



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS
RECEPTORES MEMBRANALES A PROGESTERONA
SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS
DERIVADAS DE UN GLIOBLASTOMA HUMANO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DANIELA FLORES VIDALS



CDMX

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Ignacio Camacho Arroyo
VOCAL: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO: Dr. Óscar Armando Pérez Méndez
1er. SUPLENTE Dra. Carolina Guzmán Arriaga
2º SUPLENTE: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM Y EN DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C VALERIA HANSBERG PASTOR

SUSTENTANTE: FLORES VIDALS DANIELA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo económico de CONACyT número 250866.

A la M. en C. Valeria Hansberg Pastor y M. en C. Paulina Valadez Cosmes de la Facultad de Química, UNAM por su apoyo técnico y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, al Dr. Marco Cerbón Cervantes y a la Dr. Óscar Pérez Méndez, por su interés al revisar y comentar esta tesis.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	4
4.1 Tumores cerebrales	4
4.1.1 Generalidades	4
4.1.2 Astrocitomas	5
4.2 Progesterona (P ₄)	8
4.2.1 Generalidades	8
4.2.2 Mecanismo de acción clásico o genómico de la P ₄	11
4.2.3 Mecanismo de acción no clásico o no genómico de la P ₄	12
4.3 Receptores membranales a P ₄ (mRPs)	14
4.3.1 Generalidades y estructura de los mRPs	14
4.3.2 Expresión y función de los mRPs	17
4.3.3 Papel de los mRPs en diferentes tipos de cáncer	19
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
6. HIPÓTESIS	22
7. OBJETIVOS	23
7.1 Objetivo general	23
7.2 Objetivos particulares	23
8. METODOLOGÍA	24
8.1 Cultivo celular	24
8.2 Tratamientos	24
8.3 Conteo celular	24
8.4 Cálculo de la viabilidad celular	25
8.5 Análisis estadístico	25
9. RESULTADOS	26
9.1 Efectos de la progesterona acoplada a albúmina sérica bovina (P ₄ -BSA) sobre el crecimiento de la línea celular U87.....	26

9.2 Efectos del agonista de los receptores membranales a progesterona (Org OD-02-0) sobre el crecimiento de la línea celular U87.....	28
10. DISCUSIÓN	30
11. CONCLUSIONES	33
12. REFERENCIAS	34

1. ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CSCs	Células troncales cancerosas
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
E	Estradiol
ERK	Cinasa activada por señal extracelular
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
Hsp	Proteína de choque térmico
IP3	Inositol trifosfato
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Cinasa de MAPK
mRPα	Receptor a progesterona membranal α (PAQR 7)
mRPβ	Receptor a progesterona membranal β (PAQR 8)
mRPγ	Receptor a progesterona membranal γ (PAQR 5)
mRPδ	Receptor a progesterona membranal δ (PAQR 6)
mRPϵ	Receptor a progesterona membranal ϵ (PAQR 9)
P₄	Progesterona
P₄-BSA	Progesterona acoplada a albúmina sérica bovina
PAQR	Familia de Receptores a Progestinas y Adiponectina Q
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PTK	Proteína tirosina cinasa
RP	Receptor intracelular a progesterona
RU486	Mifepristona, antagonista del RP

2. RESUMEN

Los glioblastomas son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano. Existen diversos factores que participan en el desarrollo de los glioblastomas, uno de ellos es la progesterona (P_4) que es una hormona esteroide que induce el crecimiento de estos tumores. La P_4 actúa en sus células blanco a través del mecanismo denominado clásico (genómico) que involucra la interacción de la hormona con su receptor intracelular (RP), el cual es un factor de transcripción activado por ligando. Sin embargo, existen efectos de la P_4 en los astrocitomas que no pueden explicarse por un mecanismo dependiente del RP. Se ha reportado que la P_4 puede interactuar con receptores de siete dominios transmembranales ubicados en la membrana plasmática (mRPs). Recientemente se caracterizó la expresión de los mRPs (en particular de las isoformas α y β) en células U87 derivadas de un glioblastoma humano y se reportó que en dichas células la P_4 y el estradiol regulan la expresión de los mismos de manera diferencial. De acuerdo a lo anterior se ha propuesto que algunas de las acciones de la P_4 en el desarrollo de los glioblastomas humanos pueden estar mediadas por los mRPs. Por lo que en este trabajo se estudió el efecto de la activación de dichos receptores en el crecimiento y proliferación de células U87 mediante la técnica de conteo celular por exclusión de azul de tripán. Para ello, se trataron a las células con dos compuestos diferentes, P_4 acoplada a albúmina sérica bovina (P_4 -BSA), la cual no puede ingresar a la célula; y el agonista específico de los mRPs (Org OD-02-0). Los resultados mostraron que el tratamiento con P_4 -BSA a la concentración de 1 nM incrementó el número de células a partir de día 3; sin embargo, no se observó el mismo efecto con las concentraciones más altas (10 nM, 100 nM y 1 μ M). Por otro lado, el Org OD-02-0 a la concentración de 10 nM mostró un aumento en el número de células en los días 2, 3 y 5 de tratamiento, mientras que a las concentraciones de 100 nM y 1 μ M mostró un efecto inductor del crecimiento celular similar al de la P_4 . Nuestros resultados sugieren que la P_4 puede actuar a través de los mRPs cuya activación puede estar involucrada en la proliferación de células derivadas de glioblastomas humanos.

3. INTRODUCCIÓN

Los gliomas son un grupo de tumores derivados de células gliales o células madre cancerosas que representan el 70% del total de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), registrándose aproximadamente 6.4 casos por cada 100 mil personas por año. Los astrocitomas representan el 60-70% de los tumores gliales [1]. El glioblastoma multiforme (astrocitoma humano grado IV) es la variante más agresiva y frecuente de los tumores astrocíticos, por lo que el valor de supervivencia media para los pacientes es corto. Estas lesiones son generalmente incurables y a pesar de los tratamientos y terapias existentes, dentro del primer año después del diagnóstico, el 90% de los pacientes fallece [2,3].

Existen estudios que sugieren a las hormonas sexuales como uno de los factores asociados al desarrollo y evolución de los astrocitomas. Se ha encontrado que la progesterona (P_4) puede estar involucrada en el crecimiento de estos tumores [4,5] a través de la interacción con su receptor intracelular (RP) y la administración de su antagonista, RU486 bloquea el efecto de P_4 [6].

No obstante, estudios recientes han demostrado que los efectos de la P_4 no sólo se llevan a cabo de manera intracelular (por medio del RP), ya que actualmente se han descubierto y caracterizado receptores membranales que responden a P_4 (mRPs) [7,8]. Estos receptores de siete dominios transmembranales se han encontrado expresados en diferentes tipos de cáncer, como el de mama, ovario y cerebro, y actualmente, se han realizado investigaciones *in vitro* que demuestran la expresión de los mRPs en células derivadas de astrocitomas humanos (grado IV, principalmente) [9]. Sin embargo, no se han descrito los efectos que los mRPs ejercen sobre estos tumores. Por lo que en este trabajo se determinó el efecto de la activación de los mRPs sobre el crecimiento de células U87 derivadas de glioblastomas humanos.

4. ANTECEDENTES

4.1 Tumores cerebrales

4.1.1 Generalidades

Los tumores cerebrales son patologías con múltiples características que surgen a partir de alteraciones en los controles moleculares de los procesos de proliferación, muerte y diferenciación celular. Dichos tumores pueden ser primarios si se originan dentro del SNC y secundarios si se originan fuera de éste y migran al mismo. En la actualidad, los tumores cerebrales se clasifican de acuerdo a un sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual fue desarrollado a partir del trabajo de los pioneros Bailey y Cushing. En este sistema se emplea el uso del sufijo “oma” después del tipo celular más parecido al de las células tumorales [10]. La tasa de incidencia anual de tumores cerebrales primarios a nivel mundial es de aproximadamente 6.4 casos por cada 100 mil individuos [11,12], de los cuales los gliomas son los más frecuentes (70%) [13], y agresivos del SNC y su tratamiento es uno de los mayores retos oncológicos ya que a pesar de los avances en la terapia, estos tumores se asocian a una elevada morbilidad y mortalidad [1].

Los gliomas son tumores que tienen características de células gliales. Se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se encuentran en el adulto y tienen una alta capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse, por lo que son candidatos potenciales a ser progenitores de tumores gliales [14,15]. También se plantea que existen células neuronales y gliales preneoplásicas, provenientes de distintas regiones del cerebro, que poseen una mayor susceptibilidad a cambios genéticos que, sumados con el microambiente y las señales de las células no neoplásicas, pueden generar un riesgo hacia el desarrollo de gliomas [16]. Asimismo, existen reportes que sugieren que las neuronas y los astrocitos maduros pueden sufrir dediferenciación en respuesta a cambios genéticos asociados a gliomas y crear un estado progenitor suficiente para iniciar la formación de estos tumores [17]. Con base en sus

características histológicas y moleculares, los gliomas se clasifican en: astrocitomas, que representan el 60-70%; oligodendrogliomas que se observan en un 10-30% de los casos y ependimomas que son menos del 10% del total [1,18].

4.1.2 Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales derivados de los astrocitos o de células troncales cancerosas [15] 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 40 y los 60 años de edad y son más frecuentes en hombres que en mujeres (3:2) [19]. La OMS clasifica a los astrocitomas según sus características histológicas (presencia de atipia, proporción de células en mitosis, proliferación endotelial y necrosis), capacidad de invasión y progresión en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV aquellos de mayor agresividad [14,20]:

➤ *Astrocitoma pilocítico (grado I)*

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 tejidos 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. Además muestran atipia nuclear y pueden ser eliminados si se remueven quirúrgicamente. La supervivencia del paciente es de 11 a 15 años [13].

➤ *Astrocitoma difuso (grado II)*

Los astrocitomas difusos o de grado II afectan comúnmente a los adultos entre 30 y 40 años. Estos tumores están caracterizados por 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 tumores de baja malignidad pero 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 sobrevivencia de los pacientes es entre 5 y 10 años [3].

➤ *Astrocitoma anaplásico (grado III)*

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. Muestran 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 y 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 [10].

➤ *Glioblastoma multiforme (grado IV)*

Los astrocitomas de grado IV, también llamados glioblastomas, pueden estar formados por diferentes tipos celulares como astrocitos y oligodendrocitos. El glioblastoma es el tumor cerebral primario más frecuente y el más agresivo. Su incidencia es de 3-4 casos por 100000 habitantes por año, representando un 69% 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, son los más agresivos y son la forma más común de glioblastoma; 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. Son tumores más resistentes a la quimio y/o

radioterapia y son letales en un lapso de 12 meses [10,19].

En general, los primeros síntomas a causa de estos tumores pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debido al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, ataques, cambios de personalidad, demencia o problemas con la memoria, el aprendizaje, la concentración y problemas motores. Los síntomas subsecuentes varían dependiendo de la localización del astrocitoma y como se mencionó anteriormente, la supervivencia de los pacientes está inversamente relacionada al grado del tumor [20].

En los astrocitomas humanos se ha descrito una variedad de mutaciones que afectan normalmente a aquellos 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 tumoral 53 (P53), el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), la neurofibromina 1 (NF1), el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor de la proteína tirosina cinasa erbB-2 (ERBB2) y el gen del retinoblastoma (RB1) se encuentran frecuentemente mutados en los astrocitomas. Además, la expresión de genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular, se encuentra alterada en astrocitomas humanos [23,24]. 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 y deleciones y translocaciones en el cromosoma 9. También se han detectado en menor grado pérdidas del cromosoma 22 y deleciones en los cromosomas 1 y 7 [25].

Con el paso de los años, la intervención médica para los astrocitomas más agresivos (grado III y IV) ha evolucionado de modo que ahora el tratamiento para estos gliomas incluyen: la resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, utilizando como principal agente antineoplásico a la temozolomida. Aunque la esperanza de vida de los pacientes ha incrementado de 6 meses a 15 meses en

los últimos años [3], estos tumores continúan siendo letales para la mayoría de los pacientes. Es por esto que se busca ofrecer a los pacientes tratamientos alternativos (como ocurre con otros tipos de tumores) basados en estudios de genética y biología molecular. Entre los que se encuentran inhibidores de cinasas importantes en la activación de vías de señalización presentes en cáncer [3], así como también los tratamientos endócrinos. Una terapia alternativa podría ser aquella basada en antagonistas de receptores a hormonas esteroides, como la P₄, por lo que es importante conocer sus efectos y mecanismos de acción [26].

4.2 Progesterona (P₄)

4.2.1 Generalidades

La P₄ (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 ciclopentanoperhidrofenantreno. Es sintetizada y secretada por los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), testículos, glándulas adrenales y placenta [27]. 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 [28]. El primer paso en su biosíntesis corresponde a la conversión de colesterol en pregnenolona por el citocromo CYP_{11A}, localizado en la membrana interna de la mitocondria. Posteriormente, la pregnenolona se transporta al retículo endoplásmico liso donde es convertida en P₄ por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) [29] **(Figura 1)**. La síntesis y secreción de la P₄ se encuentra regulada por diversas hormonas, entre las que se encuentran la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), prostaglandinas y agentes β-adrenérgicos [27].

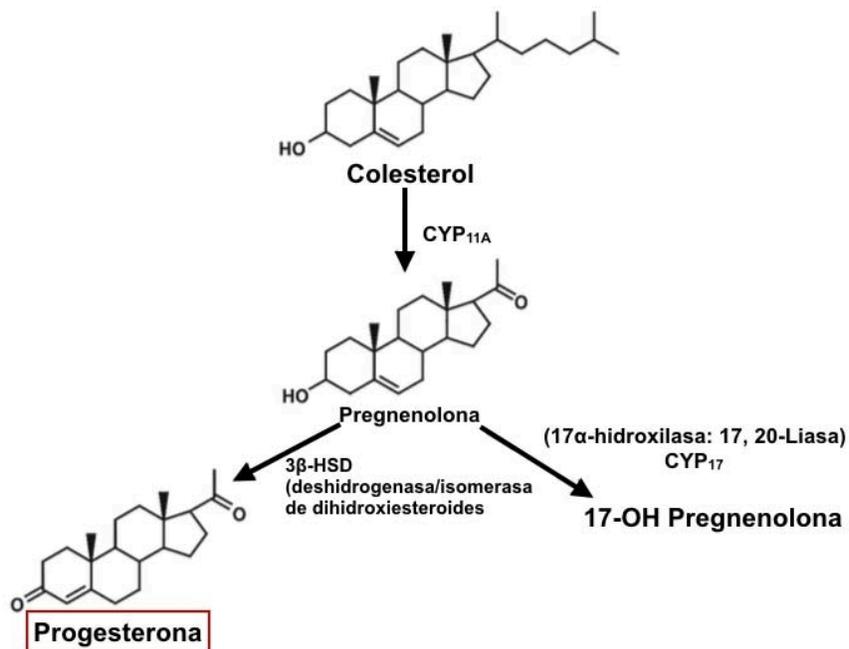


Figura 1. Biosíntesis de la P₄. Conversión de colesterol a pregnenolona por CYP_{11A} (también llamada colesterol 20,22-desmolasa o P450_{scc}) y de ésta a P₄ por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). La 3β-HSD cataliza dos reacciones: la deshidrogenación del grupo OH del carbono(C) 3 y la subsecuente isomerización del doble enlace entre el C5 y C6 a un doble enlace entre el C4 y C5 [Modificado de 20].

La P₄ se encuentra involucrada en la regulación de un amplio número de funciones en los mamíferos. Participa en procesos como la regulación de la ovulación y la implantación del óvulo, la diferenciación y el comportamiento sexual, el embarazo, la regulación del sistema inmune, estimulación de la respiración, la modulación de la masa 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 e invasión de diversos tumores entre los que se encuentran los astrocitomas [6,30,31].

La P₄ tiene diferentes efectos sobre una misma célula al activar mecanismos que involucran a varias proteínas en compartimentos celulares distintos. Así, los efectos de la P₄ se pueden clasificar como clásicos (genómicos) y no clásicos (no

genómicos) [32] (**Figura 2**), existiendo la posibilidad de que ambos ocurran en una misma célula y que de esta manera la hormona ejerza una regulación mucho más fina de diversas funciones celulares.

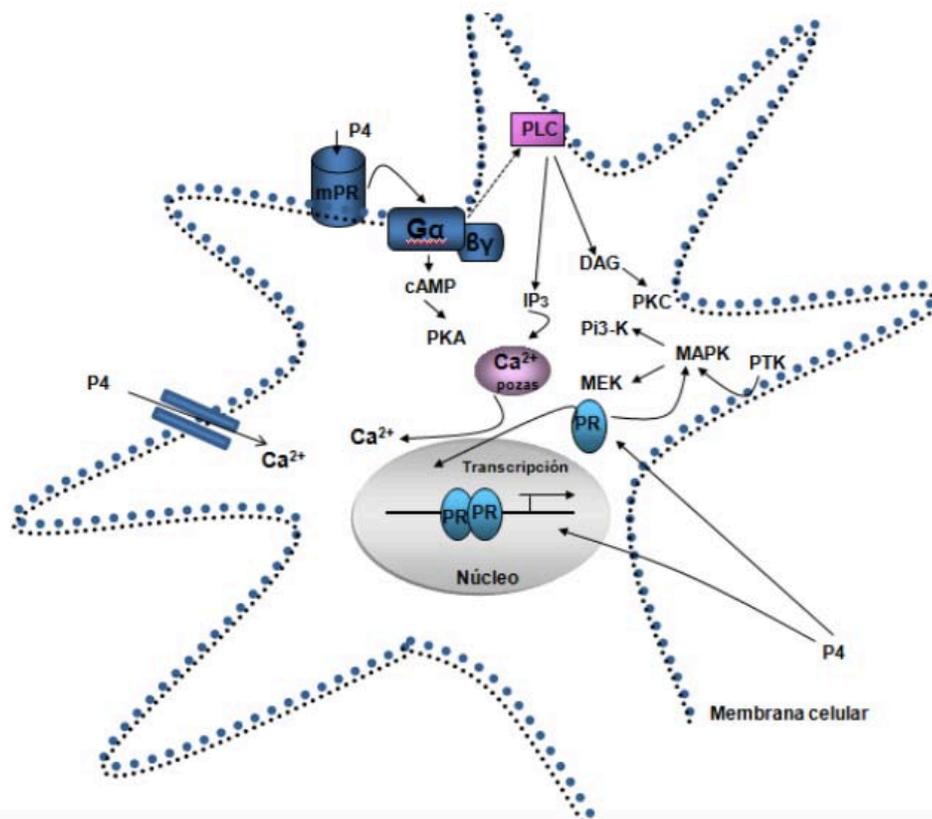


Figura 2. Esquema de los mecanismos de acción de la P₄. Los efectos de la P₄ ocurren por dos mecanismos: 1) a nivel membranal incluye receptores específicos y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP (o mPR): Receptor membranal a P₄, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, AMPc: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Cinasa A, Ca²⁺: Calcio, PTK: Proteína Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, IP₃: Inositol Trifosfato 2) a nivel citoplásmico o nuclear, donde el complejo hormona-receptor se une con elementos de respuesta a progesterona (ERP), ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el ADN, y así modulan directamente la expresión génica [Modificado de 27].

El mecanismo clásico o genómico, comprende los efectos a largo plazo, los cuales están modulados por el receptor intracelular a progesterona (RP) que

regula la expresión de genes blanco [33]. En cambio el mecanismo no clásico o genómico ocurre principalmente a nivel membranal y citoplásmico y genera los efectos a corto y mediano plazos al modificar la conductancia de iones, inducir la formación de segundos mensajeros como el AMPc, y activar cinasas [4] (**Figura 2**).

4.2.2 Mecanismo de acción clásico o genómico de la P₄

Por medio del mecanismo clásico se generan cambios en la transcripción de genes específicos después de la interacción de la P₄ con el RP que es un factor de transcripción regulado por ligando. El receptor se mantiene inactivo gracias a que se encuentra unido a un complejo proteínico formado por las proteínas de choque térmico Hsp70/Hsp90 y Hsp40, la proteína p53 y otras co-chaperonas como las proteínas FKBP 51 y 52. La unión de la P₄ con el RP provoca un cambio conformacional en el receptor que le permite la disociación de las proteínas que lo mantienen inactivo, su fosforilación y dimerización, resultando en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas en el ADN llamadas elementos de respuesta a P₄ (ERP) localizadas en la región promotora de sus genes blanco; el RP puede reclutar proteínas denominadas corre reguladores (coactivadores y correpresores) y de esta forma regular la transcripción de genes blanco de la P₄ [23,34]. Posteriormente, el RP puede ser degradado por el proteosoma 26S [35].

La expresión del RP ha sido demostrada en astrocitomas humanos por diversos grupos de investigación. En biopsias de pacientes con astrocitomas, la expresión del RP es mayor en los astrocitomas de mayor grado de evolución, lo que ha sugerido que la P₄ está involucrada en el desarrollo de estos tumores cerebrales [4,6].

En cuanto a lo anterior, en nuestro laboratorio se caracterizó el efecto de la P₄ y del RU486 (antagonista del RP) sobre el crecimiento de dos líneas celulares (U373 y D54) derivadas de astrocitomas humanos de grados III y IV, respectivamente. Se demostró 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 el RU486 (10 μ M), bloqueó parcialmente el efecto de la P₄, sugiriendo que el efecto de esta última está mediado en parte por el RP [4]. 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 RU486 [36]. No obstante, otro grupo de trabajo publicó que la P₄ en altas concentraciones (20, 40 y 80 μ M) decrece la viabilidad de diversas líneas celulares derivadas de glioblastomas sin que el RU486 bloqueara este efecto [37].

Aunado a lo anterior, se ha reportado que en líneas celulares de astrocitomas humanos, la P₄ induce la expresión de genes que participan en la regulación del ciclo celular, la proliferación y la angiogénesis como la ciclina D1, el EGFR, el VEGF, mediante un mecanismo que involucra al RP [23,24]. Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio también indican que genes como el factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF), el factor transformante de crecimiento β 2 (TGF β 2) y la metaloproteinasa 1B (MAP1B), involucrados en respuesta inmune, proliferación y migración celular, son regulados por P₄ mediante un mecanismo no clásico [34,38].

4.2.3 Mecanismo de acción no clásico o no genómico de la P₄

En general, las acciones hormonales llamadas no genómicas o no clásicas [39–41] están caracterizadas por:

a) Ser acciones de corto tiempo (de segundos o minutos). Sin embargo, algunas de las acciones no genómicas de las hormonas pueden llevarse a cabo en periodos más largos de tiempo e involucrar acciones genómicas, ya que se ha demostrado en diversos estudios que receptores nucleares a hormonas esteroides están asociados con la membrana plasmática.

b) Ser independientes de la síntesis de ARNm y de proteínas, por lo que no están afectadas por inhibidores de la transcripción (actinomicina D) ni por inhibidores de la traducción (cicloheximida).

c) Ser reproducibles al usar hormonas que no pueden ingresar al interior celular por estar acopladas a proteínas como la albúmina o al emplear receptores intracelulares mutados que no son capaces de activar la transcripción.

De manera muy interesante, con el paso de los años se ha observado que los efectos no genómicos de la P_4 se caracterizan por su interacción con diversos tejidos activando una amplia variedad de segundos mensajeros [42] (**Tabla 1**).

Tabla 1. Efectos no genómicos de la P_4 en diversos tejidos*

Especie	Tejidos	Acción fisiológica	Vía de señalización	Referencia
Humano	Espermatozoides	Capacitación/Reacción acrosomal	Entrada de Ca^{2+} , Cl^- y aumento de AMPc	[43–45]
Reptiles	Ovocitos	Ovogénesis	Activación de proteína G y descenso de AMPc; activación de ERK $\frac{1}{2}$ y PI3K	[8,46,47]
Humano	Linfocitos T	Función inmunorreguladora	Activación de proteína G e inhibición del canal de K^+	[48]
Humano	Plaquetas	Agregación plaquetaria	Entrada de Ca^{2+}	[43,49]
Rata	Células granulosa	Efectos anti-apoptóticos	Inhibición de MEK, homeostasis de Ca^{2+} y activación de proteína cinasa G	[50,51]
Humano	Intestino delgado	Contracción muscular	Reducción de la entrada de Ca^{2+}	[52]
Humano	Vasos	Vasorreactividad	Regulación de la entrada de	[53]

sanguíneos		Ca ²⁺		
Ratón	Células de Leydig	Esteroidogénesis y acción de la LH	Entrada de Na ⁺	[54,55]
Ratón	Corteza cerebral	Neuroprotección	Activación de PI3K, ERK ½ e inhibición de la entrada de Ca ²⁺	[56,57]
Rata	Hipocampo	Actividad neuronal de la retina	Activación de PI3K	[58]

*[Modificado de 37]

De acuerdo a lo descrito anteriormente, la P₄ puede ejercer sus efectos no genómicos mediante mecanismos diversos, sin embargo, en años recientes se ha propuesto que muchos de los efectos no clásicos de la P₄ se llevan a cabo a través de receptores membranales por lo que se ha prestado un interés particular en el estudio de dichos receptores.

4.3 Receptores membranales a P₄ (mRPs)

4.3.1 Generalidades y estructura de los mRPs

Por varias décadas se ha estudiado la existencia de acciones no genómicas iniciadas en la membrana celular por hormonas esteroides, como la P₄. Dicha hormona ejerce algunos de sus efectos no genómicos mediante dos nuevos tipos de proteínas recientemente identificadas, no relacionadas con el RP, que median dichos efectos: los receptores membranales a progesterona (mRPs) y los componentes del receptor membranar a progesterona (PGMRC).

Pese a su homología con la familia de los Receptores acoplados a Proteínas G (GPCRs), los mRPs pertenecen a una gran y conservada familia de proteínas denominada “Familia de Receptores a Progestinas y Adiponectina Q” (PAQR) la cual se divide a su vez en tres subgrupos de acuerdo a su estructura y sus características de unión a ligando: los receptores relacionados a adiponectina

(Clase I), los relacionados a mRPs (Clase II) y los relacionados a hemolisina III (Clase III) [59–61].

El genoma humano contiene 11 genes que codifican para proteínas de la familia PAQR, los cuales se encuentran altamente conservados dentro de los vertebrados [59]. Aunado a la clasificación del párrafo anterior, en humanos, el PAQR10 y el PAQR11 pertenecen a los PAQR de clase III. Los PAQR de clase I incluyen al PAQR1 (adipoR1), PAQR2 (adipoR2), PAQR3 y PAQR4 . Finalmente, los PAQRs de clase II consisten en 5 miembros que sólo están presentes en vertebrados, dicho 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), el PAQR8 (mRP β) y el PAQR9 (mRP ϵ) [62,63].

La familia de los PAQR está unificada por la presencia de 7 dominios transmembranales (DTM) y tres regiones conservadas. El primer motivo conservado precede al primer DTM y tiene la secuencia consenso $PX_nGYRX_nEX_2NX_3H$ (P: Prolina; X: aminoácido desconocido; G: Glicina; Y: Tirosina; R: Arginina; E: Glutamato; N: Asparagina y H: Histidina), sin embargo, en los PAQRs de clase II dicho motivo está truncando 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 (S: Serina y D: Aspartato). Finalmente el tercer motivo se encuentra en el asa que precede el séptimo DTM y presenta la secuencia $PEX_3PGX_nHQX_2H$ (Q: Glutamina), dicho motivo está truncado en los PAQR de clase III siendo HX_3H [63] (**Figura 3**). Además dentro de las regiones que forman asas se han observado residuos ácidos constantes (Asp o Glu). Los residuos conservados se han encontrado predominantemente en las asas intracelulares o en la cara intracelular de los dominios TM lo que sugiere que dichas características son requeridas para la transducción de señales [59,60,63].

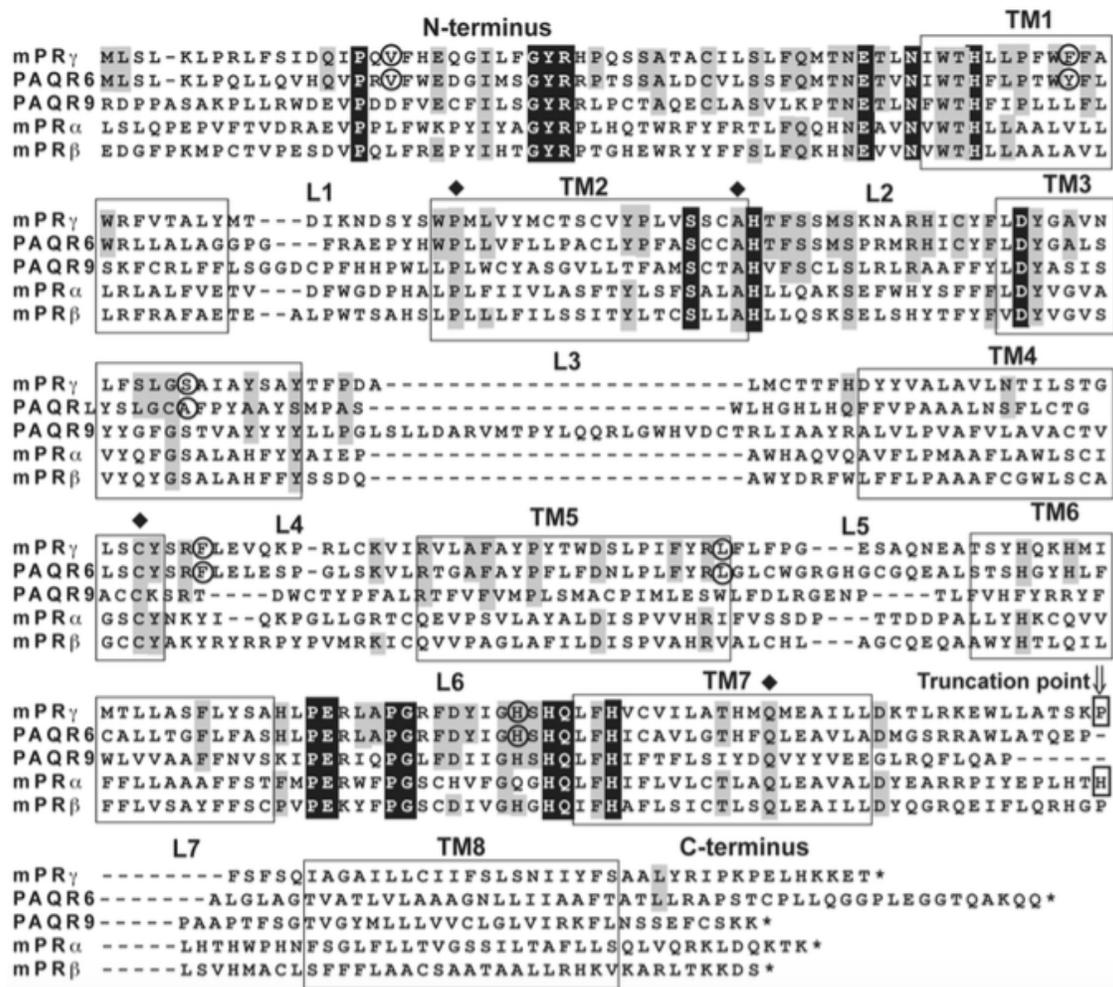


Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de los PAQRs humanos de clase II. Se muestran los dominios TM, así como las asas (loops, L). Los aminoácidos altamente conservados en toda la familia PAQR se resaltan en negro, mientras que en gris se muestran los residuos conservados del subgrupo mPR γ /PAQR6. Los círculos indican los aminoácidos que delimitan las regiones intrón- exón en el pre-ARNm [63].

Existe controversia respecto a las características estructurales y topológicas de los mRPs. Thomas y colaboradores revelaron que al igual que los PAQR de clase I y III, los mRPs (PAQR de clase II) se conforman por 7 DTM, pero se diferencian de los PAQR de clase I y III al presentar el extremo amino terminal extracelular y el extremo carboxilo terminal intracelular [7,59] dicho modelo reforzó la idea de que los mRPs son receptores similares a los GPCRs, siendo el modelo

aceptado hasta la fecha. No obstante, Smith y colaboradores demostraron que los extremos C-terminal del mRP α y del mRP δ no atraviesan el lumen del retículo endoplásmico y que dichos receptores presentan un DTM adicional [63]. A pesar de lo anterior, en la actualidad no se ha podido obtener la estructura tridimensional de estos receptores debido a su rápida degradación y no existe un estudio concluyente que defina la topología y estructura real de los mRPs por lo que el tema sigue siendo motivo de debate.

4.3.2 Expresión y función de lo mRPs

En 2003, los mRPs fueron inicialmente descubiertos en ovarios de teleósteos [7], y posteriormente identificados en oveja, cerdo, ratón, rata y humano [8,48,62,64,65]. En el humano los mRPs comprenden cinco subtipos: α , β , γ , δ y ϵ [63,66] y se sabe que dichos receptores presentan una gran 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 ($K_d= 5-6$ nM) por estrógenos y algunos metabolitos de la P_4 , como la alopregnanolona [61,63].

Los estudios iniciales de expresión de los mRPs indicaron que en el ser humano, el subtipo α predomina en tejidos reproductivos, particularmente en placenta, testículos y ovarios, el β en tejidos neuronales, principalmente en cerebro y médula espinal y el γ en riñón y tracto gastrointestinal. Este patrón de expresión coincide con el que se presenta en otros organismos en los que se han caracterizado estos receptores [7]. Existen menos estudios en cuanto a la expresión del mRP δ y mRP ϵ , pero en un trabajo reciente, el único realizado hasta la fecha en células de mamíferos, se sugiere que ambos se expresan en distintas regiones del cerebro humano. De manera muy interesante, en este mismo trabajo, se estudió la expresión de todos los mRPs y se encontró que en diversas regiones cerebrales, los mRPs predominantes fueron mRP β y mRP δ [66].

En mamíferos, los mRPs se han relacionado con la regulación de procesos reproductivos, comunicación neuroendócrina, regulación del sistema inmune y

procesos patológicos como el cáncer.

Los mRPs se expresan en diversos tejidos reproductivos tanto femeninos como masculinos. Se sabe que el inicio de la reacción acrosomal (en la cual la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal externa para permitir la fecundación del ovocito) inducido por las progestinas es mediado por los mRPs. En dicha reacción se produce un aumento casi instantáneo en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular que es mediada por la P_4 . Además, un estudio realizado por Thomas y colaboradores, reveló que el mRP α se localiza en el cuerpo medio y el flagelo de espermatozoides humanos, lo que sugiere la participación de estos receptores en su movilidad [44,45].

En el SNC, la P_4 regula varias funciones, entre las que destacan la neuroprotección, plasticidad neuronal y neuro-regeneración [31]. Se sabe que muchos de estos efectos son regulados por un mecanismo clásico que involucra al RP, sin embargo, se ha propuesto el papel de los mRPs en la regulación de estas funciones ya que se ha observado que la P_4 y sus derivados se unen a la membrana celular de varios tejidos del SNC de la rata lo que sugiere que existen mecanismos no clásicos de acción de esta hormona [67–69]. Los efectos no genómicos de la P_4 que se han descrito en el SNC, son cambios en el transporte de iones [70,71], liberación de neurotransmisores, actividad de proteínas cinasas [72] y translocación nuclear de la proteína Akt fosforilada [71]. Al igual que en los tejidos reproductivos, los niveles de expresión de mRP α y mRP β varían con los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo estral con una mayor expresión de los mRPs durante el proestro sugiriendo que el receptor es regulado a la alta por estrógenos y a la baja por P_4 , algo similar a lo que ocurre con el RP [73,74].

Aunado a lo anterior, la P_4 ejerce diversos efectos en muchas células del sistema inmune, entre las que destacan la alteración en la producción de citocinas, cambios en el transporte de iones e inhibición de la producción de óxido nítrico. Muchos de estos efectos ocurren en células que carecen del RP por lo que se han atribuido a los mRPs. A la fecha la expresión de mRP se ha confirmado en células

T y macrófagos, tanto a nivel del ARNm como de la proteína. Además, algunos estudios sugieren que la P_4 unida a los mRPs tiene diversas funciones en el sistema inmune como las observadas en las células T, en las cuales dicha hormona estimula la actividad de proteínas G inhibitoras [48]. La P_4 en las células T promueve la disminución del calcio intracelular y del pH [75], así como la inhibición de la proliferación, aunque en todos estos efectos aún no se confirma la participación directa de los mRPs.

Las acciones de la P_4 son complejas y variadas y ésta puede activar a distintos receptores para llevar a cabo sus funciones lo que incluye a los receptores intracelulares y a los membranales. Algunas de las funciones de la P_4 podrían ser sinérgicas mediante un mecanismo que involucre tanto al RP como a los mRPs (cross-talk), aunque es claro que estas dos clases de receptores de P_4 pueden actuar independientemente. Además, dado que la afinidad de los mRPs por prosteroles sintéticos (tanto agonistas como antagonistas) [76] difiere considerablemente de los receptores clásicos a P_4 , los mRPs podrían representar nuevos blancos terapéuticos para tratar distintas patologías sin afectar las acciones del RP.

4.3.3 Papel de los mRPs en diferentes tipos de cáncer

Dressing y colaboradores fueron los primeros en demostrar que el mRP α , mRP β y mRP γ se expresan en las células MCF-7 y SKBR3 derivadas de cáncer de mama siendo el mRP α el mayoritariamente expresado en ambas líneas y demostraron que la expresión de dichos receptores está asociada con la unión de P_4 a la membrana plasmática [73]. Otros estudios han confirmado la presencia de los mRPs en diversas líneas de cáncer de mama RP+ y RP-, así como en biopsias de cáncer de mama [62,77,78]. Lo anterior sugiere que los mRPs pueden estar implicados en el desarrollo del cáncer y regular procesos como la proliferación celular, apoptosis y metástasis.

Se han realizado pocos estudios que relacionen la función de los mRPs en el desarrollo del cáncer, sin embargo Vares y colaboradores demostraron que el

mRP α y el mRP β participan en el proceso de desdiferenciación de la línea celular no cancerosa RP-, MCF10A, a células troncales cancerosas (CSCs) CD44⁺/CD24⁻ por la vía de señalización PI3K/Akt [79]. En dicho estudio, se observó que la activación de PI3K/Akt por el mRP resulta en la inactivación transcripcional de *FOXO*, la sobreexpresión de *snail* y *slug*; factores de transcripción que regulan a la alta la transición epitelio-mesénquima (TEM); y la subexpresión de miR-29; lo que conlleva al aumento en los niveles del factor transcripcional requerido para el mantenimiento de las CSCs, KLF4. Las CSCs confieren la capacidad de resistencia a tratamientos de quimioterapia y radioterapia, por lo que observaron que con la inhibición de la vía PI3K/Akt y la sobreexpresión de miR-29, se puede contrarrestar la formación de CSCs. Otro estudio demostró la participación del mRP α favoreciendo la inhibición del TEM, por medio de la transactivación de receptores de tipo tirosina cinasa localizados en la membrana [78].

Además del cáncer de mama, los mRPs podrían también tener un impacto en la biología del cáncer cervical. El mRP α se encuentra presente en la línea celular de cáncer cervical HeLa [80] y el mRP α , mRP β y mRP γ se han encontrado en muestras de tejidos de cáncer de ovario humano [81]. Asimismo, se ha identificado la expresión de los mRPs en líneas celulares de origen epitelial de cáncer de ovario [82]. Charles y colaboradores encontraron que los mRPs estimulados con P₄ incrementan los niveles de AMPc en las células de cáncer de ovario en presencia de agonistas de receptores beta adrenérgicos [82].

De manera muy interesante, nuestro grupo de trabajo estudió la expresión, localización celular y regulación hormonal de 3 isoformas de los mRPs (α , β , γ) en dos líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos grado IV, U251 y U87 [9]. En dicho estudio, se demostró que el mRP α y el mRP β se expresan a nivel del ARN mensajero y de la proteína, mientras que la expresión del mRP γ es mínima. Aunado a lo anterior, encontramos que el mRP α y el mRP β se localizan mayoritariamente en la superficie de la membrana plasmática, siendo el mRP β el que se encuentra en mayor proporción en esta células en comparación con el mRP α . En cuanto a la regulación hormonal, se observó que la P₄ y el estradiol (E)

(10, 100 nM y 1 μ M) disminuyeron el contenido del mRP α a las 12 h de tratamiento. En contraste, ambos tratamientos, P₄ y E (10, 100 nM y 1 μ M) incrementaron el contenido del mRP β a las 12 horas. Por tanto, estos estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que algunos efectos de la P₄ sobre los astrocitomas humanos podrían estar mediados por la activación de los mRPs.

A partir de los estudios mencionados anteriormente, el interés por estos receptores y su participación en la regulación de procesos tumorales ha aumentado ya que se visualizan como futuros blancos terapéuticos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que la P_4 es una agente promotor del crecimiento tumoral debido a su capacidad de inducir la proliferación celular y la expresión de genes que promueven el ciclo celular en diversos tipos de cáncer, como el de mama y los astrocitomas de grado IV. En la actualidad, se sabe que la P_4 además de actuar mediante su mecanismo de acción clásico, también actúa mediante su mecanismo de acción no clásico mediado por los mRPs, los cuales se encuentran expresados en líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos, como la U87. Sin embargo, se desconoce la participación de dichos receptores en el crecimiento de células derivadas de un glioblastoma humano, en particular de la línea U87.

6. HIPÓTESIS

Si la P_4 induce el crecimiento de los astrocitomas a través de su interacción con los mRPs, entonces el tratamiento con un agonista (Org OD-02-0) de estos receptores incrementará el número de células U87 derivadas de un glioblastoma humano.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Conocer el efecto de la activación de los mRPs sobre la proliferación de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano.

7.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la P_4 a nivel membranar sobre el número de células U87 mediante el uso de progesterona acoplada a albúmina sérica bovina (P_4 -BSA).
- Determinar la dosis del agonista de los mRPs (Org OD-02-0), que tenga un efecto significativo sobre el número de células U87.
- Conocer el efecto de Org OD-02-0 sobre la viabilidad de las células U87.

8. METODOLOGÍA

8.1 Cultivo celular

La línea celular U87, derivada de un glioblastoma humano, se cultivó en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con rojo fenol y suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato (1 mM) y aminoácidos no esenciales, en condiciones de CO₂ al 5% y a 37°C. Una vez obtenida una confluencia del 70-80% se contó el número de células en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocaron 10,000 células por pozo en cajas de 24 pozos con 1 mL de medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10%, piruvato 1 mM y aminoácidos no esenciales y se incubaron durante 24 h. Pasado ese tiempo, se cambió el medio por 1 mL de medio DMEM sin rojo de fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas durante 24 h previo a los tratamientos.

8.2 Tratamientos

Los cultivos se trataron el día 0 de cada experimento con: a) vehículo (ciclodextrina al 0.02%, albúmina sérica bovina al 0.01% y DMSO al 0.01% para P₄, P₄-BSA y Org OD-02-0, respectivamente), b) progesterona acoplada a ciclodextrina (P₄; 10 nM en agua estéril), c) progesterona acoplada a albúmina sérica bovina (P₄-BSA; 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM en agua estéril); y el agonista de los mRPs (Org OD 02-0; 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM en DMSO al 10%) . La ciclodextrina y P₄ fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La P₄-BSA fue obtenida de Genway Biotech, Inc (San Diego, CA). El agonista de los mRPs, Org OD-02-0, fue obtenido de Axon Medchem (Groningen, Holanda).

8.3 Conteo celular

Para determinar la concentración de P₄-BSA y Org OD-02-0 con mayor efecto sobre el número de células, se realizó una curva concentración-respuesta (1 nM a 1 µM) para cada uno de estos compuestos a partir de los cultivos en cajas de 24 pozos con 10,000 células en las condiciones previamente mencionadas. Como control positivo se utilizó el tratamiento de P₄ (10 nM). El conteo se realizó

en una cámara de Neubauer durante 5 días a partir del día 0 empleando azul de tripano, un colorante vital que tiñe a las células muertas de color azul debido a que atraviesa su membrana. Al momento del conteo, se reemplazó el medio de cada pozos por 1 mL de PBS-EDTA durante 1 min, posteriormente se adicionaron 15 μ L de azul de tripano a cada pozo y se despegaron las células. Para contar el número de células, se colocó un cubreobjetos en la cámara y se depositó en un extremo una alícuota (15 μ L) de la suspensión celular de cada pozo; la células se dispersaron en la cámara por capilaridad y se contaron al microscopio tomando en cuenta las células presentes en cuatro de los nueve cuadros presentes en la cámara.

8.4 Cálculo de viabilidad celular

Las gráficas del porcentaje de viabilidad se obtuvieron a partir de la sumatoria de las células viables y no viables de cada tratamiento contabilizadas durante cada día que duró el experimento. A partir de estos datos se obtuvo el porcentaje de células viables para cada uno de los experimentos y se graficó en función de los días de tratamiento.

8.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado para todos los experimentos fue una ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para la comparación de cada tratamiento con el control. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 para calcular los valores de probabilidad. En todas las pruebas estadísticas se utilizó 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

9.1 Efecto de la progesterona acoplada a albúmina sérica bovina (P₄-BSA) sobre el crecimiento de la línea celular U87.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de P₄-BSA sobre el crecimiento de la línea celular U87 derivada de un glioma humano de grado IV. Inicialmente se realizaron experimentos para determinar el efecto de P₄-BSA sobre dichas células y establecer qué concentración ejercía el mayor efecto. Las concentraciones empleadas fueron 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M.

El tratamiento con P₄-BSA a la concentración de 1 nM aumentó significativamente el número de células U87 con respecto al vehículo a partir del día 3 de tratamiento y hasta el día 5 de cultivo; a las concentraciones de 10 nM, 100 nM y 1 μ M no se observó ninguna diferencia significativa en comparación con el vehículo (**Figura 4**).

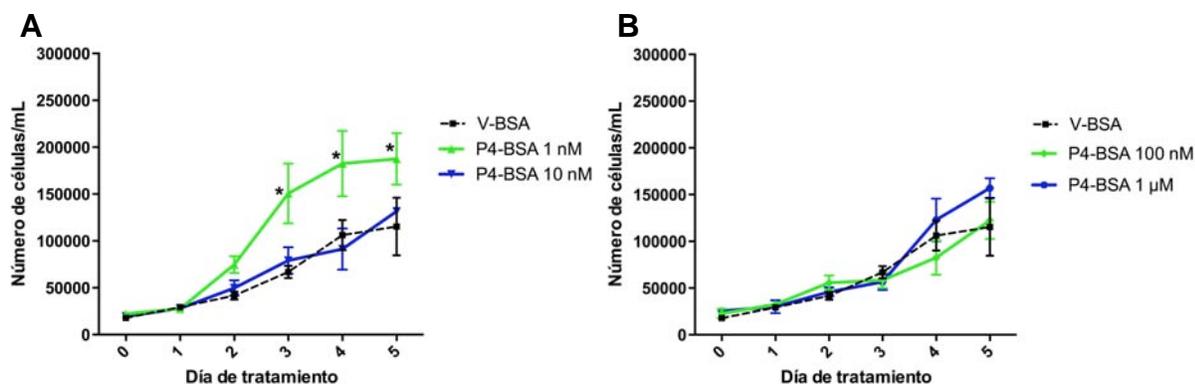


Figura 4. Efectos de P₄-BSA sobre el número de células U87. Resultados del conteo de células U87 tratadas a diferentes concentraciones de P₄-BSA durante 5 días. **(A)** La concentración de 1 nM aumentó significativamente el número de células con respecto al vehículo. **(B)** Las concentraciones de 10 nM, 100 nM y 1 μ M no mostraron ninguna diferencia significativa en comparación con el vehículo. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Cada punto representa la media \pm E.S, n=4 para todos los tratamientos. *p<0.05 P₄-BSA 1 nM vs. V-BSA.

Puesto que P₄-BSA no puede ingresar a la célula, los resultados obtenidos sugieren que el efecto de P₄ sobre el número de células se debe a la interacción de la hormona con receptores membranales, por ejemplo los mRPs. Comparado con el tratamiento de P₄-BSA (1 nM), el tratamiento con P₄ (10 nM) también incrementó significativamente el número de células a partir del día 3 y hasta el día 5 de cultivo tal como se ha reportado previamente (**Figura 5A**) [36]. Se observó que la viabilidad de las células U87 se mantuvo constante con todas las concentraciones de P₄-BSA utilizadas a lo largo de los 5 días de cultivo (**Figura 5B**).

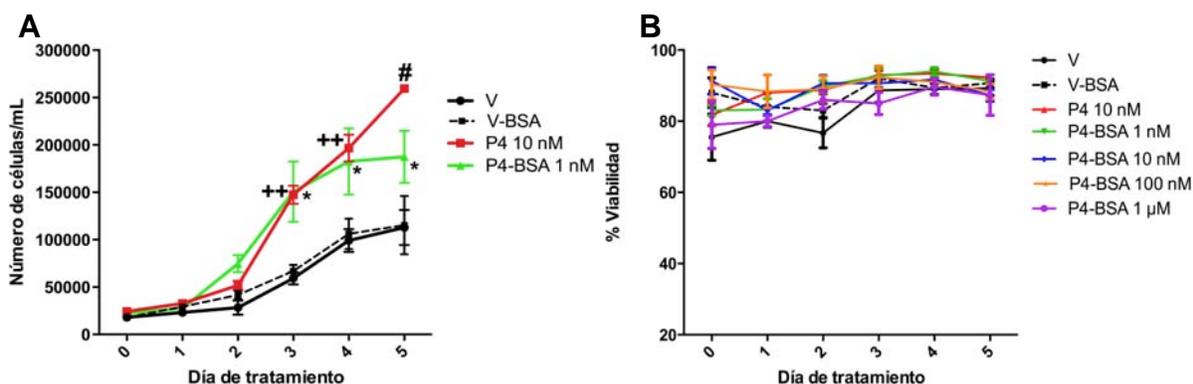


Figura 5. Efectos de P₄-BSA sobre el número y la viabilidad de células U87.
A) Efectos de P₄ (10 nM) y P₄-BSA (1 nM) sobre el número de células U87. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Cada punto representa la media ± E.S, n=4 para todos los tratamientos. *p<0.05 P₄-BSA 1 nM vs. V-BSA; ++p<0.05 P₄ 10 nM vs. V; #p<0.001 P₄ 10 nM vs. V. **B)** Efectos de la P₄-BSA sobre la viabilidad de las células U87. Cada punto representa la media ± E.S con una n=4 para todos los tratamientos.

9.2 Efecto del agonista de los receptores membranales a progesterona (Org OD-02-0) sobre el crecimiento de la línea celular U87.

Para conocer si el efecto de P₄-BSA observado en los resultados anteriores estaba mediado por los mRPs, se utilizó un agonista específico de estos receptores (Org OD-02-0). Por lo que en este trabajo se evaluó su efecto sobre el crecimiento de la línea celular U87 derivada de un astrocitoma humano de grado IV. Se realizaron experimentos para establecer qué concentración de Org OD-02-0 ejercía mayor efecto sobre dichas células. Las concentraciones empleadas fueron 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M.

El tratamiento con Org OD-02-0 a la concentración de 1 nM no hubo diferencia significativa en comparación con el vehículo (**Figura 6**). A la concentración de 10 nM se observó diferencia significativa a los días 2, 3 y 5 días de tratamiento, mientras que a las concentraciones de 100 nM y 1 μ M aumentó significativamente el número de células U87 con respecto al vehículo a partir del día 3 de tratamiento y hasta el día 5 de cultivo.

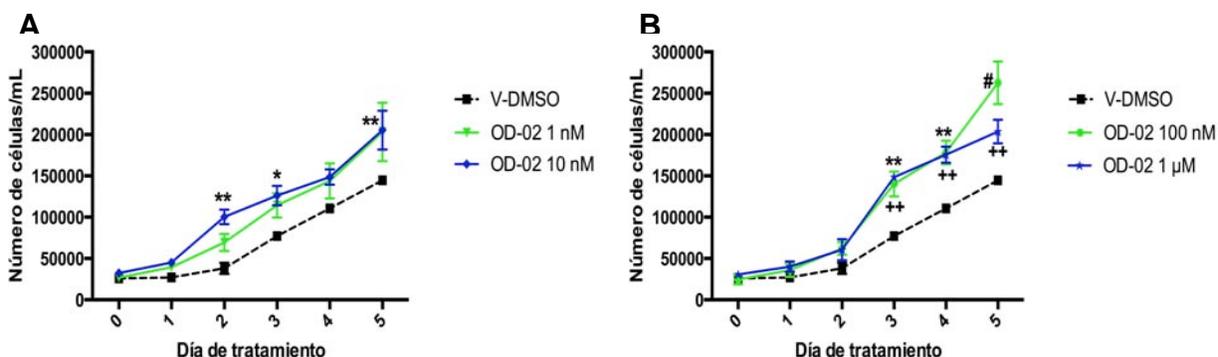


Figura 6. Efectos de Org OD-02-0 sobre el número de células U87. Resultados del conteo de células U87 a tratadas diferentes concentraciones de Org OD-02-0 durante 5 días. **A)** La concentración de 10 nM mostró un aumento significativo sólo en los días 2, 3 y 5 en comparación con el vehículo. **B)** Las concentraciones de 100 nM y 1 μ M aumentaron significativamente el número de células con respecto al vehículo. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Cada punto representa la media \pm E.S, n=4 para todos los tratamientos. *p<0.05 OD-02-0 10 nM vs. V-DMSO; **p<0.01 OD-02-0 10 y 100 nM vs V-DMSO; #p<0.001 OD-02-0 100 nM y 1 μ M vs V-DMSO.

El Org OD-02-0 presentó un efecto inductor del crecimiento de las células U87 –similar al observado con el tratamiento de P₄— con respecto al vehículo. Sin embargo, a diferencia del tratamiento de P₄, que aumenta el crecimiento celular en forma significativa a la concentración de 10 nM, el Org OD-02-0 aumenta el crecimiento celular en forma significativa a las concentraciones de 100 nM y 1 μM. Los resultados obtenidos muestran que el Org OD-02-0 provoca un aumento en el número de células U87, y al ser éste un agonista de dichos receptores, puede decirse que el incremento celular observado se debe a la activación de los mRPs. La viabilidad de las células U87 se mantuvo constante en todas las concentraciones a lo largo de los 5 días de cultivo (**Figura 7**).

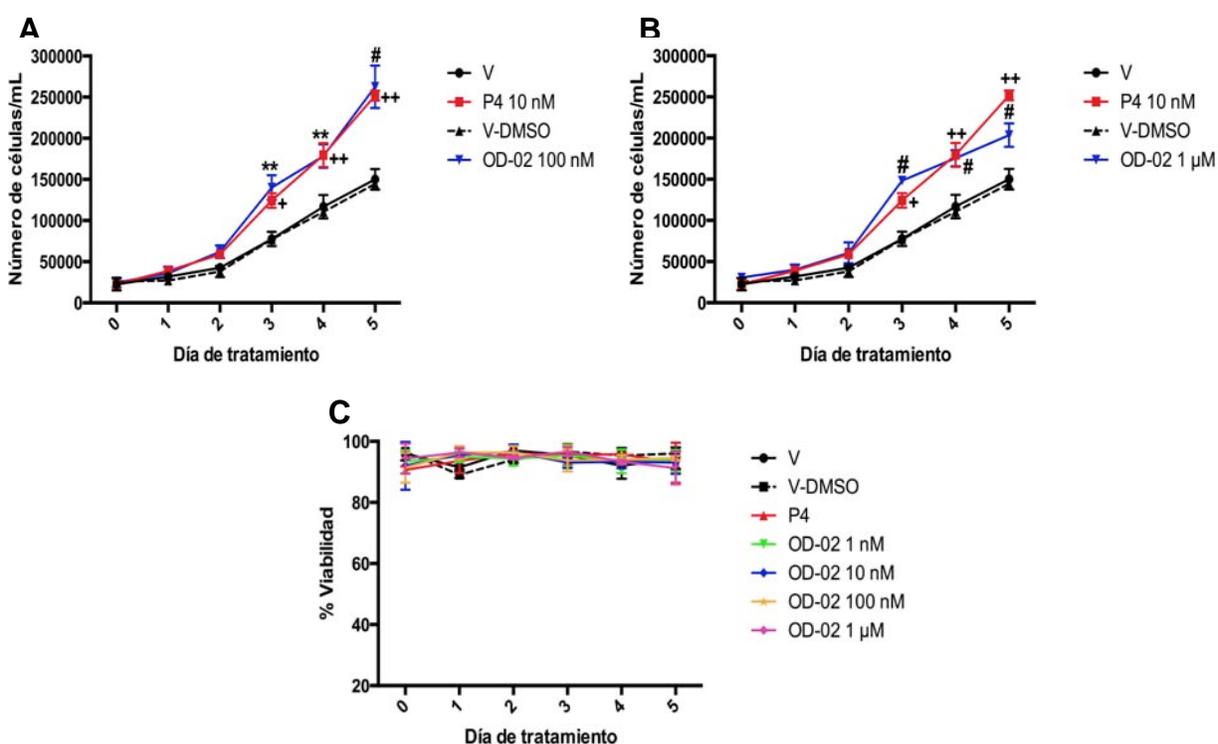


Figura 7. Efectos de Org OD-02-0 sobre el número y la viabilidad de células U87. A) Efecto de Org OD-02-0 (100 nM) y P₄ (10 nM) sobre el número de células U87. **B)** Efecto de Org OD-02-0 (1 μM) y P₄ (10 nM) sobre el número de células U87. **C)** Efecto de Org OD-02-0 sobre la viabilidad de las células U87. Resultados del conteo de células U87 a diferentes concentraciones durante 5 días. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Cada punto representa la media ± E.S, n=4 para todos los tratamientos. +p<0.01 P₄ 10 nM vs V; ++p<0.001 P₄ 10 nM vs V; **p<0.01 OD-02-0 100 nM vs V-DMSO; #p<0.001 OD-02-0 100 nM y 1 μM vs V-DMSO.

10. DISCUSIÓN

La P_4 es una hormona esteroide que tiene diversas funciones entre ellas la regulación de procesos patológicos como la tumorigénesis, en este sentido se ha sugerido que la P_4 participa en el desarrollo de los astrocitomas [4], los cuales son los tumores más agresivos del SNC, de origen glial y representan las neoplasias primarias más frecuentes en seres humanos. Lo anterior ha sido atribuido a distintos eventos celulares que se desencadenan después de la unión de la hormona al RP. Sin embargo, diversos estudios muestran que el empleo de un antagonista específico de dicho receptor, RU486, produce solo un decremento parcial de las acciones en las que se ha involucrado a la P_4 [83], entre ellas el aumento de la proliferación de líneas celulares de astrocitomas humanos y el incremento en la infiltración de células de astrocitoma implantadas en la corteza cerebral de la rata [34,36]. De la misma forma se sabe que algunos de los efectos de la P_4 están implicados en la activación de vías de señalización y al funcionar como factor de transcripción puede causar el aumento o disminución de la expresión de genes blanco [84]. Cuando los receptores actúan como factores de transcripción, se unen a secuencias específicas en el DNA e interactúan con la maquinaria de transcripción basal al igual que con otras proteínas como son los correguladores [85]. A pesar de lo anterior, en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos, se ha observado que la P_4 ejerce efectos rápidos en la regulación de la expresión de algunos genes, que no son bloqueados por el RU486 [34] los cuales no podrían ser mediados por el mecanismo clásico del RP y se ha sugerido que dicha hormona podría actuar en estas células mediante su interacción con otro tipo de receptores, como los mRPs.

Aunado a lo anterior, a la fecha existen reportes en los que se ha estudiado la expresión de los mRPs en líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer, y recientemente nuestro grupo de trabajo reportó su expresión en células de astrocitomas humanos, particularmente de glioblastomas [9]. Los resultados del estudio demostraron la expresión de sólo dos isoformas de los mRPs (α y β) en las líneas celulares U251 y U87. De manera interesante, se encontró que la

regulación de estos receptores por hormonas sexuales, como P_4 y E, se da de manera diferencial para cada isoforma. Sin embargo, no hay investigaciones recientes que muestren al crecimiento celular de los glioblastomas como uno de los efectos provocados por la activación de los mRPs.

En el presente trabajo, se determinaron los efectos de la activación de los mRPs sobre el crecimiento de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano. En la figura 4 podemos observar que a partir del día 3 de tratamiento, la concentración más baja de P_4 -BSA, incrementa el crecimiento de las células U87 de manera significativa con respecto al vehículo. Puesto que P_4 -BSA no puede ingresar a la célula, el resultado obtenido sugiere que el aumento en el crecimiento celular se debe a la interacción de la hormona con los mRPs u otros componentes del receptor membranal a P_4 (PGMRC1/2) [80].

Por otro lado, se sabe que el número de receptores (intracelulares o de membrana) asociados a hormonas esteroides que median acciones de estas últimas ha ido en aumento con el paso de los años, y aunque la existencia de múltiples receptores para cada una de ellas en diferentes tipos celulares explica las acciones pleiotrópicas por la que se caracterizan los esteroides, se complica la investigación de las distintas implicaciones fisiológicas de cada receptor; es por ello que se han desarrollado moléculas específicas para algunos receptores con función de agonistas o antagonistas [61]. Para el caso de los mRPs, en particular el mRP α , se han descrito tres compuestos con capacidad de agonista: el Org OE-64-0, el Org OD-02-0 y el Org OD-13-0; de los cuales, el segundo resultó tener una mayor especificidad y selectividad por el receptor, así como la capacidad de activar vías de señalización satisfactoriamente [76]. Por lo tanto, en la segunda parte del proyecto, se determinó el efecto del Org OD-02-0 sobre el crecimiento de células U87.

En la figura 6 se muestra que a altas concentraciones del agonista (100 nM y 1 μ M) incrementó significativamente el crecimiento celular de la línea U87 a partir del día 3 y hasta el día 5 del cultivo, con respecto al vehículo.

Esto sugiere que la activación de los mRPs puede estar mediada por hormonas esteroides, como la P_4 u otros metabolitos derivados de ella, y a su vez indica la participación de estos receptores en el crecimiento celular de células derivadas de gliomas humanos. Por otra parte, la viabilidad de las células U87 se mantuvo constante a todas las concentraciones durante los cinco días de tratamiento con respecto al vehículo.

A pesar de que no se realizaron experimentos que permitieran establecer una mejor comparación entre el efecto proliferativo de Org OD-02-0 con respecto al efecto de P_4 , no se descarta la posibilidad de que los mRPs estén implicados en la proliferación celular que podría estar relacionada con el incremento en el número de células observado con el tratamiento del agonista de los mRPs.

11. CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó que la P_4 -BSA y el Org OD-02-0 incrementan el número de células U87 derivadas de un glioblastoma humano. Dicho efecto depende de la concentración de P_4 -BSA y Org OD-02-0.

Además, se observó que ambos compuestos presentan efectos similares al de la P_4 , lo que sugiere que los efectos de esta última involucran la activación de los mRPs.

12. REFERENCIAS

- [1] Burnet NG, Lynch AG, Jefferies SJ, et al. (2007) High grade glioma: Imaging combined with pathological grade defines management and predicts prognosis. *Radiother Oncol* 85:371–378.
- [2] Argyriou AA, Antonacopoulou A, Iconomou G, Kalofonos HP. (2009) Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 69:199–210.
- [3] Arko L, Katsyv I, Park GE, et al. (2010) Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol Ther*, 128:1–36.
- [4] González-Agüero G, Gutiérrez A., González-Espinosa D, Solano JD, Morales R, González-Arenas A, et al. (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, 32:129–35.
- [5] González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M A, Camacho-Arroyo I. (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56:43–48.
- [6] Cabrera-Muñoz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, et al. (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113:80–4.
- [7] Zhu Y, Bond J, Thomas P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:2237–42.
- [8] Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. (2003) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:2231–6.
- [9] Valadez-Cosmes P, Germán-Castelán L, González-Arenas A, Velasco-Velázquez M A., Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I. (2015) Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 154:176–85.

- [10] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. (2007) Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 21:2683–710.
- [11] Xie Z. (2009) Brain Tumor Stem Cells. *Neurochem Res*, 34:2055–66.
- [12] Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al. (2008) Brain Tumor Epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium (BTEC). *Cancer*, 113:1953–68.
- [13] Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. (2006) Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pr Neurol*, 2:494–503.
- [14] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114:97–109.
- [15] Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, et al. (2010) Malignant astrocytomas originate from neural/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*, 15:45–56.
- [16] Chen YH, & Gutmann, DH. (2014) The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene*, 33:2019–26.
- [17] Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, et al. (2012) Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, 338:1080–4.
- [18] Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL, et al. (2001) Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60:248-62.
- [19] Ohgaki H, Kleihues P. (2007) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109:93–108.
- [20] Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. (1988) Grading of astrocytomas: A simple and reproducible method. *Cancer*, 62:2152–65.
- [21] Bristol RE. (2009) Low-grade glial tumors: are they all the same? *Semin Pediatr Neurol*, 16:23–6.
- [22] Sarkar C, Jain A, Suri V. (2009) Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer*, 46:108–19.
- [23] Hernández-Hernández OT, González-García TK, Camacho-Arroyo I. (2012) Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF,

- EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 132:127–34.
- [24] Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, Syrjäkoski KM, Nupponen NN, Rantala IS, et al. (1999) Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J Pathol*, 188(3):289–93.
- [25] Bigner SH, Mark J, Bigner DD. (1990) Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 47:141–54.
- [26] Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, González-Agüero G, Guerra-Araiza C, González-Morán G. (2003) Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, 136:447–52.
- [27] Henley DV, Lindzey J, Korach KS. (2005) Steroid Hormones. In: Melmed S, Conn P (eds). *Endocrinology. Basic and clinical principles*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press, pp 49-65.
- [28] Genazzani AR, Stomati M, Morittu A, et al. (2000) Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Hum Reprod*, 15 Suppl 1:14-27.
- [29] Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghomari AM. (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: Implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci*, 6:1–22.
- [30] González-Arenas A, Villamar-Cruz O, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. (2003) Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85:25–31.
- [31] Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, et al. (2008) Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*, 29:313–39.
- [32] Lösel R, Breiter S, Seyfert M, Wehling M, Falkenstein E. (2005) Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res*, 37:10–4.
- [33] Camacho-Arroyo, I; Rodriguez-Dorantes M. (2006) Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Mol Endocrinol Singpost* 25–

38.

- [34] González-Arenas A, Valadez-Cosmes P, Jiménez-Arellano C, López-Sánchez M, Camacho-Arroyo I. (2014) Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 144:463–70.
- [35] Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. (2002) Participation of the 26S Proteasome in the Regulation of Progesterone Receptor Concentrations in the Rat Brain. *Neuroendocrinology*, 76:267–71.
- [36] Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-arroyo I. (2014) Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. *Biomed Res Int* 2014:393174.
- [37] Atif F, Yousuf S, Stein DG. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 146:62–73.
- [38] González-Arenas A, Cabrera-Wrooman A, Fabián Díaz N, et al. (2014) Progesterone receptor subcellular localization and gene expression profile in human astrocytoma cells are modified by progesterone. *Nucl Recept Res*, 1:1-10.
- [39] Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, et al. (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, 83:965–1016.
- [40] Levin ER. (2008) Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295:1425–30.
- [41] Wehling M. (1994) Nongenomic actions of steroid hormones. *Trends Endocrinol Metab*, 5:347–53.
- [42] Taraborrelli S. (2015) Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 94:8–16.
- [43] Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ. (1991) Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem*,

266:18655–9.

- [44] Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CLR, Publicover SJ. (2000) Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol*, 222:326–35.
- [45] Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi E. (2004) Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*, 69:553–9.
- [46] Maller JL. (2001) The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:8–10.
- [47] Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE. (2001) The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in Phosphatidylinositol 3-Kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 276:37708–14.
- [48] Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, et al. (2008) Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol*, 196:67–77.
- [49] Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben a L, Fanger CM, Khoury RM, et al. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K^+ channels, Ca^{2+} signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med*, 188:1593–602.
- [50] Peluso JJ, Fernandez G, Pappalardo A, White BA. (2001) Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol Reprod*, 65:94–101.
- [51] Peluso JJ. (2004) Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase G-dependent mechanism that may involve 14-3-3. *Biol Reprod*, 71:1870–8.
- [52] Bielefeldt K, Waite L, Abboud FM, Conklin JL. (1996) Nongenomic effects of progesterone on human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 271:370–6.
- [53] Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Pang PKT, et al.

- (2001) Vascular effects of progesterone. Role of Cellular Calcium Regulation. *Hypertension*, 37: 142-7.
- [54] Rossato M, Nogara A, Merico M, Ferlin A, Foresta C. (1999) Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane. *Steroids*, 64:168–75.
- [55] El-Hefnawy T, Huhtaniemi I. (1998) Progesterone can participate in down-regulation of the luteinizing hormone receptor gene expression and function in cultured murine Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 137:127–38.
- [56] Nilsen J, Brinton RD. (2003) Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:10506–11.
- [57] Fiebre C, Fiebre M, Singh M. (2009) Progesterone increases BDNF expression and protects against glutamate toxicity in a MAPK and PI3-K dependent manner in cerebral cortical explants. *J Neurosci*, 85:2441–9.
- [58] Koulen P, Madry C, Duncan RS, Hwang J, Nixon E, Mcclung N, et al. (2008) Cellular physiology biochemistry and biochemistry progesterone potentiates IP3 mediated calcium signaling through Akt / PKB, 2699:5–7.
- [59] Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, et al. (2005) PAQR proteins: A novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol*, 61:372–80.
- [60] Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, et al. (2005) Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J Endocrinol*, 187:89–101.
- [61] Zhu Y, Hanna RN, Schaaf MJM, Spaink HP, Thomas P. (2008) Candidates for membrane progestin receptors. Past approaches and future challenges. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*, 148:381–9.
- [62] Dressing GE, Thomas P. (2007) Identification of membrane progestin receptors in human breast cancer cell lines and biopsies and their potential involvement in breast cancer. *Steroids*, 72:111–6.
- [63] Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, et al. (2008) Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast

confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*, 73:1160–73.

- [64] Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, De Vlieg J, et al. (2007) Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterone membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology*, 148:705–18.
- [65] Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, Tokumoto T. (2006) Cloning and identification of a membrane progesterone receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *Gen Comp Endocrinol*, 145:101–8.
- [66] Pang Y, Dong J, Thomas P. (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 154:283–95.
- [67] Towle AC, Sze PY. (1983) Steroid binding to synaptic plasma membrane: Differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem*, 18:135–43.
- [68] Ke F-C, Ramirez VD. (1990) Binding of progesterone to nerve cell membranes of rat brain using progesterone conjugated to ¹²⁵I-bovine serum albumin as a ligand. *J Neurochem*, 54:467–72.
- [69] Tischkau SA, Ramirez VD. (1993) A specific membrane binding protein for progesterone in rat brain: sex differences and induction by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:1285–9.
- [70] Frye CA. (2001) The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Res Rev*, 37:201–22.
- [71] Hwang J, Duncan RS, Madry C, et al. (2009) Progesterone potentiates calcium release through IP3 receptors by an Akt-mediated mechanism in hippocampal neurons. *Cell Calcium*, 45:233–42.
- [72] 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*, 149:5518–26.
- [73] Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, et al. (2011) Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids*, 76:11–7.
- [74] Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, González-Morán G. (2007) Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*, 146:644–52.
- [75] Barrera D, Avila E, Díaz L. (2007) Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Rev Investig Clin* 59:139–45.
- [76] Kelder J, Azevedo R, Pang Y, de Vlieg J, Dong J, Thomas P. (2010) Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPR α) and to nuclear progesterone receptor: Correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPR α -specific agonist. *Steroids*, 75:314–22.
- [77] Xie M, Zhu X, Liu Z, Shrubsole M, et al. (2012) Membrane progesterone receptor alpha as a potential prognostic biomarker for breast cancer survival: a retrospective study. *PLOS One*, 7:1–7.
- [78] 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 Res* 12:R34.
- [79] Vares G, Sai S, Wang B, Fujimori A, Nenoï M, Nakajima T. (2015) Progesterone generates cancer stem cells through membrane progesterone receptor-triggered signaling in basal-like human mammary cells. *Cancer Lett*, 362:167–73.
- [80] Thomas P. (2008) Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Front Neuroendocrinol*, 29:292–312.
- [81] Romero-Sánchez M, Peiper SC, Evans B, et al. (2016) Expression profile of

heptahelical putative membrane progesterone receptors in epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol*, 39:1026–33.

- [82] Charles NJ, Thomas P, Lange CA. (2010) Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPR/PAQR) in Ovarian Cancer Cells: implications for Progesterone-Induced Signaling Events. *Horm Cancer*, 1:167–76.
- [83] Cabrera-Muñoz E, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo I. (2011) Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem* 11:1663–1667.
- [84] Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. (2008) The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73:922–8.
- [85] Beato M, Sánchez-Pacheco A. (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587–609.