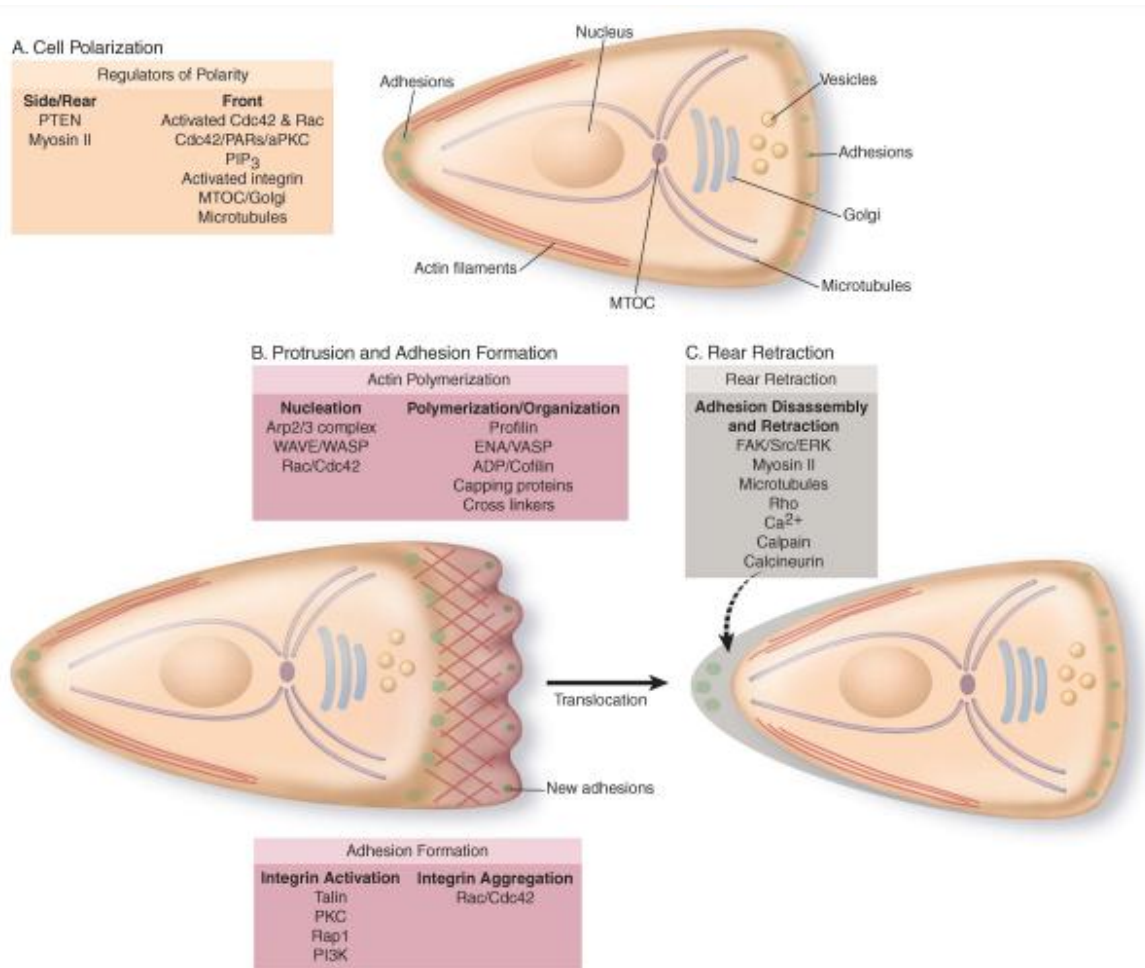


Figura 1. Pasos en la migración celular. Imagen tomada de ¹⁰. En la imagen se muestra los tres pasos de la migración celular. La polarización celular que implica la movilización de los organelos celulares y la organización del citoesqueleto; la formación de protrusiones iniciada por un gradiente de expresión de PIP₃ y la polimerización de microtúbulos; finalmente, la retracción de la célula implica liberarse de las uniones presentes en la parte posterior de la célula y así movilizarse desplazarse.

3.3 Tumores cerebrales

3.3.1 Generalidades

Un tumor cerebral es un grupo de células anormales que crece en el cerebro o alrededor de él y pueden ser benignos o malignos. Un tumor maligno, también

llamado cáncer cerebral, crece rápido y a menudo invade las áreas sanas del cerebro. Los tumores benignos no contienen células cancerosas y por lo general tienen un crecimiento lento. A nivel mundial los tumores cerebrales primarios, es decir que se originaron en el SNC, se reportan 5.47 casos por cada 100,000 personas en niños de 0 a 14 años, siendo el cáncer más frecuente a estas edades y de 40.10 habitantes en personas mayores de 40 años de cada 100,000 al año anualmente, presentando una mayor incidencia en hombres que en mujeres, así como en países desarrollados¹⁴.

Los tumores cerebrales se clasifican según sus características histológicas y moleculares. Para categorizarlos la OMS, se basó en la histología tumoral que se desarrolló en 1979 y fue revisada en 1999, 2007 y 2016¹⁵, clasificándolos en:

- Tumores de tejido neuroepitelial o gliomas, que son tumores derivados de las células gliales astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias
- Tumores embrionarios que incluyen meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNETs) y el tumor rabdoide teratoide atípico
- Gangliomas, gangliocitomas, gangliocitoma displásico de cerebelo liponeurocitomas cerebelosos, neurocitomas centrales y paragangliomas
- Tumores de la región selar (craneofaringioma)
- Tumores de los nervios craneales y paraespinales (schwanoma), tumores malignos de la vaina del nervio periférico; tumores germinales como el coriocarcinoma, carcinoma, teratoma, tumores del seno endodérmico
- Tumores de meninges, que incluyen a los meningiomas, a los linfomas y a las neoplasias hematopoyéticas primarias del SNC¹⁵.

De estos tumores, los gliomas son los más frecuentes y agresivos y con una alta tasa de mortalidad¹⁶, y sus células se caracterizan por su alta capacidad de proliferación, migración e invasión.

3.3.2 Astocitomas

Los gliomas se clasifican en: astrocitomas, que representan el 75%; oligodendrogliomas que se observa en un 10-30% de los casos y ependimomas que son menos del 10% del total de los casos de gliomas¹⁴. De estos, los astrocitomas se dividen en 4 grados, dependiendo de sus características histopatológicas:

- 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. Este grado de tumor pueden ser eliminados si se remueven quirúrgicamente. La sobrevida del paciente es de 11 a 15 años^{16,17}.
- 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^{16,17}.
- 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 cortos¹⁵. 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^{16,17}.

3.3.3 Glioblastoma

- Los astrocitomas de grado IV o Glioblastomas (GBM) es el tumor más agresivo y frecuente de todos los tumores cerebrales (60%) y con una esperanza de vida de 14 a 16 meses, con una incidencia anual de 7 personas por cada 100 000 en adultos de entre 55 y 60 años y con una incidencia mayor en hombres en una proporción de 3:2 con relación a las mujeres.

Presentan una proliferación celular descontrolada, alta infiltración, propensión a la necrosis, angiogénesis robusta, resistencia a la apoptosis e inestabilidad genómica además de ser resistentes a la quimio y radioterapia¹⁶.

Los GBM se subdividen en primarios y secundarios, se le denomina primario si su origen es *de novo* y no proviene de otro grado preexistente, en caso de que provenga de otro grado es denominado tumor secundario¹⁸. Recientemente se han encontrado algunas relaciones entre esta clasificación y algunas alteraciones genéticas, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la sobre-expresión del regulador negativo del gen supresor de tumores p53, MDM2, la delección del regulador del ciclo celular p16 y modificaciones en PTEN en GBM primarios; y la sobre-expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRa), y la reguladora del ciclo celular, la proteína del Retinoblastoma (RB), entre otras modificaciones^{18,19}. De igual forma, análisis genéticos han mostrado que existen desregulaciones en receptores tipo tirosina cinasa, Ras, PI3K en el

88% de los GBM, P53 en el 87% de los casos y RB en un 78% de los GBM²⁰.

Aunque los GBM no generan metástasis, este tipo de tumores son altamente infiltrativos a tejidos cercanos al tumor, generalmente el parénquima cerebral y el espacio perivascular debido a las desregulaciones en las vías de señalización involucradas con el proceso de migración e invasión celulares. El espacio perivascular, contiene cuerpos celulares neuronales y gliales, por lo que los espacios extracelulares del parénquima son estrechos y sinuosos y proporcionan una mayor resistencia física que el espacio perivascular. El espacio intersticial del parénquima contiene una matriz compuesta de proteoglicanos, hialuronano y tenascinas, las cuales promueven la migración celular^{9,21,22}.

Los síntomas presentes en esta patología son variados, dependiendo la zona en donde se genere el tumor y la necrosis tisular, pero en general suele presentarse un déficit cognitivo o problemas visuales o auditivos^{23,24}, dolor de cabeza inespecífico, en algunos pacientes acompañados con vómito generado por el aumento de la presión intracraneal debido al crecimiento del tumor y el edema alrededor de éste^{20,24}.

Actualmente se han hecho esfuerzos por obtener un tratamiento efectivo contra esta enfermedad y obtener una mejor calidad de vida para los pacientes, por desgracia, solo se ha logrado alargar un poco la esperanza de vida. El tratamiento más utilizado es la resección del tumor buscando extirpar el mayor volumen del tumor posible; sin embargo, la reincidencia del tumor en el área supera el 80% de los casos debido a la alta capacidad infiltrativa del mismo²⁵, la radioterapia suele ser el tratamiento seguido a la resección quirúrgica mostrando resultados poco favorables en tumores de alto grado²⁶. Otro tratamiento utilizado frecuentemente es la quimioterapia, específicamente agentes alquilantes del DNA como la temozolomida, carmustina y lomustina incrementando algunos meses la vida del paciente

²⁵. Debido a la poca esperanza de vida de los pacientes y la poca efectividad de los tratamientos se han buscado otros posibles tratamientos y terapias para tratar el GBM. En esta búsqueda de tratamientos y terapias, se ha iniciado el estudio hormonas esteroides, como la P₄, en esta patología.

3.4 Progesterona

La progesterona P₄ es una hormona esteroide que se sintetiza principalmente en ovarios, placenta, glándulas suprarrenales y en el SNC. Está constituida por 21 átomos de carbono formando un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno. Su síntesis puede ser *de novo* a partir del colesterol mediada por el citocromo P450 scc o a partir de precursores provenientes de la circulación siendo la pregnanolona el precursor directo²⁷. La P₄ participa en procesos como la ovulación, en el desarrollo uterino e implantación durante el embarazo, neuroprotección y conducta sexual, y la regulación del crecimiento tumoral, entre otros,²⁸⁻³⁰. Estas múltiples funciones están mediadas por distintos mecanismos moleculares.

3.4.1 Mecanismos de Acción

El mecanismo de acción clásico o genómico (**Figura 2**) es el mediado por el Receptor a Progesterona intracelular (RP) que como otros receptores hormonales, en ausencia de P₄, el receptor se mantiene en estado de gran afinidad por su ligando y está unido a chaperonas como las proteínas de choque térmico (Hsp90) y otras chaperonas. Al unirse a su ligando en el citoplasma, se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción. Cuando la P₄ une al RP se induce un cambio conformacional, su fosforilación y la liberación de las proteínas chaperonas; se dimeriza para finalmente translocarse al núcleo, donde los dímeros se unen a los elementos de respuesta a P₄ (ERP) localizados en la región promotora de sus genes blanco^{31,32}.

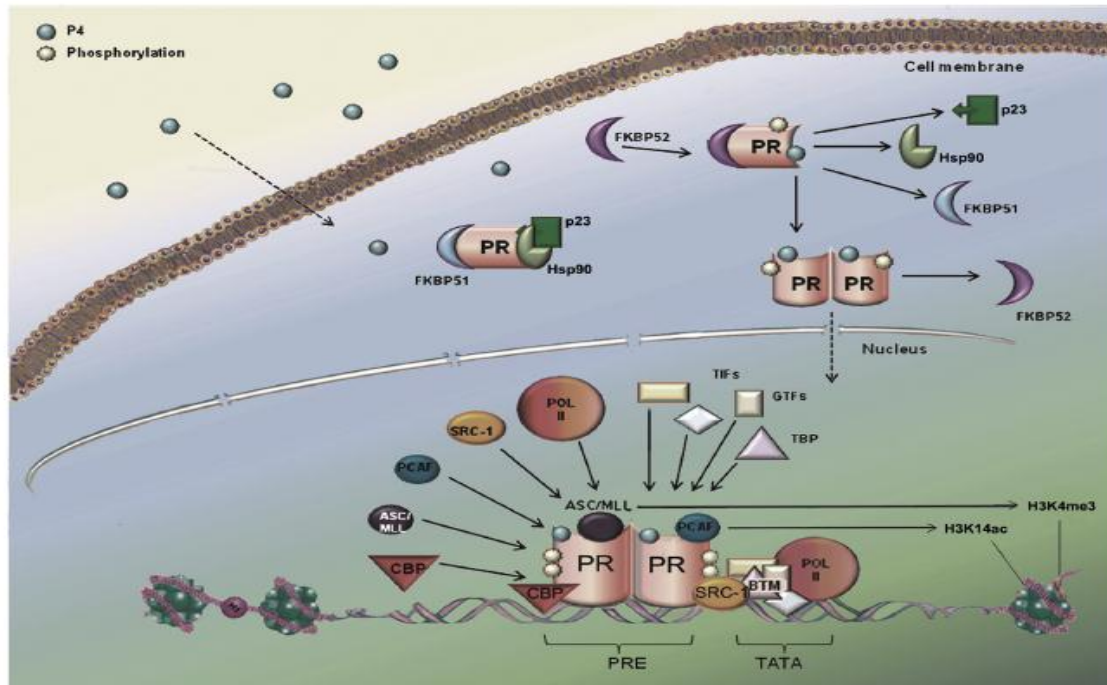


Figura 2. Mecanismo de acción clásico o genómico de la P₄. Imagen tomada de³¹. El RP se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (hsp). La P₄ atraviesa la membrana plasmática, interactúa con el RP, se liberan las hsp, el receptor se fosforila, se dimeriza y se transloca al núcleo, se une a elementos de respuesta a progesterona (ERP) y recluta a correguladores y a la maquinaria basal de transcripción.

Se ha reportado que hay receptores a hormonas esteroides que inducen efectos que no necesitan actividad transcripcional, y a estos mecanismos se les llaman rápidos, no clásicos o no genómicos (**Figura 3**) por su rápida acción, que va de segundos a minutos y por ocurrir independientemente de la síntesis de proteínas o de RNAm. Estos mecanismos no genómicos son mediados principalmente por la activación de la adenilato ciclasa, la proteína cinasa Activada por mitógenos (MAPKs) y la PI3K, así como el incremento de segundos mensajeros y el aumento de calcio intracelular³¹.

En el caso de la P₄, se ha observado recientemente que estos efectos son mediados en gran medida por los receptores membranales a Progesterona (mRP)s.

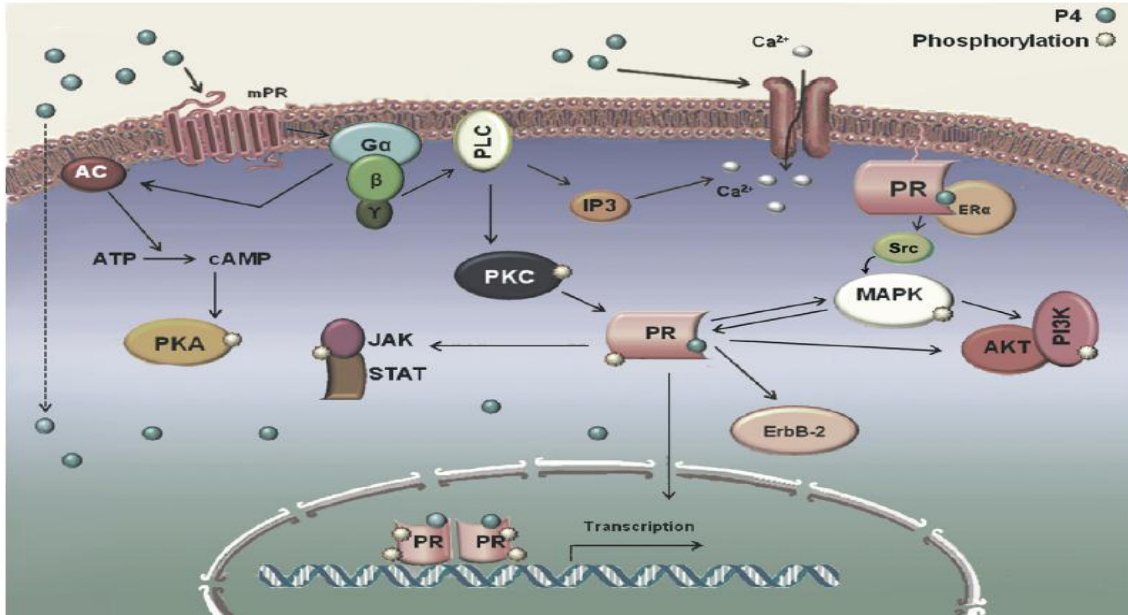


Figura 3. Mecanismo de acción no clásico o no genómico de la P₄. Imagen tomada de³¹ en membrana plasmática se encuentran receptores mRPs y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares mRPs, Proteínas G, Subunidades de la proteína G ($\alpha\beta\gamma$); Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), Proteína Cinasa A (PKA), Calcio (Ca), Proteína Cinasa Activada por Mitógeno (MAPK), Cinasa de MAPK (MEK), Cinasa de Inositol Trisfosfato (P13K); Fosfolipasa C(PLC), Diacilglicerol (DAG), Proteína Cinasa C (PKC); Inositol Trisfosfato (IP3).

3.5 Receptores membranales a Progesterona (mRPs)

3.5.1 Generalidades

Los efectos no genómicos de la P₄ son mediados principalmente por dos tipos de receptores, los Receptores membranales a Progesterona (mRPs) y los Componentes del Receptor membranaral a Progesterona (PGRMC), que recientemente se comenzaron a estudiar para entender mediante qué mecanismos la P₄ ejerce sus efectos.

Análisis de las secuencias de los mRPs han mostrado que dichas proteínas pertenecen a una grande y conservada familia con ancestría presente desde eubacterias, denominadas familia de receptores a progestinas y adiponectina Q

(PAQR), nombrada así por los primeros ligandos descritos que se unían a ellas³³. Esta familia de acuerdo a su estructura y a los ligandos que se unen a los receptores, se divide en tres clases: la Clase I, relacionada con la adiponectina; la Clase II, relacionada con mRPs; y la Clase III, relacionada con la Hemolisina III³³.

Existen 11 genes de la familia de los PAQRS presentes en humanos. De la Clase I se encuentran el PAQR1 (adipoR1), PAQR2 (adipoR2), PAQR3 y PAQR4; pertenecientes a la clase II se encuentran 5 genes presentes solo en vertebrados subdividido en dos grupos, uno PAQR7 (mRP α) y PAQR8 (mRP β), y el otro formado por PAQR5 (mRP γ), PAQR6 (mRP δ) y PAQR9 (mRP ϵ); y finalmente la Clase III formado por el PAQR10 y PAQR11³⁴.

La principal característica de la familia de los PAQRS mostrada en análisis *in silico* es la presencia de 7 dominios transmembranales y tres regiones conservadas: el primer motivo conservado pertenece al primer Dominio Transmembranal (DTM) y tiene una secuencia consenso PxnGYRxnEx2Nx3H (P: Prolina, G: Glicina, Y: Tirosina, R: Arginina, E: Ácido Glutámico, N: Asparagina, H: histidina, x: Cualquier aminoácido, n: Número de veces), el segundo dominio conservado se localiza desde el final del segundo DTM al principio del tercer dominio presentando la secuencia Sx3HxnD (S: Serina, H: Histidina, D: Ácido Aspártico, x: Cualquier aminoácido, n: Número de veces), y la tercera región conservada se encuentra en la asa anterior al séptimo DTM con la secuencia PEx3PGxnHQx2H (P: Prolina, E: Ácido Glutámico, G: Glicina, H: Histidina, Q: Glutamina, x: Cualquier aminoácido, n: Número de veces)³⁴ **(Figura 4)**.

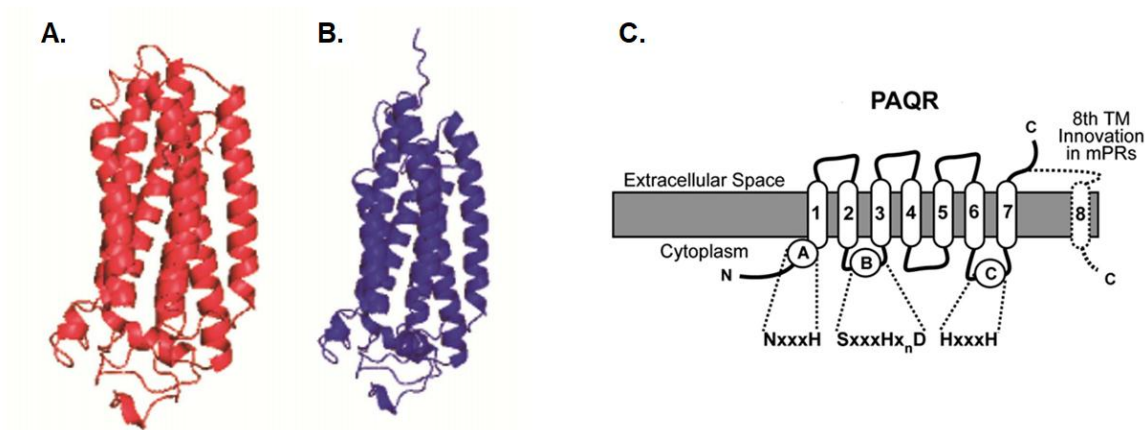


Figura 4: A) Estructura teórica del mRP α ; B) Estructura teórica del mRP β C) Modelo teórico de los 7 dominios transmembranales de los receptores a progestinas y adiponectina Q (PAQRs). Se muestran los DTM, así como los aminoácidos muy conservados en la familia de los PAQR Imagen modificada de ^{34,35}.

Con respecto a la Clase II de la familia de PAQRs existe una controversia, ya que estudios han mostrado que esa clase difiere de las Clases I y III en la posición de los extremos amino y carboxilo terminal, encontrándose el amino extracelular y el carboxilo intracelular, generando la teoría de que los mRPs son similares a las GPCRs, siendo este el modelo más aceptado a la fecha^{33,35}, aunque otros trabajos muestran que los mRPs α y δ podrían tener 8 DTM³⁴ (**Figura 5**).

Los genes que codifican a los distintos mRPs se encuentran localizados en distintos cromosomas y están formados entre 330 y 370 aminoácidos. Los mRPs α , β y ϵ poseen solamente un exón, mientras que el mRP γ y mRP δ , 7 exones³⁵

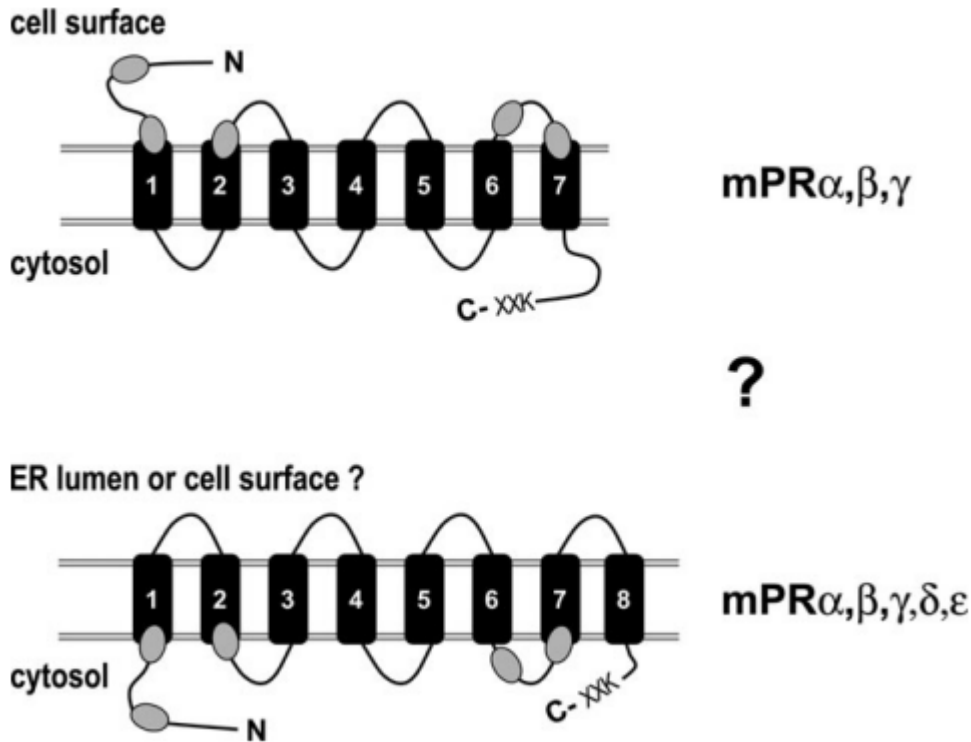


Figura 5. Posibles estructuras topológicas de los mRPs, miembros de la familia PAQR. Tomado de ³⁶. Los óvalos grises esquematizan las posiciones de los residuos altamente conservados.

3.5.2 Expresión, regulación y función de los mRPs

Como se mencionó, en humanos existen 5 subtipos de mRPs, se sabe que tienen una alta afinidad por la P_4 ($K_d = 5$ nM), así como una baja afinidad por agonistas y antagonistas del receptor intracelular, como el R5020 ($K_d = 10$ μ M) y el RU486 ($K_d = 8$ μ M)^{35,37,38}.

La expresión de los subtipos de mRPs en humanos ha mostrado una distribución diferencial en distintos tejidos, encontrando predominancia del mRP α en tejido reproductor, mRP β en sistema nervioso y mRP γ en riñón y tracto digestivo^{35,38}; mientras que la distribución de los otros subtipos de mRPs no se conoce completamente. Pang y colaboradores estudiaron la expresión de todos los subtipos de mRPs en sistema nervioso central, encontrando alta expresión del poco conocido mRP δ , en distintas zonas incluyendo el prosencéfalo, el

hipotálamo, la amígdala, el cuerpo calloso y la médula espinal, mientras que el mPR ϵ era abundante en la pituitaria e hipotálamo³⁸

Los mRPs participan en procesos reproductivos, neuroendócrinos, así como en el sistema inmune y en procesos patológicos como el cáncer. En cuestiones reproductivas, se ha sugerido la actividad de los mRPs en la hiperactivación del espermatozoide, en funciones como motilidad, capacitación y quimiotaxis así como promoción de la reacción acrosomal asociándose principalmente al mRP α ^{35,39}. Además, se ha demostrado que la hipermotilidad del espermatozoide es mediada a través de la vía PI3K / AKT, utilizando un agonista de los mRPs (Org OD 02-0)⁴⁰; De igual manera se ha encontrado una relación entre la expresión de los mRPs principalmente el α y el β en el embarazo, aumentando en este proceso su expresión. Se han asociado con otros procesos como la implantación, la gestación y el desarrollo fetal⁴¹.

Las funciones de los mRPs en el SNC son prácticamente desconocidas, pero trabajos han mostrado que mediante vías no genómicas la P₄ regula el transporte de iones así como la liberación de neurotransmisores, activación de cinasas y fosforilación de AKT⁴²⁻⁴⁵; en el sistema inmune, la P₄ (en células que no expresan RP) influye en procesos entre los que destacan la producción de citocinas, cambios en el transporte de iones e inhibición de la producción de óxido nítrico, por lo que estos efectos se atribuyen a los mRPs. A la fecha la expresión de mRPs se ha confirmado en macrófagos y linfocitos T, y de estos últimos se ha demostrado que la P₄ influye en la activación de proteínas G inhibitoras⁴⁶, de igual forma regula el calcio intracelular y modifica el pH²⁹.

La P₄ ha mostrado tener efectos importantes en ciertos tipos de cáncer como de mama, ovario y recientemente en sistema nervioso^{30,47,48}, razón por la cual ha sido ampliamente estudiada en mama y ovario, de esta forma se ha asumido que las funciones que la P₄ promueve son mediadas por el RP, incluso la tasa de expresión de las isoformas del RP se ha relacionado con la incidencia, el pronóstico y el éxito de la terapia contra el cáncer³⁰, pero esto no es del todo

cierto, ya que se desconoce en gran medida las funciones y los mecanismos no genómicos en estos tipos de cáncer. Se ha encontrado la expresión de distintos mRPs en cáncer de mama^{49,50}, ovario^{51,52} y gliomas³⁵.

En las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 de cáncer de mama se encontró que mPR α , mPR β y mPR γ se expresan, siendo mPR α el subtipo que más se expresa en ambas⁴⁹, de igual manera se ha visto en cáncer de mama un aumento en la expresión de mPR α en comparación al tejido sano, lo que podría indicar tener un papel en este tipo de cáncer; de igual forma se ha visto presencia de mRPs en tumores que no expresan RP^{49,53,54}, como en las células de fenotipo basal de cáncer de mama (BPBC). Se ha demostrado que el mPR α disminuye el contenido de proteínas *snail* y fibronectina e incrementa la expresión de E-cadherina y ocludina, mostrando así que la P₄ regula la transición epitelio-mesénquima (MET) mediante una vía no genómica en la línea celular MD-MB-468 BPBC^{35,55} **(Figura 6)**.

Otro estudio mostró que el mPR α y el mPR β participan en el proceso de desdiferenciación celular de la línea no cancerosa de glándula mamaria (MCF10A), que no expresa el RP, a células troncales cancerosas (CSCs) CD44+/CD24- mediada por la vía P13K/Akt inactivando la transcripción de FOXO, e incrementando la expresión de *snail* y *slug*, esenciales para la MET⁵⁶. Igualmente se ha relacionado a pacientes con clasificación TNM de cáncer de mama inferiores a 4 con una alta expresión de mPR α , y una expresión inferior de mPR α en pacientes con la etapa TNM 4. Además, se ha descrito una correlación negativa entre la expresión de mPR α y el receptor a estrógenos (ER), mientras que una relación positiva entre la expresión de mPR α y HER2, lo que sugiere que mPR α es un buen candidato como un nuevo biomarcador para el cáncer de mama⁵⁷.

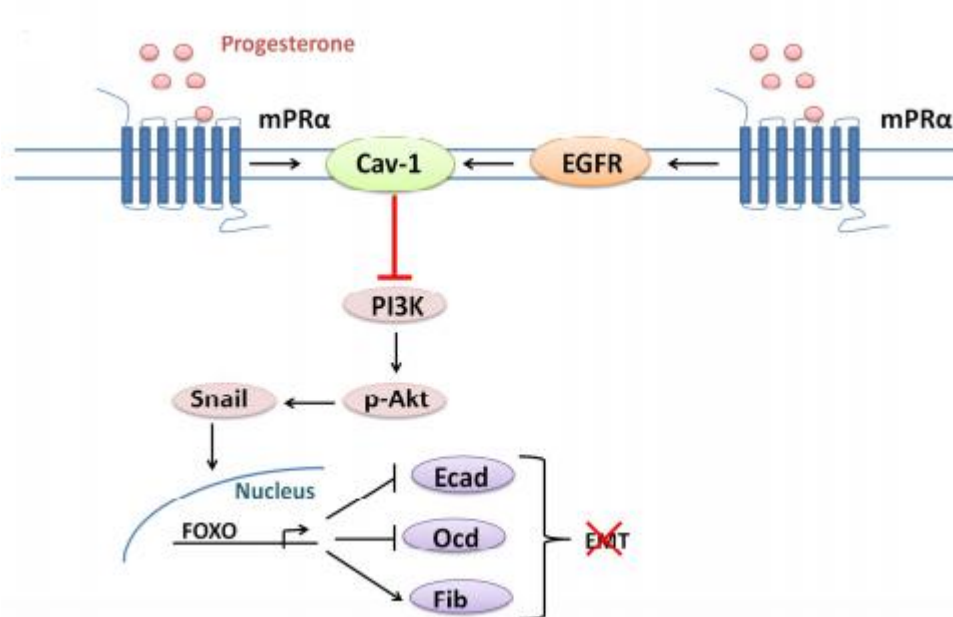


Figura 6. mPR α reduce la MET en células de fenotipo basal de cáncer de mama (BPBC), mediante la inactivación de la vía de PI3K/AKT via EGFR o Cav-1. Imagen tomada de³⁵.

En cáncer de ovario se observó que la P₄ aumenta la producción de cAMP y la fosforilación de JNK1/2 y p38 en células SK-OV-3, mediado a través de una vía no genómica, probablemente a través del mPR α ⁵¹, de igual forma se ha encontrado al mPR α presente en células HeLa de cáncer cervical⁵⁸ y los mPR α , mPR β y mPR γ se han encontrado en muestras de tejidos de cáncer de ovario humano⁵².

4. Antecedentes

En biopsias de pacientes con astrocitomas se ha reportado que la expresión del RP se ve aumentada en relación al aumento de grado de malignidad de estos tumores, por lo que se comenzó a estudiar a la P₄ como un factor importante en la progresión de los astrocitomas^{59,60}; de igual manera, se ha reportado que durante el embarazo pacientes con astrocitomas sufrían un crecimiento más rápido que luego disminuía al término del mismo, asumiéndose que es causado por las altas concentraciones de P₄ que hay durante el embarazo, de igual manera se ha reportado aumento en el grado de malignidad WHO en tumores del SNC durante el embarazo⁶¹⁻⁶⁴.

Se ha caracterizado el efecto de la P₄ y del RU486 (un antagonista de la P₄ que compite por el sitio de unión al RP) en el crecimiento de dos líneas celulares (U373 y D54) derivadas de astrocitomas humanos de grados III y IV, demostrando que el tratamiento con P₄ (10 nM) incrementó el número de células y la tasa de proliferación en ambas líneas celulares; mientras que el tratamiento con un antagonista del RP, el RU486 (10 nM), bloqueó parcialmente el efecto de la P₄, sugiriendo que el efecto de la P₄ está mediado en parte por el RP⁴⁷.

En estudios "in vivo" se demostró que la P₄ incrementa la infiltración de células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata, efecto que fue bloqueado también parcialmente por el RU486⁴⁸, estos datos apuntan a que la P₄ podría tener efectos en estos tumores mediante un mecanismo no genómico, de igual manera se ha reportado recientemente que el PAQR3 un receptor de la familia de los mRPs regula la migración y la invasión en células U251 de glioblastoma, mostrando que este receptor se encuentra sub expresado en estos tumores, pero al sobre expresarlo se reduce la expresión de marcadores de MET y disminuye los niveles de PI3K y Akt fosforilado⁶⁵.

Se ha demostrado la expresión de los subtipos mRP α , mRP β y mRP γ tanto a nivel de RNAm como de la proteína en el citoplasma y principalmente en la membrana celular, en líneas celulares de glioblastomas humanos U87 y U251. Se encontró una mayor expresión del mRP β , y también se observó que los tratamientos con P₄ y estradiol (10 nM, 100 nM y 1 μ M) a las 12 horas incrementan la expresión del mRP β y disminuyen la de mRP α ⁶⁶,

5. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que la P_4 promueve la proliferación, migración e invasión de células derivadas de glioblastomas humanos por medio de su vía clásica (RP) y que el tratamiento con su antagonista mifepristona (RU486) bloquea solo parcialmente dichos efectos. Por lo que la P_4 podría influir en estos procesos mediante otros mecanismos. Con el reciente hallazgo sobre 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 el papel que juegan los mRPs en la migración de las células U251 y U87 derivadas de un glioblastoma humano.

6. Hipótesis

La activación de los mRPs promoverá la migración en células derivadas de GBM humanos.

7. Objetivos

7.1 Objetivos generales

Evaluar el papel de los receptores membranales a P_4 (mRPs) en la migración de células derivadas de glioblastomas humanos.

7.2 Objetivos particulares

- Conocer el efecto del agonista de los mRPs (ORG OD-02-0) en la migración de las líneas celulares U87 y U251.
- Estudiar si el efecto del agonista de los mRPs en la migración de células derivadas de un GBM humano es dependiente de la concentración.

8. Metodología

8.1 Cultivo celular y tratamientos

Para cumplir los objetivos de esta tesis, 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).

8.2 Migración

Para determinar el efecto del agonista sobre la migración de las células U251 y U87, se utilizó el ensayo de "Scratch", que consiste en hacer una "herida" en una monocapa de células y evaluar el número de células que migran a ésta en una unidad de tiempo. Para realizar el ensayo se contaron, mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer), 300,000 células que fueron sembradas en cajas de 6 pozos. Al alcanzar una confluencia del 80-90%, se realizó un surco en la monocapa de células con una punta de pipeta desechable de 200 µL. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS para eliminar a las células desprendidas y a continuación se colocaron 2 mL de medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB sin hormonas y se adicionó el inhibidor de la síntesis de DNA: clorhidrato de citosina β-D-arabinofuranósido (Ara-C, 10 µM). Las células se incubaron con el Ara-C durante 1 hora a 37°C y sin retirar el medio se adicionaron los tratamientos. Se tomaron fotografías con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X de la zona de "Scratch" a las 0, 3, 6, 12 y 24 horas. De cada imagen se contó el número de células que migraron hacia la zona del surco utilizando el programa Image J.

8.3 Análisis estadístico

Se utilizó una ANOVA de dos vías, seguido 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

La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos de migración en la línea celular U251 usando el agonista Org OD-02-0 (10 nM y 100 nM), la concentración a 100 nM muestra una diferencia significativa a las 3 horas con respecto al vehículo y otra a las 24 horas; la concentración 10 nM iguala la migración de la concentración 100 nM a las 24 horas mostrando que al activar los mRPs se induce la migración celular y que además basta con la concentración de 10 nM para alcanzar este efecto.

La Figura 8 muestra los resultados de los ensayos de migración usando el agonista Org OD-02-0 (10 nM y 100 nM) en la línea celular U87. Se encontró un incremento significativo a partir de las 12 horas en ambas concentraciones, resultados similares a los observados en la línea celular U251 ya que la concentración 10 nM del agonista provocó un resultado similar a la concentración de 100 nM.

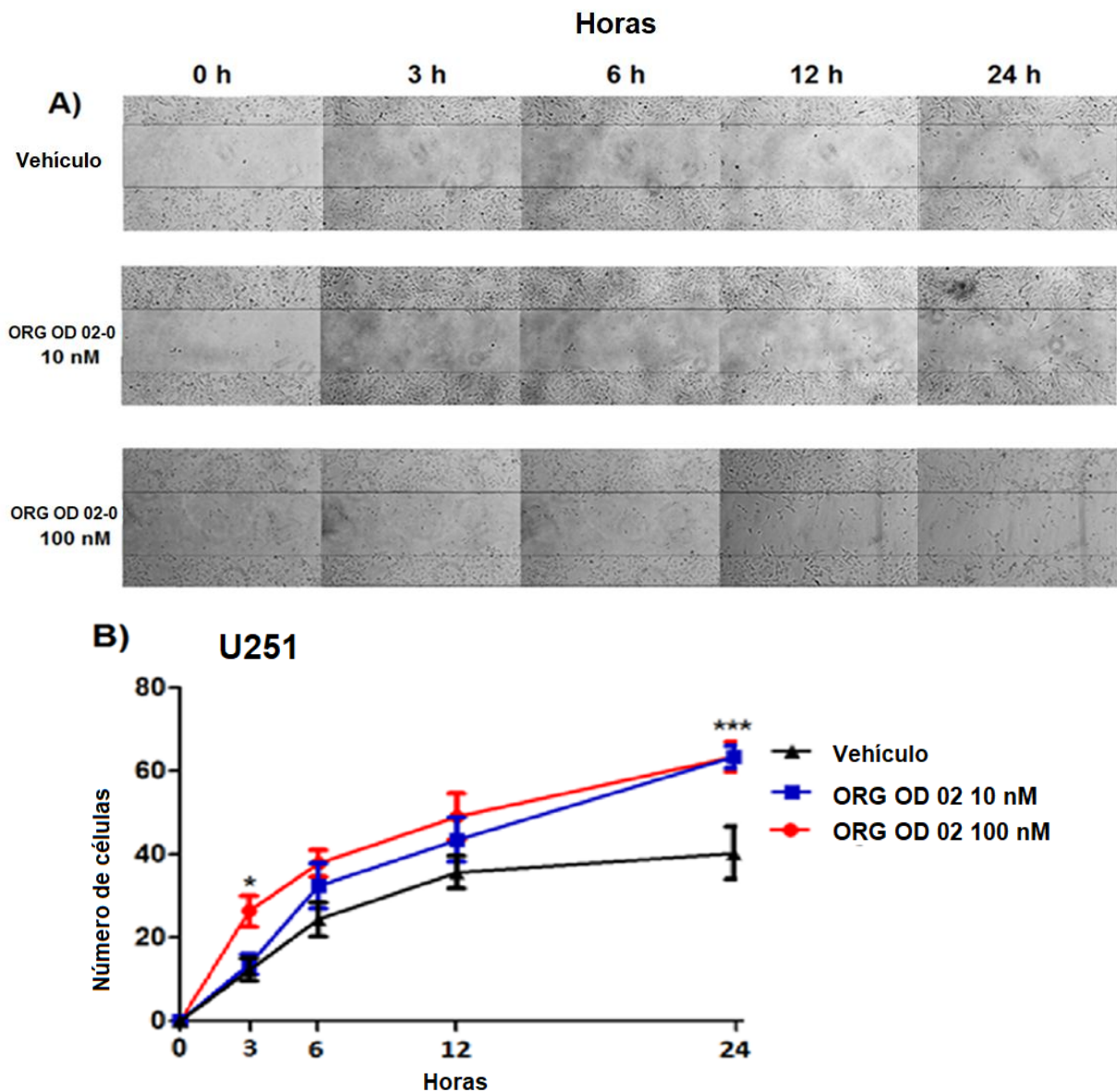


Figura 7. Los efectos del agonista de mPRs OD 02-0 sobre la migración de células U251. Las células se trataron con vehículo (V, DMSO al 0,01%) y Org DO 02-0 (10 y 100 nM) durante 24 h y se realizó un ensayo de “scratch”. Se añadió Ara-C durante 1 h antes de los tratamientos y las imágenes se tomaron a las 3, 6, 12 y 24 h. A) Imágenes representativas del ensayo de herida en células U251. B) El gráfico representa el número de células U251 migratorias en el

área de la herida en el momento dado del tratamiento. El dato representa la media \pm S.E.M. - n= 3; *p< 0.05 y ***p< 0.001 vs vehículo.

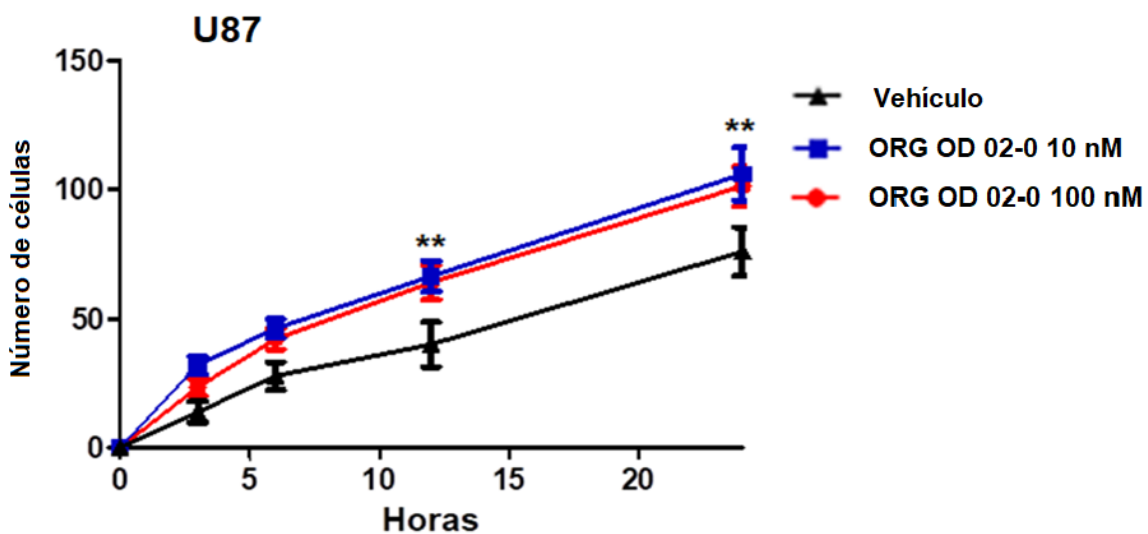
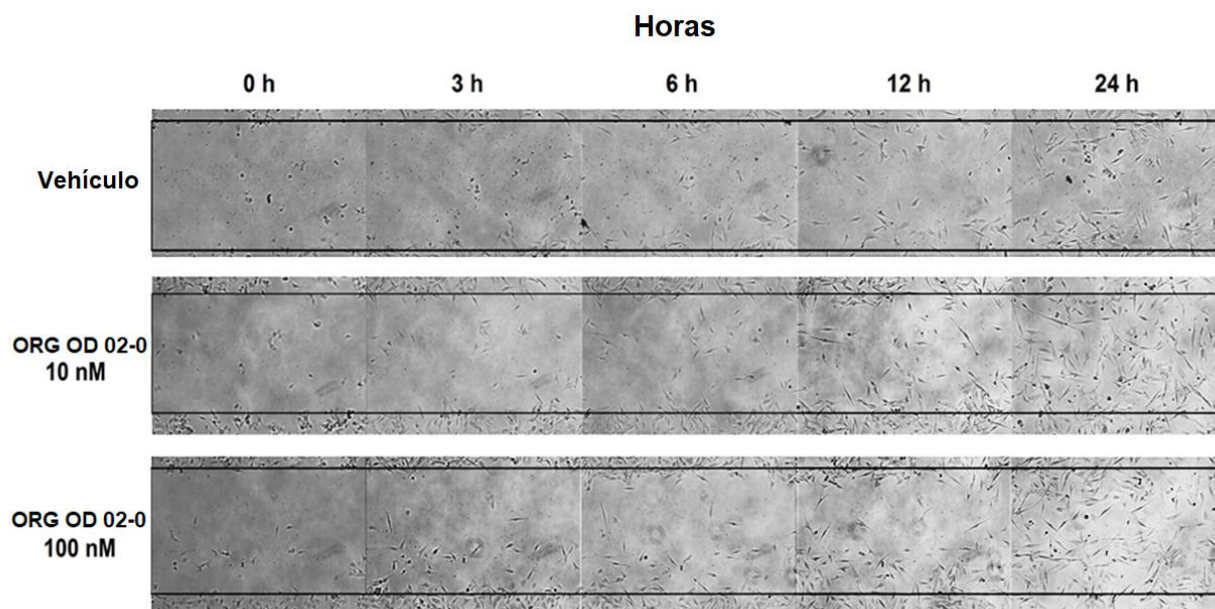


Figura 8. Los efectos del agonista de mPRs OD 02-0 sobre la migración de la línea celular U87. Las células se trataron con vehículo (V, DMSO al 0,01%) y Org DO 02-0 (10 y 100 nM)

durante 24 h y se realizó un ensayo de “scratch”. Se añadió Ara-C durante 1 h antes de los tratamientos y las imágenes se tomaron a las 3, 6, 12 y 24 h. A) Imágenes representativas del ensayo de herida en células U87. B) El gráfico representa el número de células U87 migratorias en el área de la herida en el momento dado del tratamiento. El dato representa la media \pm S.E.M. n= 3; *p< 0.05 and **p< 0.01vs vehículo

10. Discusión

El astrocitoma grado IV o Glioblastoma es el tipo de tumor más común y agresivo en el SNC, debido a su alta capacidad de infiltración, migración e invasión al tejido adyacente^{18,23–25}, razón por la cual la resección quirúrgica total es prácticamente imposible y por ende la reincidencia tumoral es común, disminuyendo la efectividad de los tratamientos y la sobrevida del paciente^{18,23,24}. Se han asociado diversos factores moleculares a la progresión de este tipo de tumores, entre ellos la P₄^{60,66,67}

Se ha observado que la P₄ (10 nM) promueve la migración, invasión y proliferación en líneas celulares de astrocitomas en modelos *in vitro* como *in vivo* mediante el mecanismo clásico^{47,48,68}, pero de igual forma el uso del antagonista del RP, RU486, solo inhibe parcialmente los efectos encontrados, abriendo la posibilidad de que estos procesos puedan ser mediados por mecanismos no clásicos^{47,48,68}, mediados por los mRPs, que ya se han reportado que se expresan en las líneas celulares U87 y U251^{35,66}, derivadas de glioblastomas humanos que se ocuparon en esta tesis.

Sabiendo que existe la expresión de al menos tres subtipos de mRPs (mRP α , mRP β y mRP γ)^{35,66} y resultados en nuestro laboratorio sin publicar muestran la presencia de los otros subtipos a nivel de RNAm, en la presente tesis se estudió el papel de los mRPs en la migración de las líneas celulares U87 y U251, para lo cual se utilizó a un agonista de los mRPs, el Org OD-02-0 a dos concentraciones 10 nM y 100 nM, y así 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 esta tesis se demuestra que se puede inducir migración celular en las líneas U251 y U87 por medio de mecanismos no genómicos, usando el agonista Org OD 02-0 específico de los mRPs, pero se desconoce mediante qué mecanismos. Se ha reportado una relación entre la expresión del mRP α y la fosforilación de Akt y la activación de la MMP9 en biopsias de cáncer de mama⁶⁹. La activación de la vía PI3K/Akt es una de las vías más comunes activas en tumores incluyendo gliomas²⁰ y la fosforilación de Akt está relacionada con proliferación, supervivencia, migración y promoción de la MET. Tang y colaboradores demostraron que el PAQR 3, un receptor de la misma familia de los mRPs, reduce la fosforilación de PI3K y de Akt en células U251 e incrementa la expresión de E cadherina favoreciendo las uniones célula-célula disminuyendo la migración celular⁶⁵; de acuerdo a los resultados obtenidos los mRPs tienen un efecto opuesto al PAQR 3. Valdría la pena evaluar los niveles de Akt fosforilado, así como marcadores de MET y de uniones celulares usando el agonista Org OD 02-0 y silenciando los subtipos de los mRPs y así saber el mecanismo y cual subtipo de mRP la P₄ regula la migración celular.

11. Conclusión

- La activación de los mRPs mediante el agonista Org OD 02-0 induce la migración de las líneas celulares U251 y U87 derivadas de GBM humanos.

12. Referencias

1. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Published 2017.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Lyon, France:

- International Agency for Research on Cancer. doi:10.1016/j.ucl.2013.01.011.
3. Fidler IJ. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res.* 1978;38(9):2651-2660. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1330.
 4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
 5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
 6. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: An overview. *Carcinogenesis.* 2010;31(10):1703-1709. doi:10.1093/carcin/bgq087.
 7. Rozhok AI, DeGregori J. The Evolution of Lifespan and Age-Dependent Cancer Risk. *Trends in Cancer.* 2016;2(10):552-560. doi:10.1016/j.trecan.2016.09.004.
 8. Dow LE, Humbert PO. Polarity Regulators and the Control of Epithelial Architecture, Cell Migration, and Tumorigenesis. *Int Rev Cytol.* 262. doi:10.1016/S0074-7696(07)62006-3.
 9. Etienne-Manneville S. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene.* 2008;27:6970-6980. doi:10.1038/onc.2008.347.
 10. Ridley AJ. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science (80-).* 2003;302(5651):1704-1709. doi:10.1126/science.1092053.
 11. Christopher V. Carman. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by “invadosome-like protrusions.” *J Cell Sci.* 2009;122:3025-3035. doi:10.1242/jcs.047522.
 12. Charest PG, Firtel RA. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J.* 2007;401:377-390. doi:10.1042/BJ20061432.
 13. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell.* 2011;145(7):1012-1022. doi:10.1016/j.cell.2011.06.010.
 14. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl_5):v1-v75. doi:10.1093/neuonc/now207.

15. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
16. Burnet NG, Lynch AG, Jefferies SJ, et al. High grade glioma: Imaging combined with pathological grade defines management and predicts prognosis. *Radiother Oncol.* 2007;85(3):371-378. doi:10.1016/j.radonc.2007.10.008.
17. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2(9):494-503. doi:10.1038/ncpneuro0289.
18. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, et al. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(1):25-41. doi:10.1007/s00005-012-0203-0.
19. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
20. Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri S et al. AN (2015) 129: 829. doi:10.1007/s00401-015-1432-1. Glioblastoma : pathology , molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015. doi:10.1007/s00401-015-1432-1.
21. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-454. doi:10.1038/nrc822.
22. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(7):455-465. doi:10.1038/nrn3765.
23. Pekny M, Pekna M, Messing A, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):323-345. doi:10.1007/s00401-015-1513-1.
24. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(1):3-9. doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
25. Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life.* 2009;2(4):386-393.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

26. Scott J, Tsai YY, Chinnaiyan P, Yu HHM. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;81(1):206-210. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.04.033.
27. Schumacher M, Guennoun R, Robert F, et al. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res*. 2004;14 Suppl A(4):S18-S33. doi:10.1016/j.ghir.2004.03.007.
28. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, et al. Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(2):313-339. doi:10.1016/j.yfrne.2008.02.001.
29. Barrera D, Avila E, Díaz L. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Rev Investig Clin*. 2007;59(2):139-145.
30. E. C-M, O.T. H-H. Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(13):1663-1667. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=362083361>.
31. Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez ER, Cerbón M. Mechanism of Progesterone Action in the Brain. In: Pfaff D., Joëls M, eds. *Hormones, Brain, and Behavior*. 3rd editio. ; 2017:181–214.
32. Mani SK, O'Malley BW. Mechanism of progesterone receptor action in the brain. In: *Hormones, Brain and Behavior Online*. ; 2010:1467-1504. doi:10.1016/B978-008088783-8.00045-0.
33. Tang YT, Hu T, Arterburn M, et al. PAQR Proteins: A Novel Membrane Receptor Family Defined by an Ancient 7-Transmembrane Pass Motif. *J Mol Evol*. 2005;61(3):372-380. doi:10.1007/s00239-004-0375-2.
34. Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, et al. Heterologous expression of human mPR α , mPR β and mPR γ in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*. 2008;73(11):1160-1173.

doi:10.1016/j.steroids.2008.05.003.

35. Valadez-Cosmes P, Vázquez-Martínez ER, Cerbón M, Camacho-Arroyo I. Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;434:166-175. doi:10.1016/j.mce.2016.06.027.
36. Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2009;15(1):119-138. doi:10.1093/humupd/dmn044.
37. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(5):2237-2242. doi:10.1073/pnas.0436133100.
38. Pang Y, Dong J, Thomas P. 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.* 2013;154(1):283-295. doi:10.1210/en.2012-1772.
39. Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1-2):39-46. doi:10.1016/j.mce.2009.02.006.
40. Harper C V., Barratt CLR, Publicover SJ. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem.* 2004;279(44):46315-46325. doi:10.1074/jbc.M401194200.
41. Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, et al. Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J Endocrinol.* 2005;187(1):89-101. doi:10.1677/joe.1.06242.
42. Balasubramanian B, Portillo W, Reyna A, et al. Nonclassical mechanisms of progesterone action in the brain: I. Protein kinase C activation in the hypothalamus of female rats. *Endocrinology.* 2008;149(11):5509-5517. doi:10.1210/en.2008-0712.
43. Balasubramanian B, Portillo W, Reyna A, et al. 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*. 2008;149(11):5518-5526. doi:10.1210/en.2008-0713.

44. Hwang J yeon, Duncan RS, Madry C, Singh M, Koulen P. Progesterone potentiates calcium release through IP3 receptors by an Akt-mediated mechanism in hippocampal neurons. *Cell Calcium*. 2009;45(3):233-242. doi:10.1016/j.ceca.2008.10.006.
45. Frye CA. The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. In: *Brain Research Reviews*. Vol 37. ; 2001:201-222. doi:10.1016/S0165-0173(01)00119-9.
46. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, et al. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol*. 2008;196(1):67-77. doi:10.1677/JOE-07-0317.
47. González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*. 2007;32(2):129-135. doi:10.1007/s12020-007-9023-0.
48. Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/393174.
49. Dressing GE, Thomas P. Identification of membrane progestin receptors in human breast cancer cell lines and biopsies and their potential involvement in breast cancer. *Steroids*. 2007;72(2):111-116. doi:10.1016/j.steroids.2006.10.006.
50. Dressing GE, Alyea R, Pang Y, Thomas P. Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors. *Horm Cancer*. 2012;3(3):101-112. doi:10.1007/s12672-012-0106-x.
51. Charles NJ, Thomas P, Lange CA. Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPR/PAQR) in Ovarian Cancer Cells: Implications for Progesterone-Induced Signaling Events. *Horm Cancer*. 2010;1(4):167-176. doi:10.1007/s12672-

010-0023-9.

52. Romero-Sánchez M, Peiper SC, Evans B, et al. Expression profile of heptahelical putative membrane progesterone receptors in epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol*. 2008;39(7):1026-1033. doi:10.1016/j.humpath.2007.11.007.
53. Pang Y, Thomas P. 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*. 2011;76(9):921-928. doi:10.1016/j.steroids.2011.01.008.
54. Nutu M, Weijdegård B, Thomas P, Thurin-Kjellberg A, Billig H, Larsson DGJ. Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:89. doi:10.1186/1477-7827-7-89.
55. Zuo L, Li W, You S. Progesterone reverses the mesenchymal phenotypes of basal phenotype breast cancer cells via a membrane progesterone receptor mediated pathway. *Breast Cancer Res*. 2010;12(3):R34. doi:10.1186/bcr2588.
56. Vares G, Sai S, Wang B, Fujimori A, Neno M, Nakajima T. Progesterone generates cancer stem cells through membrane progesterone receptor-triggered signaling in basal-like human mammary cells. *Cancer Lett*. 2015;362(2):167-173. doi:10.1016/j.canlet.2015.03.030.
57. Xie M, Zhu X, Liu Z, et al. Membrane progesterone receptor alpha as a potential prognostic biomarker for breast cancer survival: A retrospective study. *PLoS One*. 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0035198.
58. Thomas P. Characteristics of membrane progesterone receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterone actions. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(2):292-312. doi:10.1016/j.yfrne.2008.01.001.
59. Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*. 1995;37(3):494-496. doi:10.1227/00006123-199509000-00019.

60. González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez a, Cerbón M a, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull.* 2001;56(1):43-48. doi:10.1016/S0361-9230(01)00590-1.
61. Pallud J, Mandonnet E, Deroulers C, et al. Pregnancy increases the growth rates of World Health Organization grade II gliomas. *Ann Neurol.* 2010;67(3):398-404. doi:10.1002/ana.21888.
62. Peeters S, Pagès M, Gauchotte G, et al. Interactions between glioma and pregnancy: insight from a 52-case multicenter series. *J Neurosurg.* 2017:1-11. doi:10.3171/2016.10.JNS16710.
63. Daras M, Cone C, Peters KB. Tumor progression and transformation of low-grade glial tumors associated with pregnancy. *J Neurooncol.* 2014;116(1):113-117. doi:10.1007/s11060-013-1261-9.
64. Pallud J, Duffau H, Razak RA, et al. Influence of pregnancy in the behavior of diffuse gliomas: clinical cases of a French glioma study group. *J Neurol.* 2009;256(12):2014-2020. doi:10.1007/s00415-009-5232-1.
65. Tang S, Gao Y, Hu W. PAQR3 inhibits the proliferation, migration and invasion in human glioma cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;92:24-32. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.046.
66. Valadez-Cosmes P, Germán-Castelán L, González-Arenas A, Velasco-Velázquez MA, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I. Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;154:176-185. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.08.006.
67. Atif F, Yousuf S, Stein DG. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;146:62-73. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.04.007.
68. Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids.* 2016;105:19-25. doi:10.1016/j.steroids.2015.11.008.

69. Wu X, Sun L, Wang X, et al. Breast Cancer Invasion and Metastasis by mPR α Through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Pathol Oncol Res.* 2015. doi:10.1007/s12253-015-0023-8.