



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Papel de la proteína cinasa C en la fosforilación del receptor a
progesterona en astrocitomas humanos.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Miguel Ángel Peña Ortiz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Robles Flores, Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Marina Macías Silva, Instituto de Fisiología celular, UNAM

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2013



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.



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.

Of. No. PMDCB/589/2013

MIGUEL ANGEL PEÑA ORTIZ
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 29 de Julio del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACION de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "Papel de la proteína cinasa C en la fosforilación del receptor a progesterona en astrocitomas humanos", dirigida por el Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dra. María Cristina Fernández Mejía
VOCAL	Dra. Claudia González Espinosa
VOCAL	Dra. Leonor Pérez Martínez
VOCAL	Dra. Rosa María Uribe Villegas
SECRETARIO	Dra. Diana Escalante Alcalde

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de Agosto de 2013.
LA COORDINADORA DE ENTIDAD


DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

C.c.p. Archivo

MILV*Igg

Agradecimientos

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo económico del proyecto de CONACYT **CB-2009-132037**.

La supervisión técnica de este trabajo fue realizada por la Dra. Aliesha Araceli González Arenas del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por la Dra. Martha Robles Flores y la Dra. Marina Macías Silva.

I won't be broken

- *Keane, 2013*

“la sospecha de que más allá, donde ahora veo el aire limpio,
o en esta indecisión, en la encrucijada de la opción,
yo mismo, en el resto de la realidad que ignoro
me estoy esperando inútilmente.”

- Julio Cortázar. *Rayuela*, Capítulo 84.

“Do, or do not. There is no try”

- Yoda. *The Empire Strikes Back*, 1980

Esta tesis y todo el esfuerzo que tomó hacerla están dedicados:

A mis papás, Rocío y Miguel. Por todo su apoyo, cariño y paciencia.

A Rafael, a Raúl y a todos los que nos dejan antes de tiempo.

A la memoria de Henrietta Lacks y de todos los que pierden la batalla, pero nos dan herramientas para seguir la lucha.

Agradecimientos

Gracias a mis papás y a mi hermana. Gracias gorditos, sin su apoyo nada nunca sería posible. Gracias por darme todos menos excusas para ser la mejor persona que puedo ser. Gracias por los empujones, los abrazos, las bromas, las risas. Gracias por todo, gracias por ser lo mejor que he tenido desde siempre. Los quiero.

Gracias a TOOOOODOS mis amigos del Juventud, que durante 7 años han aguantado un amigo de medio tiempo. Gracias por todos los recuerdos, por compartir tantos años tantas tonterías.

Gracias a los Pepitas, a las Ortiz y al Sindicato. Gracias por preocuparse tanto por mí, por quererme así como soy, por dejarme estar en sus vidas, pero sobre todo por su apoyo y su amor.

Gracias a Lilo Juani Secretaria. Sin ti se me habría botado hace 25 westerns, cambiaste por completo mi vida, simplemente no hay manera de agradecerte lo suficiente. Te quiero, amorcito. Gracias por echarme porras, convencerme de que podría terminar, ayudarme cuando ya no podía y acompañarme siempre.

Gracias al Lab 107, mi hogar fuera de casa, gracias a todas por su amistad, por su cariño, sus cuidados, sus risas... su facilidad para ser bulleadas y trolleadas. ¡Arriba el 107, Adentro la comida!

Gracias a la Doctorsita. Todo esto empezó como tu bebé y tú me lo confiaste y entre los dos lo fuimos haciendo crecer y apoderarse un poco de nuestras vidas. Gracias por los consejos, por la ayuda, el apoyo, las porras, los regaños, su mirada y manos expertas para casi todo. Gracias por dejarte ser mi mentora y mi madre académica.

Gracias al Dr. Camacho. Nacho, gracias por dejarme entrar y quedarme en un laboratorio tan especial, gracias por ayudarme a crecer y a ver las cosas con otros ojos, a sacar una mirada crítica que no sabía que tenía. Gracias por creer y confiar en mí.

Gracias a la Dra. Marina y la Dra. Martha. Este proyecto y esta tesis no serían lo que son sin su ayuda, sus puntos de vista y gran capacidad y conocimientos nos ayudaron a hacer de éste un proyecto aún mejor y algo de lo que siempre estaré orgulloso.

Gracias al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, por abrirme los ojos, por enseñarme tanto de tantas cosas, pero sobre todo de mí mismo.

Gracias a la UNAM y a CU por ser tan especiales. Gracias a Google, PUBMED y ScienceDirect, sin los cuales yo no sería nadie. Gracias al chocolate por ser tan delicioso, a las alitas por ser tan adictivas, a Johnnie Walker, al mezcal y a los mojitos por su compañía después de los días largos. Gracias a Sony y a mi PS3 por las horas de culposa diversión. Gracias a Cortazar por su genialidad atemporal.

Finalmente, gracias al niño Miguelito que soñó con ser un científico loco, al puberto Mike que pensó que sería fácil, al chavo Mique que decidió estudiar Química. Y gracias a Antulio que no se rindió.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	2
3.1 Estructura y función de la progesterona (P4)	2
3.1.1 Mecanismos de acción	4
3.2 Características del Receptor a Progesterona (RP)	7
3.2.1 Isoformas del RP	8
3.2.2 Modificaciones post-traduccionales en el RP	10
3.2.2.1 Fosforilación del RP	10
3.2.3 RP y gliomas	13
3.3 Proteína cinasa C (PKC)	17
3.3.1. PKC y Gliomas	19
4. Planteamiento del problema	21
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	21
6.1 Objetivo general	21
6.2 Objetivos particulares	21
7. Materiales y métodos	22
7.1 Cultivo celular	22
7.2 Caracterización de la fosforilación del residuo S400 del RP por activación de PKC y citometría de flujo.	22
7.3 Bloqueo de la expresión de las isoformas PKC α , δ y ϵ y determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP.	23
7.4 Determinación del contenido del RP por activación de PKC y del papel de PKC α y PKC δ en la degradación del RP mediada por 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato (TPA)	23
7.5 Papel del proteosoma en la degradación del RP por activación de PKC	24
7.6 Western blot	24
7.7 Análisis estadístico	25
8. Resultados	26
8.1 Efecto de la activación de PKC sobre la fosforilación del residuo Ser 400 del RP.	26
8.2 Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP.	26
8.3 Caracterización del efecto de la activación de PKCs sobre el contenido de las isoformas del RP	29
8.4 Papel de PKC α y PKC δ en la degradación del RP inducida por TPA	29
8.5 Participación del proteosoma en la degradación del RP inducida por la activación de PKC	32
9. Discusión	33
10. Conclusiones	38
11. Perspectivas	38
12. Referencias	39

1. Resumen

La progesterona (P4) participa en la regulación de la ovulación, la conducta sexual, el embarazo y en patologías como el cáncer. Esta hormona lleva a cabo muchas de sus acciones a través de su receptor intracelular (RP), el cual ha sido encontrado expresado en biopsias y líneas celulares de gliomas, los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano. Se ha descrito que la P4, mediante el RP, aumenta la proliferación de células de las líneas D54 y U373, derivadas de gliomas humanos. Además, se ha reportado que la fosforilación del RP es importante para regular la actividad y el contenido del RP y se sabe que éste puede ser fosforilado por la cinasa de la glicógeno sintasa 3 β , la cinasa de caseína 2, la cinasa dependiente de ciclina 2 y la proteína cinasa activada por mitógenos. La proteína cinasa C (PKC) representa una familia de cinasas con gran variedad de sustratos que en modelos de gliomas se ha encontrado que participan en procesos de malignidad como invasividad y migración. En estudios *in silico* se encontró que la serina 400 del RP podría ser fosforilada por PKC, pero se desconoce hasta el momento el papel de PKC en la fosforilación del RP. En esta tesis se determinó el efecto de la activación de PKCs con 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato (TPA) en el contenido y fosforilación del RP en células U373, derivadas de gliomas (astrocitomas) humanos grado III. Mediante citometría de flujo se determinó que el tratamiento con TPA aumentó el contenido del receptor fosforilado en la serina 400 del RP a los 5 min, dicha fosforilación disminuyó a los 10 min y alcanzó niveles basales desde los 20 hasta los 60 min. Con el uso de RNAs de interferencia (RNAi) se bloqueó la expresión de las isoformas α , δ y ϵ de PKC y se encontró que las PKC α y δ participan en la fosforilación inducida por TPA. Por otro lado, mediante Western blot se determinó que el contenido del RP total disminuyó a las 3 y 5 h posteriores al tratamiento con TPA; al utilizar un inhibidor del proteosoma 26S (MG132), se observó que dicha degradación está mediada por esta vía. Estos resultados indican que las PKC α y δ participan en la fosforilación del RP en la serina 400, y que dicha fosforilación disminuye el contenido del receptor, que es degradado por la vía del proteosoma 26S en células de gliomas humanos.

2. Introducción

La progesterona (P4) desempeña una función importante en diversos procesos fisiológicos, y participa en diversas patologías, como en el crecimiento de tumores cerebrales como los astrocitomas, que son los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) más comunes y agresivos en adultos. Esta hormona lleva a cabo muchas de sus acciones a través de su receptor intracelular (RP), un factor de transcripción activado por ligando. El RP es una molécula susceptible a modificaciones post-traduccionales como la fosforilación. Se ha reportado que la fosforilación del receptor es importante para la regulación de su actividad y degradación. La proteína cinasa C (PKC) representa una familia de cinasas con una gran variedad de sustratos, que se ha implicado en diversos tipos de cáncer. Se sabe que la PKC participa en la migración y proliferación de gliomas. Sin embargo, se desconoce si la PKC puede fosforilar al RP y si dicha fosforilación influye en la regulación del mismo.

3. Antecedentes

3.1 Estructura y función de la progesterona (P4)

La progesterona (P4) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol que se sintetiza en las células del cuerpo lúteo, la corteza adrenal, la placenta, en neuronas y células gliales en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Graham y Clarke 1997; Zwain y Yen 1999; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Schumacher et al. 2012).

La P4 participa en la regulación de múltiples procesos fisiológicos en los mamíferos entre los que se encuentran la ovulación, la conducta sexual, el embarazo, la ventilación pulmonar, el crecimiento, la diferenciación celular, la excitabilidad neuronal, la plasticidad cerebral y la protección al daño neuronal. (Genazzani et al. 2000; González-Arenas et al. 2003; González-Arenas y

Agramonte-Hevia 2012; Pluchino et al. 2009; Singh y Su 2013). Se ha reportado que la P4 modula la actividad de diferentes neurotransmisores, como el ácido gamma-aminobutírico (GABA), el glutamato, la acetilcolina, la dopamina, noradrenalina y la serotonina (Etgen y Quesada 2001; Finocchi y Ferrari 2011; Sánchez et al. 2010; González-Flores et al. 2011; Guerra-Araiza et al. 2008). Se ha reportado que esta hormona incrementa el contenido de dinorfina en la médula espinal en la rata preñada (Medina et al. 1993), además se ha relacionado con el sueño y la ansiedad del síndrome premenstrual (Camacho-Arroyo et al. 1999; Backstrom et al. 2003; Terán-Pérez et al. 2012; Nillni et al. 2011).

La P4 participa también en la promoción de la neuroprotección y neuroregeneración. En diversos modelos de daño cerebral realizados *in vivo* en ratones, gatos y ratas, e *in vitro* en neuronas se ha observado que la P4 posee efectos neuroprotectores (González-Arenas et al. 2013; Callier 2001; Espinosa-García et al. 2013; Nilsen 2002; Arévalo et al. 2013; Deutsch et al. 2013).

La P4 también desempeña un papel importante en procesos patológicos como el cáncer (Kim 2013). En estudios realizados en la línea celular T47-D de cáncer de mama humano se ha observado que la P4, a través de activar al RP, induce la progresión del ciclo celular a través cambios en la expresión de genes asociados con la regulación de dicho ciclo como las ciclinas (CD-1; Sutherland et al. 1998), factores de crecimiento (EGF, TGF- α , TGF- β ; Murphy et al. 1986; Musgrove y Sutherland 1993) y proto-oncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos; Musgrove et al. 1991). Estos y otros mecanismos que involucran diferentes vías de señalización han demostrado la importancia de la P4 para la progresión del cáncer de mama (Lange y Yee 2008).

Se ha observado que la P4 participa en el crecimiento de algunos tumores cerebrales como los astrocitomas, cordomas, meningiomas y neuroblastoma (González-Agüero et al. 2007; Camacho-Arroyo et al. 2000; Omulecka et al. 2006; Atif et al. 2011). Los astrocitomas son tumores cerebrales que producen diversos síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y capacidad invasiva. Se sabe que la P4 y sus receptores influyen en la proliferación de estos

tumores (Cabrera–Muñoz et al. 2009). Se profundizará en el papel de la P4 sobre los astrocitomas más adelante.

3.1.1 Mecanismos de acción

La P4 actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales denominados genómico (clásico) y no genómico (membranal). El primero involucra la interacción de la P4 con receptores intracelulares específicos (RP; Camacho-Arroyo y Rodríguez Dorantes 2006), mientras que el segundo requiere la interacción de la hormona con receptores membranales específicos, con sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores y con canales iónicos (Fig. 1; Camacho-Arroyo et al. 2003; Gellersen et al. 2009; Lange 2008).

Dentro de las acciones no genómicas de la P4 se encuentran la activación de receptores de membrana específicos y de diversas vías de señalización que involucran cinasas tales como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o las proteínas cinasas C (PKCs; Camacho-Arroyo et al. 2003; Boonyaratanakornkit et al. 2007; Gellersen *et al.*, 2009). Las MAPKs que se activan en presencia de P4 son capaces de fosforilar al RP, aumentar su actividad transcripcional o inducir su degradación a través del proteosoma 26S (Camacho-Arroyo et al. 2002; Lange et al. 2000; Turgeon y Waring 2000; Khan et al. 2011; Skildum et al. 2005)

La mayoría de los efectos de la P4 sobre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular están mediados por sus receptores intracelulares (RP; Camacho-Arroyo et al. 2003; Hernández-Hernández y Camacho-Arroyo 2013) a través del siguiente mecanismo: la P4 ingresa a la célula por difusión simple; ya en el citoplasma o en el núcleo se une al RP que previamente se encontraba unido a proteínas chaperonas, como proteínas de choque térmico. La unión de la P4 provoca en el RP un cambio conformacional que lo separa de las proteínas chaperonas a las que se encuentra unido basalmente. Esta nueva conformación permite su dimerización y fosforilación, resultando en una estructura con alta

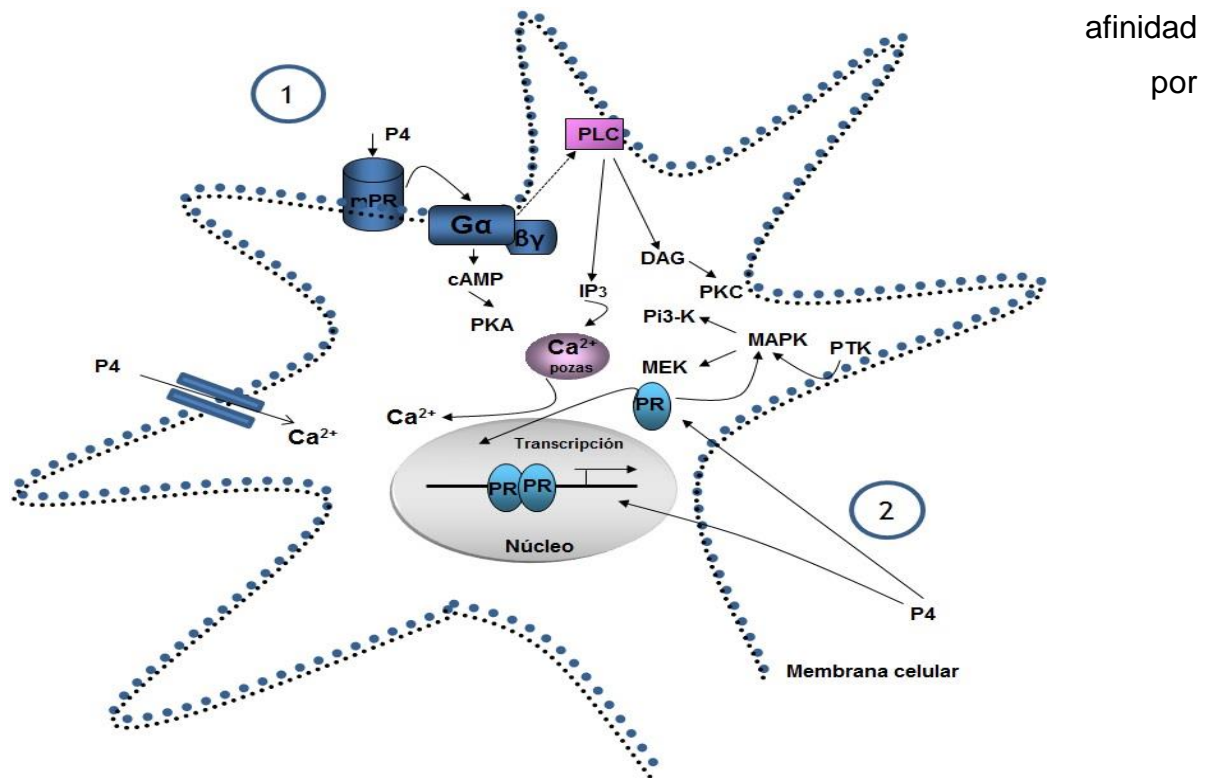


Figura 1. Esquema de los mecanismos de acción de la P₄. Los efectos de la P₄ ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1.- no genómico, que incluye receptores membranales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP: Receptor membranaral a P₄, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Cinasa A, Ca²⁺: Calcio, Cl⁻: Cloro, K⁺: Potasio, PTK: Proteína Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, MEK: Cinasa de MAPK, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, IP₃: Inositol Trifosfato. 2.- genómico, en el que el complejo hormona-receptor (P₄-RP) se une con ERP ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así se modula directamente la expresión génica. (Tomada de González-Arenas y Hernández-Hernández, 2011)

secuencias específicas en el DNA llamadas elementos de respuesta hormonal que en el caso del RP se denominan elementos de respuesta a P₄. Posteriormente al complejo ligando-receptor se unen correguladores, como SRC (steroid receptor coactivator) que activan remodeladores de la cromatina como las histona acetil transferasas (HAT) y facilitan el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por la P₄, favoreciendo así la transcripción (Fig. 2; Liu et al. 2001; Hernández-Hernández et al. 2012).

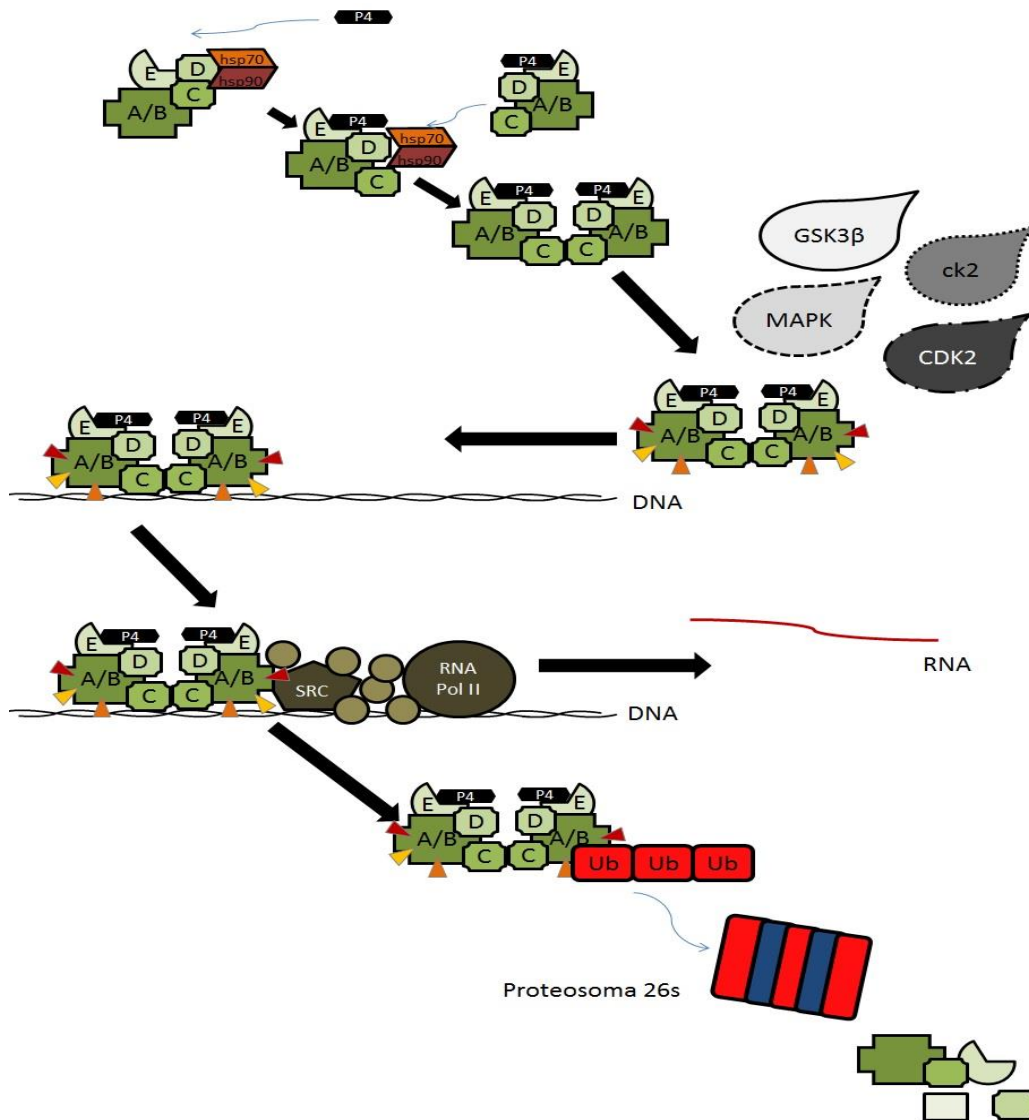


Figura 2. Esquema de la activación del RP. El receptor inactivo se une a proteínas de choque térmico (hsp90 y hsp70). Al unirse la P4, el RP se separa de las proteínas chaperonas para unirse a otro RP y formar un dímero. El dímero es fosforilado por cinasas como GSK 3 β , ck2, CDK2 y MAPK. Ya fosforilado (indicado con triángulos negros) el RP interacciona con el DNA, tiene actividad transcripcional reclutando coreguladores como SRC y posteriormente es degradado por el proteosoma 26S. Se muestran los siguientes dominios del receptor: A/B, región amino terminal; C, de unión al DNA; D, bisagra; y E, de unión a la hormona. P4: Progesterona, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, GSK 3 β : cinasa de glicógeno sintasa 3 β , ck2: Caseína Cinasa 2, CDK2: Cinasa Dependiente de Ciclina 2, SRC: Coactivador de Receptores a Esteroides, RNA Pol II: RNA polimerasa, Ub: Ubiquitina.

3.2 Características del Receptor a Progesterona (RP)

El receptor a progesterona nuclear (en adelante, RP) pertenece a una familia de factores de transcripción activados por ligando, compuestos por cuatro dominios (Tsai y o'Malley 1994; Tata 2002; Ellmann et al. 2009): 1) el dominio amino terminal (A/B) participa en la regulación de la transcripción de genes blanco, en este dominio se encuentran dos funciones de transactivación y es el principal blanco de modificaciones post-traduccionales; 2) dominio de unión al DNA (C), participa en el proceso de dimerización y en la unión al DNA, en este dominio se encuentran los dedos de zinc que permiten la unión a elementos de respuesta hormonal (ERH); 3) dominio bisagra (D) participa la unión al DNA aumentando la afinidad del receptor, en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas del choque térmico y en la localización nuclear ya que contiene el péptido de localización nuclear; 4) dominio de unión al ligando (E) participa en la interacción con el ligando y en la regulación de la transcripción. La unión a P4 y a los antagonistas modifica la conformación del receptor exponiendo u ocultando la función activadora 2, presente en el dominio (Hill et al. 2012; Figura 3).

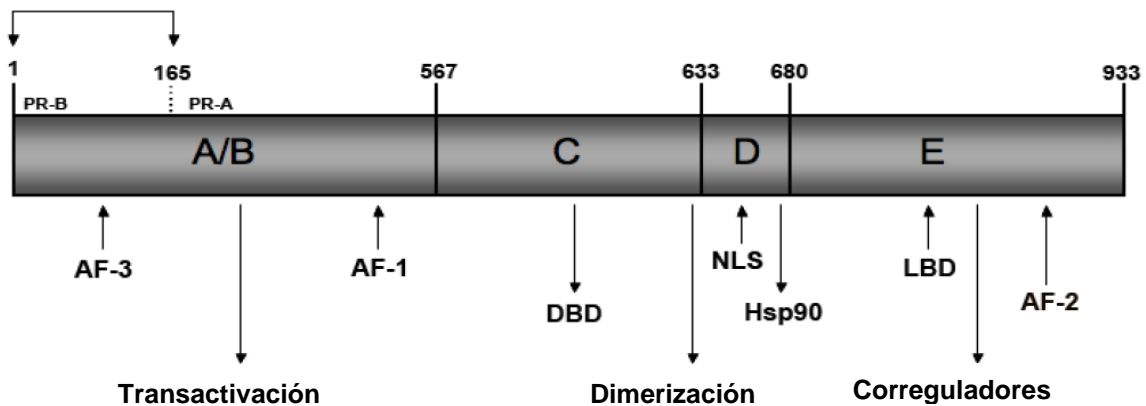


Figura 3. Representación esquemática de los dominios del RP. El dominio A/B se encuentra en el extremo amino terminal y tiene dos funciones activadoras (AF-3 y 1) que participan en la regulación de la transcripción de los genes blanco. El dominio C contiene el dominio de dimerización y el dominio de unión al DNA (DBD) que se caracteriza por tener dos dedos de zinc. El dominio D tiene las secuencias de localización nuclear (NLS) y la de unión a chaperonas. El dominio E tiene la región de unión al ligando (LBD), la de unión a correguladores y hacia el extremo carboxilo terminal tiene una función activadora (AF-2). En el esquema también se muestra el número de aminoácidos que tiene cada dominio y las isoformas RP-A y RP-B (Tomada y modificada de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

3.2.1 Isoformas del RP

En diversas especies de vertebrados, incluido el ser humano se han caracterizado dos isoformas del RP denominadas RP-A (86-90 kDa) y RP-B (116-120 kDa). La diferencia entre ellas en el ser humano es de 164 aminoácidos presentes en el extremo amino-terminal de RP-B (Conneely y Jericevic 2002; Giangrande y McDonnell 1999). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son generadas a partir de sitios alternativos de inicio de la transcripción o de la traducción (Conneely et al. 1987, Hansberg-Pastor et al. 2013; Fig. 4). Esta diferencia afecta también las funciones de las isoformas, RP-B tiene una función de activación más que RP-A, lo que bloquea la función de inhibición. Por otro lado, al no haber la función de activación 3, la función de inhibición se encuentra activa en RP-A. Es por esto que generalmente RP-B se considera un mejor activador de la transcripción que RP-A (Tabla 1; Jacobsen y Horwitz 2012, Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Scarpin et al. 2009).

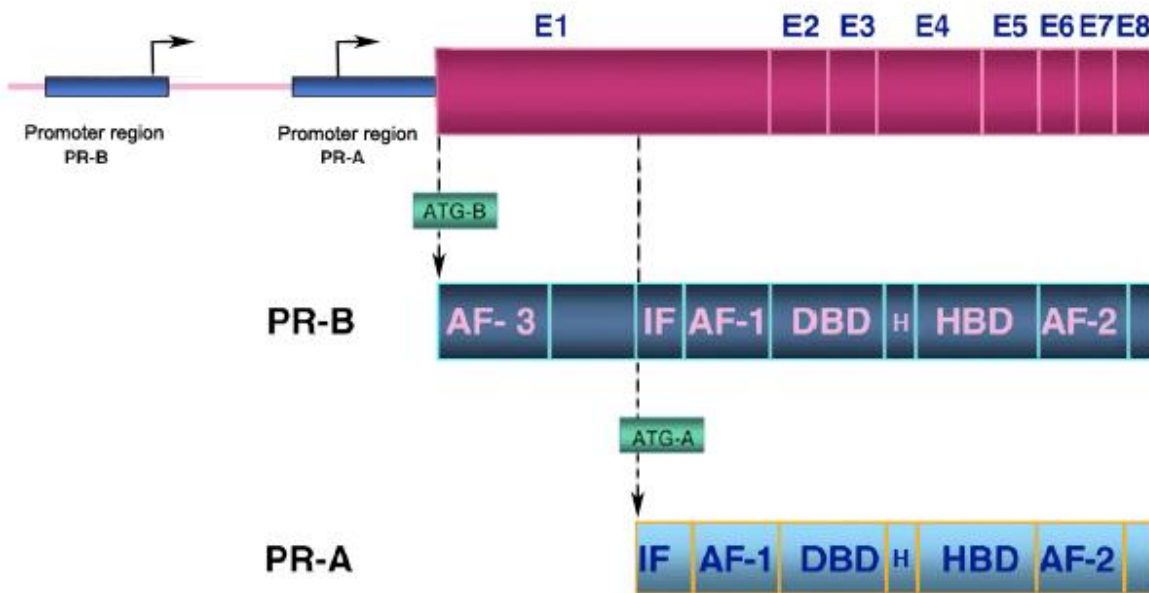


Figura 4. Esquema Representativo del gen y la proteína de las isoformas humanas del RP. Se indican las regiones promotoras de RP-B y RP-a y los 8 exones del gen. Se muestran también los codones de inicio de la traducción (ATG-B y ATG-A), las funciones de activación (AF-3, AF-1, AF-2), la función de inhibición (IF), el dominio de unión al DNA (DBD), la región bisagra (H) y el dominio de unión a la hormona (HBD) de las isoformas RP-B y RP-A (Modificada de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

Característica	RP-A	RP-B
Peso molecular	72-86 KDa	110-120 KDa
Región N-terminal	Truncada	Completa
Funciones de activación	2	3
Función de inhibición	Activa	Inactiva
Sitios de fosforilación	9	14
Unión preferencial a correguladores	Correpresor	Coactivador
Actividad transcripcional más común	Represor	Activador
Propiedad de transrepresión	Sí	No

Tabla 1. Diferencias de las isoformas del RP. (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

Las isoformas del RP regulan la expresión de diferentes genes dependiendo del tejido, célula e incluso promotor, y dicha unión está regulada a su vez por modificaciones post-traduccionales. Cada isoforma reconoce secuencias de DNA diferentes o interacciona con correguladores como los coactivadores de la familia p160 o a correpresores como NCoR y SMRT para regular la expresión de los genes (Jacobsen y Horwitz 2012).

Tanto el contenido de las isoformas del RP como su regulación varía de manera específica al tejido tanto en tejidos sanos como en neoplásicos (Cabrera-Muñoz et al. 2009; González-Arenas et al. 2003; Guerra-Araiza et al. 2003). En general se ha observado que el RP es regulado de manera positiva por estrógenos, ya que el gen del RP contiene elementos de respuesta a esta hormona. Además, el RP es negativamente por P4, debido a que la unión del RP a su ligando induce su degradación en diferentes tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Camacho-Arroyo et al. 1998; Camacho-Arroyo et al. 1996; Graham y Clarke 1997; Villamar-Cruz et al. 2006)

3.2.2 Modificaciones post-traduccionales

El RP es modificado post-traduccionalmente por diferentes procesos que regulan su localización, degradación y actividad transcripcional (Daniel et al. 2009). Estas modificaciones consisten principalmente en fosforilaciones en serinas y acetilación, ubiquitinación y sumoilación en lisinas (Hagan et al. 2012).

3.2.2.1 Fosforilación del RP

El RP es una proteína cuya actividad y recambio pueden ser regulados por fosforilación (Sheridan et al. 1989; Zhang et al. 1997; Hagan et al. 2012). Existe evidencia de que la regulación de distintas vías de señalización celular alteran la actividad y la fosforilación del RP (Hagan et al. 2012; Dressing et al. 2009), así como de otros receptores a hormonas esteroides (Ward y Weigel 2009). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas como el SRC (Rowan et al. 2000).

La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P₄. El RP de humano (hRP) contiene 15 sitios de fosforilación (Fig. 5), de los cuales 11 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo* (Ser²⁰, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁶, Ser³⁹⁰, Ser⁴⁰⁰, Ser⁶⁷⁶) y cuatro únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser²⁵, Ser¹³⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴; Wang et al. 2013; Zhang et al. 1994 y 1997; Lange et al. 2000; Knotts et al. 2001). Hasta ahora se sabe que la P₄ induce la fosforilación del RP en tres residuos que son las Ser¹⁰², Ser²⁹⁴ y Ser³⁴⁵ y que los residuos Ser⁸¹, Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰ y Ser⁴⁰⁰ son sitios que pueden estar fosforilados en algunos receptores en condiciones basales, pero después del tratamiento con la hormona aumenta la cantidad de receptores fosforilados en estos residuos (Fig. 5; Zhang et al. 1994 y 1995; Pierson-Mullany 2004; Hagan et al. 2012).

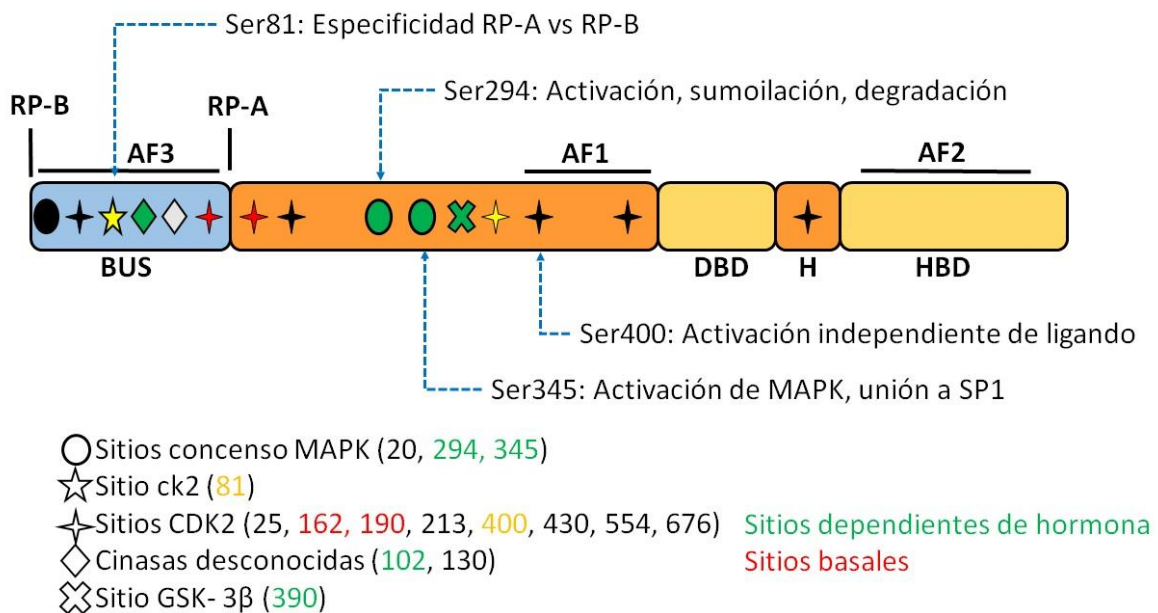


Figura 5. Estructura y sitios de fosforilación del RP humano. Se muestra el inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A, las funciones de activación (AF) y los dominios que las forman: Segmento anterior de B (En inglés, B upstream segment, BUS), segmento exclusivo de la isoforma RP-B; DBD, Dominio de unión al DNA; H, región bisagra; HBD, dominio de unión a la hormona. Además se muestran los sitios de fosforilación basal y dependientes de ligando, determinados *in vitro* e *in vivo* así como las cinasas responsables de su fosforilación directa. Tomada y modificada de Hagan et al. 2012.

Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma RP-B: Ser²⁰, Ser²⁵, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹³⁰ y Ser¹⁶² y nueve sitios de fosforilación que son comunes para ambas isoformas en los residuos Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁹⁰, Ser³⁴⁵, Ser⁴⁰⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴ y Ser⁶⁷⁶ (Knotts et al. 2001; Hagan 2012).

La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo la localización nuclear y unión al DNA (Daniel et al. 2007); activación transcripcional en presencia de P₄, regulación de su sumoilación (Daniel y Lange 2009) y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Kazmi et al. 1993; Lange, 2004; Villamar-Cruz et al. 2006; Khan et al. 2011; Rodríguez-González 2008; Daniel et al. 2007).

Estudios realizados en células HeLa con el RP mutado en el residuo Ser²¹¹ por Ala, muestran que en estas células sólo hay un 25% de la actividad transcripcional respecto a las normales. Por otro lado, en células T47D se ha observado que la fosforilación del RP aumenta su actividad transcripcional después del tratamiento con R5020, un agonista de la P₄ (Shen et al. 2001).

Existe evidencia de que distintas vías de señalización regulan la fosforilación del RP (Beck et al. 1992; Takimoto et al. 1996; Lange et al. 2000). La fosforilación de la Ser²⁹⁴ por MAPK induce la expresión de genes, aumenta la actividad transcripcional del receptor, regula negativamente la sumoilación del receptor y también induce la ubiquitinación y degradación del mismo (Daniel et al. 2009; Hagan et al. 2012; Knutson et al. 2012).

Hasta el momento se conoce que cuatro diferentes cinasas son capaces de fosforilar al RP: la cinasa de la glicógeno sintasa 3β (GSK 3β; Wang et al. 2013), la cinasa de caseína 2 (ck2; Zhang et al. 1994), la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2; Knotts et al. 2001; Zhang et al. 1997), así como MAPK-44 y MAPK-42 (Lange et al. 2000; Fig. 5). La fosforilación en residuos específicos para cada cinasa mencionada afecta de manera específica la función y regulación del contenido del receptor (Hagan et al. 2012). Estudios realizados en el laboratorio utilizando el programa KinasePhos (Wong et al. 2007) identificaron en el laboratorio 2 posibles residuos (Ser⁴⁰⁰ y Thr⁴³⁰) que podrían ser fosforilados por PKC (Tabla 2).

Arg/Lys	Arg/Lys	Lys	Gli	Ser/Thr	Phe	Arg/Lys	Arg/Lys
3 o 4 aminoácidos básicos			Aminoácido neutro	Sitio de fosforilación	Aminoácido hidrofóbico	2 aminoácidos básicos	

Tabla 2. Sitio consenso de PKC. Se muestran los residuos adyacentes al sitio de fosforilación típico para los sustratos de PKC. El aminoácido anterior a la serina o treonina debe ser glicina, precedida por 3 o 4 aminoácidos básicos. El aminoácido posterior al residuo por fosforilar debe ser un aminoácido hidrofóbico, seguido de 2 aminoácidos básicos. (Basada en Nishikawa, 1997)

3.2.3 RP y gliomas

Se ha observado que la P4 a través del RP participa en el crecimiento de diversos tumores cerebrales, los cuales son patologías de múltiples características que producen diversos síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y capacidad invasiva (González-Agüero et al. 2007). Estos tumores constituyen del 10 al 15% del total de las neoplasias que se presentan en el ser humano, pueden ser primarios (los más comunes) si se originan dentro del SNC o secundarios si se originan fuera del SNC y migran a éste (Felix et al. 1995). Los tumores primarios más agresivos y más frecuentes (69%) son los astrocitomas (Valenzuela et al. 1990; Alcántara-Llaguno et al. 2009).

Los gliomas son tumores neuroectodérmicos que tienen características de células gliales, pero de los cuales se desconoce su origen. Recientemente se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se encuentran en el adulto y tienen un alto potencial de proliferar, migrar y diferenciarse, por lo que son candidatos potenciales como progenitores de tumores gliales (Louis 2006; Alcántara Llaguno et al. 2009). Los gliomas se catalogan de acuerdo a sus características histológicas e inmunohistoquímicas en: astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas (Furnari et al. 2007), de los cuales los astrocitomas son los más frecuentes.

Los astrocitomas son tumores compuestos de astrocitos neoplásicos, se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral y microscópicamente tienen una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa (Nguyen et al. 1984; Louis 2006). La OMS ha clasificado los astrocitomas en cuatro grados siguiendo criterios morfológicos, histológicos, capacidad de invasión y progresión de la forma indicada en la Tabla 3 (Louis et al. 2007).

Grado	Características
I	Astrocitoma de bajo grado, pilocítico
II	Astrocitoma difuso, fibrilar, protoplasmático y gemistocítico
III	Anaplásico, pleomórfico, mitosis atípica
IV	Astrocitoma de alto grado, glioblastoma multiforme, gliosarcoma y glioblastoma de células gigantes

Tabla 3. Grados de astrocitomas humanos. La tabla muestra las características de los diferentes astrocitomas dependiendo del grado del mismo (I – IV; Basada en Hullerman, 2005).

Los astrocitomas de grado I son de crecimiento lento, con bordes relativamente bien definidos. Crecen principalmente en el cerebelo y rutas de nervio óptico. Son tumores no-infiltrantes que se presentan en niños y adultos jóvenes. Este tipo de tumores son usualmente curables por cirugía. Los astrocitomas de grado II son malignos, de bajo grado de infiltración difusa en el cerebro, bordes no definidos y no son curables por cirugía. Muchos de estos tumores pasan a un grado mayor de evolución (Hullerman et al. 2005).

Los astrocitomas de grado III presentan heterogeneidad celular, presentan un notable pleomorfismo y anaplasia con células multinucleadas y mitosis atípicas abundantes. Invaden los tejidos vecinos sin presentar extensa necrosis. Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas pueden originarse de diferentes tipos celulares como astrocitos y oligodendrocitos, presentan una rápida evolución, son malignos y están localizados preferentemente en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo. Llegan a medir 5 centímetros, presentan áreas hemorrágicas con células redondas pequeñas, ovoides hasta agregados celulares grandes (Hullerman et al. 2005).

La sobrevida de los pacientes está relacionada directamente con el grado del tumor, pacientes con astrocitomas grado II tienen una sobrevida de aproximadamente 7 años, los de grado III de 2 años y los de grado IV de 9 a 11 meses. El tratamiento a elegir dependerá en gran medida de la ubicación, la tasa de crecimiento, los síntomas y otros factores. Las estrategias más utilizadas para

tratar este tipo de tumores son la resección quirúrgica, radiación o quimioterapia, muy frecuentemente la combinación de estas tres (Cabrera-Muñoz et al. 2011).

Una característica de estos tumores es su alta capacidad de invasión, lo que impide resección quirúrgica satisfactoria y provoca el resurgimiento del tumor. Además, la gran variabilidad tanto genética como morfológica de estos tumores hace que las terapias existentes sean ineficientes por lo que es necesario comprender mejor los mecanismos de proliferación e invasión tanto para mejorar su pronóstico como su tratamiento (Lima et al. 2012).

Las diferencias en los distintos grados de gliomas no sólo se observan a nivel morfológico, sino también a nivel genético, lo que permite comprender mejor la evolución del tumor. Alteraciones en vías de señalización son clave para la evolución del tumor. Por ejemplo, mutaciones en *TP53* (*gen de la proteína tumoral 53*) son características de astrocitomas de grados bajos y de los glioblastomas secundarios en los que derivan. Alteraciones en receptores con actividad de cinasa de tirosina son clave para la oncogénesis de estos tumores, así como la amplificación de *EGFR* y el aumento en la señalización de *PDGF* se han implicado en la patogénesis de gliomas de bajo grado y de glioblastomas (Huse et al. 2011, Le Mercier et al. 2012).

En un estudio realizado en pacientes con astrocitomas se observó que el 100% de los tumores grado IV expresó al RP, mientras que el 83% de los tumores grado III lo expresó (Tabla 4; González-Aguero et al. 2001). Lo anterior concuerda con otros informes en la literatura que señalan que la expresión del RP está relacionada directamente con la evolución de los astrocitomas, lo que sugiere que los tumores que expresan el RP presentan un alto índice de proliferación celular (Khalid et al. 1997). Se ha demostrado que las isoformas A y B del RP se expresan diferencialmente en astrocitomas humanos, siendo RP-B la isoforma predominante en astrocitomas grados III y IV (Tabla 4). De igual manera, en las líneas U373 y D54 (derivadas de astrocitomas humanos grado III y IV, respectivamente) se ha observado una expresión diferencial de las isoformas del RP, mientras que en la línea U373 se observó una mayor expresión de RP-B (Relación RP-B:RP-A 3:1), en

la línea D54 la isoforma predominante fue RP-A, RP-B:RP-A (0.66:1; González-Agüero, et al. 2007).

Tumor (Grado)	Expresión RP	
	Biopsias positivas (%)	Células positivas (%)
Astrocitoma pilocítico (I)	44	21 ± 29.34
Astrocitoma (II)	54	24.79 ± 29.32
Astrocitoma anaplástico (III)	75	32 ± 24.18
Glioblastoma (IV)	94	58.24 ± 22.13

Grado de tumor	Isoforma predominante (Biopsias)	Línea celular	Relación RP-B: RP-A
III	RP - B	U373	3 : 1
IV	RP - B	D54	0.66 : 1

Tabla 4. Expresión del RP en gliomas y líneas celulares. *Panel Superior*, número de biopsias y células por biopsia positivas para RP de diferentes grados de gliomas (Tomada de Kalid et al. 1997). *Panel Inferior*, expresión diferencial de las isoformas del RP tanto en biopsias de pacientes mexicanos como en líneas celulares (Basada en González-Agüero et al. 2001).

Estudios en nuestro laboratorio demostraron que la P4 induce la proliferación de las líneas celulares U373 y D54 a través de la interacción con el RP. De manera muy interesante la sobre-expresión de RP-A en células U373 disminuyó el efecto de la P4 sobre la proliferación celular. Esto sugiere que el efecto de la P4 en la proliferación celular de astrocitomas de grado III depende de la expresión de las isoformas del RP (González-Agüero 2007; Cabrera-Muñoz 2009). La progresión de estos tumores depende en gran medida de la vascularización. Así, se ha reportado que la P4 aumenta la expresión de VEGF y EGFR en células D54 (Hernández-Hernández et al. 2012). Dicho aumento mediado por el RP también se ha observado en otros modelos de cáncer (Cabrera-Muñoz et al. 2011).

Estos resultados demuestran la importancia de la expresión y activación del RP para regular la proliferación de este tipo de tumores, sin embargo, se han

relacionado muchas otras proteínas con el progreso de este tipo de tumores, como factores de transcripción, receptores y cinasas. De estas últimas, se ha relacionado la activación y sobre expresión de la Proteína Cinasa C (PKC) con la malignidad de diversos tumores, incluidos los gliomas.

3.3. Proteína Cinasa C

Las PKC comprenden una familia de isoenzimas con actividad de serina/treonina cinasa codificadas por diferentes genes. Participan en una gran cantidad de cascadas de señalización, además de estar implicadas en una amplia gama de respuestas celulares dependientes de factores de crecimiento y receptores acoplados a proteínas G (Steinberg 2008).

Las PKCs están formadas por: 1) un dominio catalítico altamente conservado y 2) un dominio regulador en el extremo amino-terminal con una región de pseudosustrato autoinhibidora que mantiene a la enzima en una conformación inactiva. En este dominio se encuentran dos módulos de unión a membrana llamados C1 y C2 que marcan la diferencia entre las diferentes isoformas y familias de PKC (Steinberg 2008; Rosse et al. 2010; Fig. 6). Las PKC pueden ser clasificadas en 3 grupos dependiendo de sus regiones reguladoras: clásicas, nuevas y atípicas. Las PKCs clásicas (cPKC), PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ , son activadas por diacilglicerol (DAG), calcio, fosfatidilserina (PS) y ésteres de forbol como el 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato (TPA o PMA). Las PKC nuevas (nPKC), PKC σ , PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ , no requieren de calcio para activarse pero son reguladas por DAG y PS. Las PKC atípicas (aPKC), PKC ξ y PKC λ , son independientes de calcio y no requieren DAG para su activación, sin embargo, pueden ser activadas por ceramida, pero principalmente por interacciones proteína-proteína y PS (Fig. 6; Mackay y Twelves 2007, Steinberg 2008).

Isoformas de PKC: Estructura de Dominios

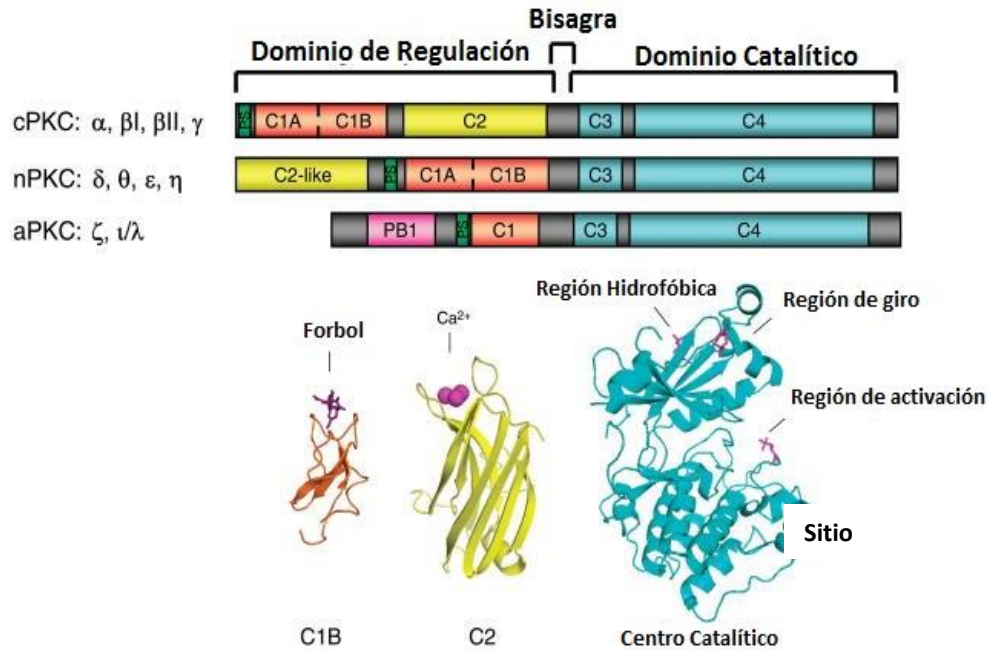


Figura 6. Estructura y familias de PKC. La parte superior de la figura muestra los dominios de las diferentes familias de PKC. Las clásicas (cPKCs) poseen una región de unión a DAG o TPA (C1A y C1B) y una región dependiente de calcio (C2), por otro lado, la región C2 de las PKCs nuevas (nPKCs) no es dependiente de calcio, pero su región C1 sí interacciona con DAG o TPA. La región C1 de las PKCs atípicas (aPKCs) no es capaz de permitir la activación de la enzima por DAG o TPA, la región PB1 es la que regula la activación mediante interacciones proteína-proteína. Todas las PKC poseen el dominio catalítico altamente conservado. La parte inferior muestra esquemas de los dominios C1, C2 y del sitio catalítico (Tomada de Steinberg 2008).

La estimulación de receptores con actividad de cinasa de tirosina y receptores acoplados a proteínas G activa a la fosfolipasa C (PLC) que incrementa los niveles de DAG e induce la relocalización y activación de PKCs. Estas cinasas, por lo tanto, son activadas por eventos membranales y tienen la capacidad de interactuar y activar cascadas de señalización como MEK-ERK y la vía PI3-Akt, y así regular la expresión de diferentes genes (Ali et al. 2008).

Después de su activación, las PKCs se translocan a la membrana plasmática. De hecho, en los primeros estudios para evaluar la activación y función de estas cinasas, se consideró a la translocación como una medida de activación en células. En la actualidad se ha observado que únicamente la translocación no es suficiente para determinar el estado de activación. Las PKCs clásicas migran a la membrana de manera rápida mediante un mecanismo que involucra acumulación de DAG (debida a la PLC), posteriormente, dependiendo de la célula y de la isoenzima, pueden ser liberadas de la membrana en un mecanismo dependiente de la actividad catalítica propia de la enzima (Steinberg 2008).

La regulación de PKC no sólo depende de su translocación, también puede ser controlada por fosforilaciones en residuos de serina/treonina muy conservados de la región carboxilo terminal y en el caso de PKC δ en residuos de tirosina (Li 1995; Soltoff 1995; Denning 1996), sitios que afecten las interacciones proteína-proteína, la actividad o la estabilidad de la enzima (Newton 1997); las PKCs también pueden ser sustratos de caspasas que originan un fragmento catalítico y otro de autorregulación separados que afectan la actividad de otras PKC íntegras e incluso a otras enzimas; finalmente, las PKC pueden ser activadas por cofactores lipídicos menos tradicionales como ceramida o ácido araquidónico (Steinberg 2008).

3.3.1 PKC y gliomas

Debido a su diversidad de sustratos, las PKCs tienen un papel central en la señalización de la proliferación, diferenciación, apoptosis y angiogénesis. Por lo que la desregulación de dichas funciones generalmente se ha visto implicada en el cáncer (Ali et al. 2008; Konopatskaya y Poole 2009; Techasen et al. 2009). La sobreexpresión de PKC ϵ favorece el crecimiento tumoral mientras que la de PKC δ tiene efectos anti-proliferativos, sin embargo, estas funciones son tejido dependientes, por lo que la sobreexpresión o actividad desregulada de las PKCs no siempre son indicadores de los mismos efectos (Ali et al. 2008). Esto resalta la importancia de comprender a profundidad los efectos y mecanismos de PKCs en el desarrollo de los tumores. En gliomas las PKCs α , δ y ϵ se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos así como al aumento en la expresión de oncogenes (Sarkar

y Yong 2009; Sharif y Sharif 1999; Tomiyama et al. 2009).

La activación de PKC α confiere a células HeLa y NIH3T3 (derivadas de cáncer cervical y de fibroblastos, respectivamente) resistencia a la apoptosis en diferentes modelos y bajo diferentes estímulos, sobre todo la apoptosis inducida por radiación (Nakajima 2008). Lin y colaboradores encontraron que PKC α activa la vía de ERK y NF κ B, induciendo la activación de metaloproteasas que aumentan la migración e invasión de la línea celular de glioblastoma GBM8401 (Lin et al. 2010).

De manera similar, PKC δ se ha asociado a la inducción de apoptosis inducida por radiación, mediante la activación de la proteína Atm (Nakajima 2008). Por otro lado, se ha observado que PKC δ participa en la activación de metaloproteasas inducida por tenacina, una proteína de la matriz extracelular, en líneas celulares de glioma grado III (U-251) y glioblastoma (U-178; Sarkar y Yong 2010). Este tipo de interacciones con diferentes vías de señalización, se ha reportado en otros tipos de tumores, por ejemplo, en cáncer de próstata se ha observado que PKC δ activa la cascada de p38, c-jun, JNK, ERK, NF κ B y otras, regulando la apoptosis y sobrevivencia de este tipo de tumores (Chen et al. 2012). PKC ϵ está sobre-expresada y constitutivamente activada en gliomas y se ha reportado su papel tanto de inductor de la proliferación como de muerte celular (Okhrimenko et al. 2005). En gliomas se ha reportado que PKC ϵ induce la proliferación y la evasión de la apoptosis (Okhrimenko et al. 2005; Yang et al. 2012), además se ha asociado a la invasión por activación del factor de transcripción Stat3 (Aziz et al. 2010). En células U373 se han detectado las isoformas α , δ y ϵ de las PKC (González-Arenas et al. 2006). La participación de esta familia de enzimas en la fosforilación, activación y posterior degradación del RP no ha sido estudiada.

4. Planteamiento del problema

Se desconoce si la PKC fosforila al RP en el residuo serina 400, predicho *in silico*, y qué isoformas de PKCs participan en dicha fosforilación. Asimismo, se desconoce si la activación de la PKC afecta la degradación del receptor, y si ésta es por la vía del proteosoma.

5. Hipótesis

La activación de la PKC inducirá la fosforilación del RP y con esto aumentará su degradación por el proteosoma 26S.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Estudiar el papel de la PKC en la fosforilación y degradación del RP en células U373 derivadas de astrocitomas humanos grado III.

6.2 Objetivos particulares

- Caracterizar el efecto de la activación de la PKC sobre la fosforilación del RP en la serina 400, identificada *in silico*.
- Determinar la isoforma o isoformas de la PKC que participan en la fosforilación del RP.
- Evaluar el papel de las isoformas α y δ de la PKC en la degradación del RP.
- Estudiar el papel del proteosoma 26S en la degradación del RP inducida por la activación de la PKC.

VII. Materiales y métodos

7.1 Cultivo celular

La línea celular U373 (ATCC: HTB 17), derivada de astrocitomas humanos grado III se cultivó en un medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM In vitro, S.A., México), con rojo fenol con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato 1 mM y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (invitrogen, USA) a 37°C y CO₂ al 5% en cajas de Petri hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Veinticuatro horas antes de cada experimento el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin rojo fenol y con SFB libre de hormonas.

7.2 Caracterización de la fosforilación del residuo S400 del RP por activación de PKC y citometría de flujo.

Utilizando el programa KinasePhos, en el laboratorio se encontraron dos residuos en el RP que podrían ser fosforilados por PKCs, uno de ellos es la serina 400, que ya se reportó como un residuo fosforilable del RP.

Antes del experimento, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin rojo fenol sin SFB. Transcurridas 4 h, las células se trataron con el activador general de PKCs, 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato (TPA) 1 µM en DMSO 10%, concentración a la que se ha observado la activación de la PKC, y transcurridos 5, 10, 20, 40 y 60 min las células se colectaron y centrifugaron a 4,500 rpm y 4°C por 4 min. A continuación las células se resuspendieron en PBS con SFB 4% (PS4). Para fijar las células se incubaron en paraformaldehído 2% a 37°C durante 10 min. Posteriormente se añadió metanol (100%) y se incubaron las células en hielo durante 30 min. Concluida la incubación, se centrifugaron de nuevo a 4,500 rpm y 4°C por 4 min. Las células se lavaron con PS4 y centrifugaron a 1,400 rpm y 4°C por 4 min.

Posteriormente, éstas se incubaron con un anticuerpo que reconoce a las isoformas del RP fosforiladas en el residuo Ser⁴⁰⁰ (pRP S400, AbCam, 5 µg/mL)

durante 20 min a 4°C, luego de un lavado con PS4, las células se incubaron de nuevo con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (FITC, 20 ng/mL) durante 20 min a 4°C. Las células se lavaron y resuspendieron en 400 µL de PS4 para ser mantenidas en la oscuridad hasta ser analizadas por citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (BD, Biosciences), el análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo.

7.3 Bloqueo de la expresión de las isoformas PKC α , δ y ϵ y determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP.

Las células cultivadas en las condiciones antes mencionadas en el apartado 7.1 *Cultivo celular*, se trataron con 0.5 ng de RNAs de interferencia (RNAi) para las isoformas de PKC (α , δ y ϵ) utilizando el reactivo de transfección Fugene de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después se cambió el medio por DMEM sin rojo fenol y SFB sin hormonas. Para comprobar el bloqueo de la expresión de las PKCs se realizó un Western blot de la manera indicada posteriormente en el apartado 7.6 *Western blot*, utilizando anticuerpos para detectar cada isoforma de la PKC.

Se cambió el medio de las células transfectadas por DMEM sin rojo fenol sin SFB 4 horas antes del experimento. Posteriormente se trataron con TPA (1 µM en DMSO 10%) durante 5 min, a continuación, se colectaron y centrifugaron a 4,500 rpm y 4°C por 4 min y se continuó con la tinción de la manera mencionada en el apartado 7.2 *Caracterización de la fosforilación del residuo S400 del RP por activación de PKC y citometría de flujo*.

7.4 Determinación del contenido del RP por activación de PKC y del papel de PKC α y PKC δ en la degradación del RP mediada por TPA.

Las células U373 cultivadas en las condiciones antes mencionadas en el apartado 7.1 *Cultivo celular* se trataron con el activador general de PKCs, TPA (1 µM en DMSO 10%) durante 5, 10, 20, 40, 60, 180 y 300 min. Por otro lado, se

pretrataron células U373 con el inhibidor de PKC α , Gö6976 (Gö 1 μ M en DMSO 10%) o con el inhibidor de PKC δ , Rottlerin (Rott 100 nM en DMSO 10%) durante 30 min; posteriormente, se trataron con el activador de PKCs, TPA (1 μ M en DMSO 10%) durante 180 y 300 min. Las células se trataron de la manera indicada en el apartado 7.6 *Western blot*.

7.5 Papel del proteosoma en la degradación del RP por activación de PKC

Las células cultivadas en las condiciones antes mencionadas en el apartado 7.1 *Cultivo celular* se pretrataron con el inhibidor del proteosoma MG132 (MG, 1 μ M en DMSO 10%) durante 30 min; posteriormente, se trataron con el activador de PKCs, TPA (1 μ M en DMSO 10%) durante 180 y 300 min y las células se trataron de la manera indicada en el apartado 7.6 *Western blot*

7.6 Western blot

Para la extracción de proteínas totales, después de los tratamientos mencionados en los apartados anteriores, las células fueron lisadas con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, tritón X-100 1%, aprotinina 22 μ g/ml, PMSF 1 mM). Las proteínas totales se separaron por centrifugación a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min y se cuantificaron por el método de Bradford.

70 μ g de proteínas totales en buffer de carga (Tris 0.5M pH 6.8, SDS 10%, Azul de bromofenol, Glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%) se separaron en un gel de poliacrilamida con SDS 7.5% a 20 mA. Marcadores de peso molecular preteñidos se utilizaron para determinar el tamaño de las bandas. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semihúmeda durante 5 horas a 40 mA por gel. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0.1% durante toda la noche a 4° C.

Las membranas se incubaron con un anticuerpo que reconoce a ambas isoformas del RP (AbCam, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o a las isoformas de PKC (Santa Cruz, 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante toda la noche a 4° C. Concluida la incubación se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa durante una hora. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1%.

Se utilizó la proteína α -tubulina como control de carga ya que se ha reportado que no se modifica su expresión por los tratamientos. Las membranas fueron tratadas con glicina ácida para quitar el anticuerpo anti-RP, posteriormente se lavaron con TBS durante 20 min antes de ser bloqueadas de la manera antes mencionada. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo policlonal de ratón contra α -tubulina durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa durante una hora. Posteriormente se realizaron los lavados de la manera antes mencionada. La identificación de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el sustrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, incubando las membranas con el sustrato durante un minuto antes de la autoradiografía con placas para quimioluminiscencia Carestream Kodak Biomax (Kodak, distribuido por Sigma-Aldrich).

7.7 Análisis estadístico

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas que corresponden al contenido del RP y α -tubulina mediante el programa Scion Image. Las medias de fluorescencia obtenidas por citometría de flujo se normalizaron respecto al vehículo. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann Whitney para el análisis de los datos, considerándose significativa la diferencia con una $P < 0.05$.

8. Resultados

8.1 Efecto de la activación de PKC sobre la fosforilación del residuo S400 del RP.

Con el fin de caracterizar el efecto de la activación de la PKC sobre la fosforilación del RP, las células U373 se trataron con el activador de PKC, TPA 1 μ M, durante 5, 10, 20, 40 y 60 min. Se detectó el contenido de RP fosforilado en la serina 400 mediante citometría de flujo, se promediaron las medias de fluorescencia observadas en las células para cada tratamiento y se normalizaron los datos respecto al vehículo (tiempo 0, figura 7). Se realizaron 3 experimentos independientes en los que se observó un aumento significativo de más del doble en el contenido del receptor fosforilado en la serina 400 a los 5 minutos y posteriormente disminuyó a los 10 min, alcanzando niveles basales desde los 20 minutos hasta 1 h.

8.2 Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP.

Una vez observado que al estimular las células U373 con el éster de forbol TPA, aumentaba el contenido de receptor fosforilado en la serina predicha *in silico*, se buscó determinar qué isoforma o isoformas de PKC participaban en dicha fosforilación. Para tal efecto, se utilizaron RNAs de interferencia para bloquear la expresión de las isoformas α , δ y ϵ ; isoformas que se activan por ésteres de forbol y que ya se ha reportado están presentes en esta línea celular (González-Arenas et al. 2006). Se utilizó la técnica de Western blot para determinar el grado de silenciamiento de estas proteínas, que fue de 76 para α , 82 para δ y 78% para ϵ , (Figura 8, *panel superior*).

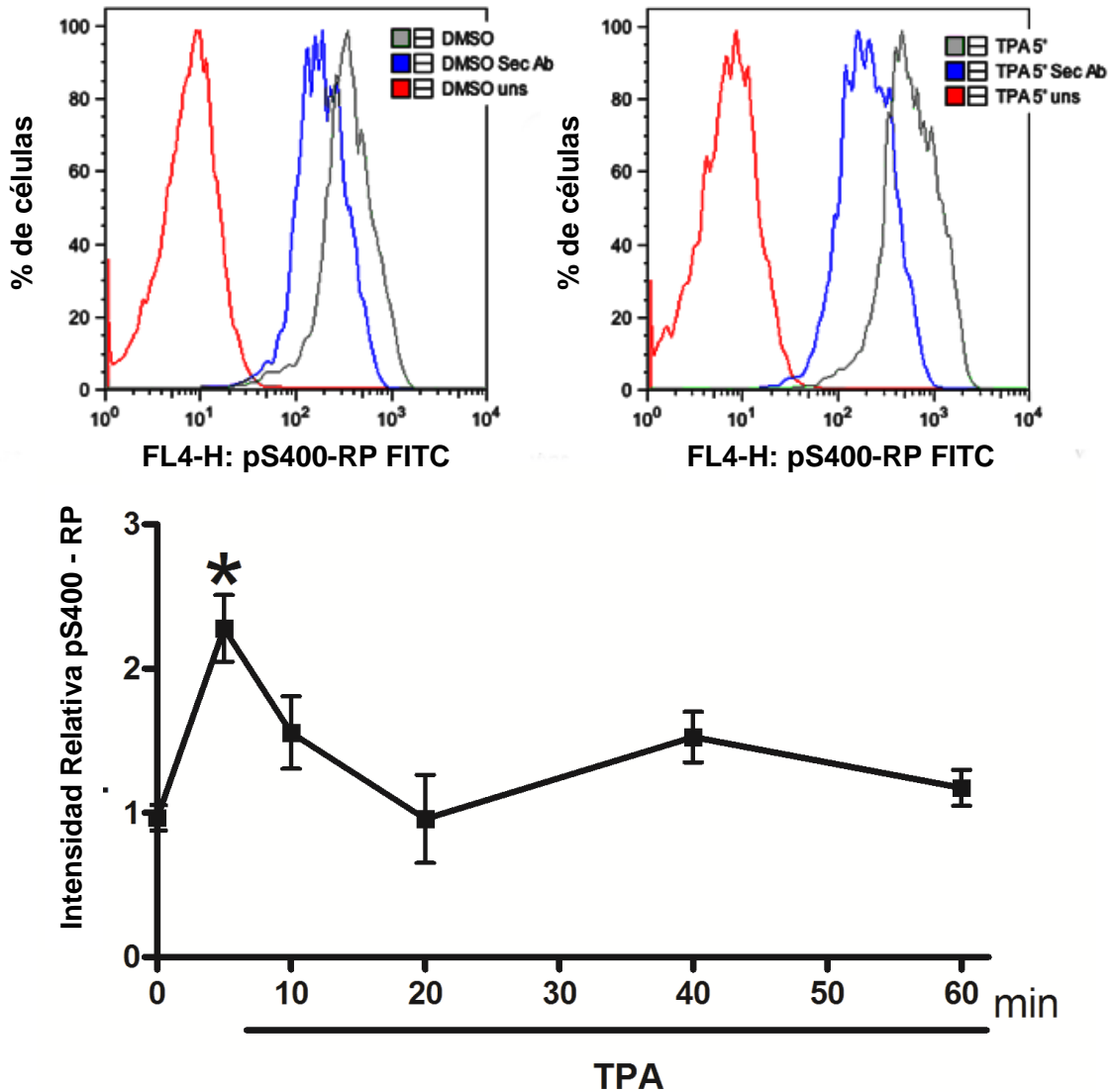


Figura 7. Efecto de la activación de PKC sobre la fosforilación de la Ser 400 del RP. Células U373 se trataron con TPA (1 μ M en DMSO 10%) fueron colectadas y fijadas a los 5, 10, 20, 40 y 60 min de tratamiento. *Panel superior* Los histogramas muestran la fluorescencia medida para células sin anticuerpos (*uns*, rojo), células incubadas únicamente con anticuerpo secundario (*Sec ab*, azul) y células incubadas con anticuerpo primario y secundario (gris); tanto para el vehículo (*izquierda*) como el tratamiento con TPA por 5 min (*derecha*). *Panel inferior*, la gráfica muestra las medias de fluorescencia para RP fosforilado en la Ser400 obtenidas mediante citometría de flujo, media \pm ES (n=3) (*P<0.05 vs todos los tiempos excepto 10 min).

A continuación, las células con las isoformas de PKC silenciadas se trataron con TPA 1 μ M durante 5 min, tiempo en el que se observó la mayor fosforilación del RP en la serina 400. Posteriormente se fijaron y se detectó el contenido del RP fosforilado mediante citometría de flujo. Tres experimentos independientes mostraron que al silenciar las isoformas α y δ se bloqueó el incremento en el RP fosforilado observado en las células tratadas con TPA. El silenciamiento de PKC ϵ no tuvo efecto en la fosforilación de la serina 400 (Figura 8, *inferior*), lo que indica que las isoformas α y δ , pero no ϵ , participan en la fosforilación del RP en la serina 400 inducida por TPA.

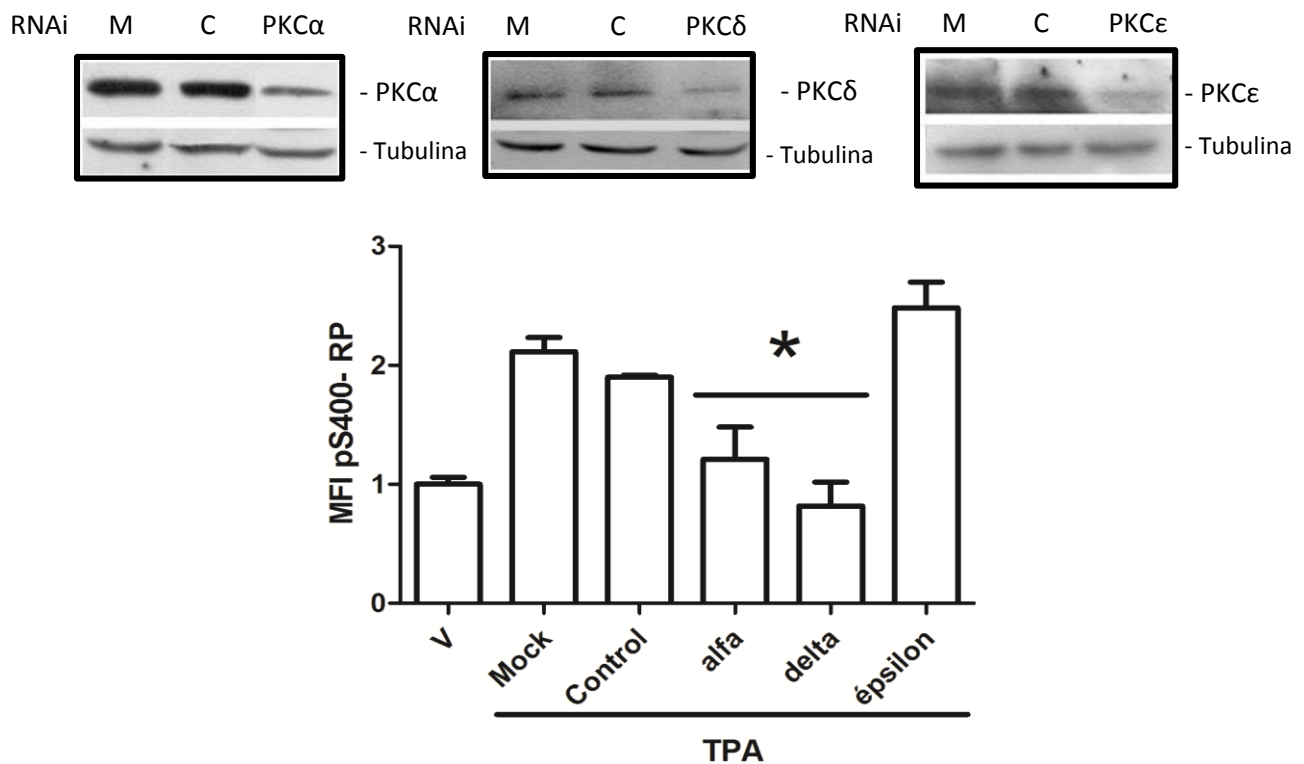


Figura 8. Isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP. Células U373 se trataron con el vehículo (V, DMSO) o se transfectaron con RNAs de interferencia (RNAi) para las isoformas de PKC α , δ y ϵ , Mock (M): células tratadas con el reactivo de transfección sin RNA de interferencia, Control (C): células transfectadas con una secuencia aleatoria de un RNAi que no silencia ningún gen al menos durante 72 h. Posteriormente se trataron con el vehículo (DMSO) o con TPA (1 μ M en DMSO 10%) durante 5 min, transcurrido el tiempo se colectaron, fijaron y trataron con los anticuerpos mencionados. *Panel superior* Western blot que muestra el silenciamiento en el contenido de las isoformas PKC α , δ y ϵ . *Panel inferior* La gráfica muestra las medias de fluorescencia para el RP fosforilado en la serina 400 obtenidas mediante citometría de flujo después del tratamiento con TPA, normalizadas respecto al vehículo. Las gráficas representan la media \pm ES (n=3, *P < 0.05 vs Mock y control).

8.3 Caracterización del efecto de la activación de PKCs sobre el contenido de las isoformas del RP

Con el fin de determinar si la disminución en el receptor fosforilado observada a partir de los 10 min de tratamiento con TPA era debida a la degradación del receptor total o a una desfosforilación del mismo, se detectó por western blot el contenido del receptor total al tratar las células U373 con TPA durante 5, 10, 20, 40, 60, 180 y 300 min.

Los resultados de 3 experimentos independientes muestran que el contenido del RP se mantiene constante, a niveles del vehículo desde los 5 hasta los 60 min de tratamiento con TPA, observándose una disminución significativa de aproximadamente 30% a los 180 y 300 min (Figura 9). Esto indica que la disminución observada en el contenido del receptor fosforilado en la serina 400 no se debe a la disminución en el contenido del receptor total, si no a un proceso de desfosforilación del mismo.

Por otro lado, la disminución en el contenido del RP a los 180 y 300 min sugiere que la activación de PKCs induce la degradación del receptor. Ya se ha reportado que la activación de MAPK induce la fosforilación del RP en el residuo 294, marcándolo para ser degradado por el proteosoma hasta por 12 h, sin embargo, hasta el momento se desconocía si la activación de PKCs también dirigía al RP a ser degradado.

8.4 Papel de PKC α y PKC δ en la degradación del RP inducida por TPA

Una vez observado que la activación de PKCs inducía la degradación del receptor a las 3 y 5 h, se estudió si las isoformas de PKC α y PKC δ que participaban en la fosforilación del receptor lo hacían también en la degradación del mismo, y comprobar además, que la degradación inducida por TPA fuera mediante PKCs.

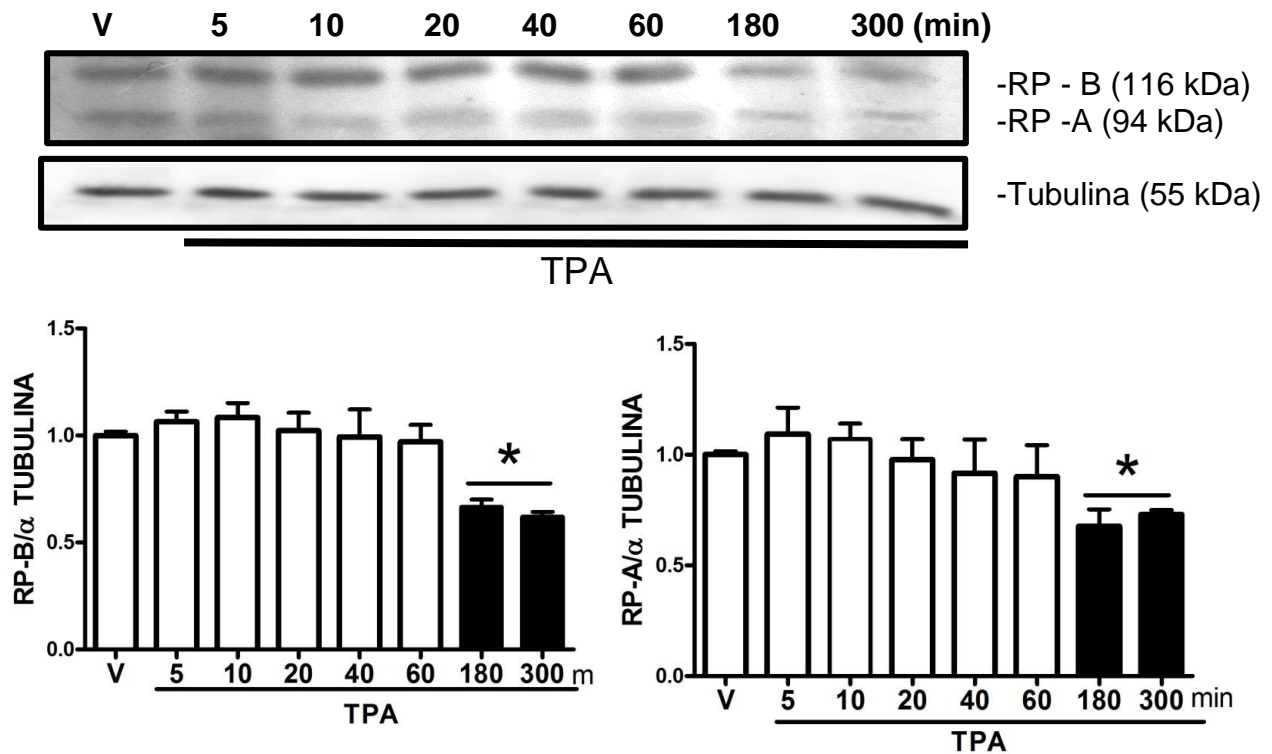


Figura 9. Efecto de la activación de PKC sobre el contenido del RP. Células U373 tratadas con TPA (1 μ M en DMSO 10%) fueron colectadas y lisadas a los 5, 10, 20, 40, 60, 180, y 300 min de tratamiento. *Panel superior* Western blot representativo de 4 experimentos para detectar el RP total y el control de carga, α -tubulina. *Panel inferior* Análisis densitométrico de RP total normalizado a 1 con respecto al vehículo (v), las gráficas muestran la media \pm ES (n=3, *P<0.05 vs control).

Por lo anterior, las células U373 se pretrataron con el inhibidor de PKC α , Gö6976 (Gö 1 μ M) o con el inhibidor de PKC δ , Rottlerin (Rott 100 nM) durante 30 min, posteriormente se trataron con TPA durante 3 o 5 h (Figura 10). Se observó que como en el caso de la Figura 9, el TPA disminuye el contenido de las isoformas del RP a las 3 y 5 h. Además, la inhibición de las isoformas PKC α y PKC δ impidió la degradación del RP inducida por TPA a las 3 y 5 h, por lo que ambas isoformas participan en la regulación de la degradación del RP a las 3 y 5 horas de activación por TPA (Figura 10).

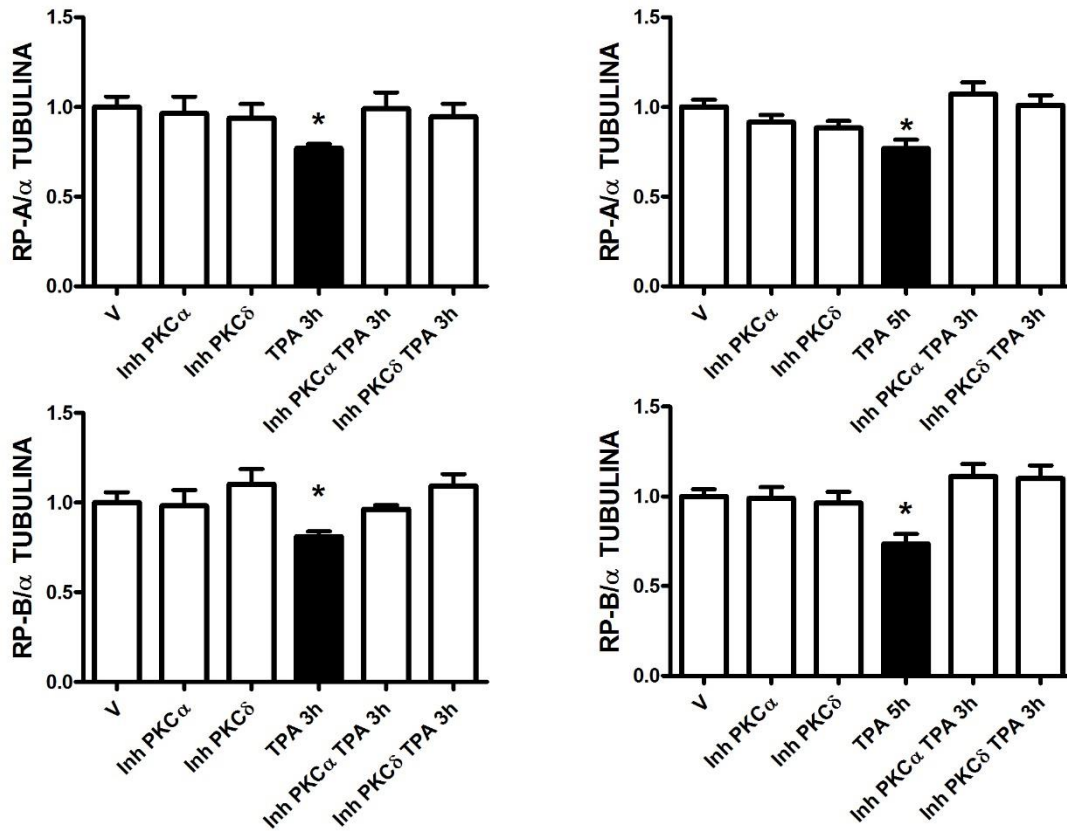
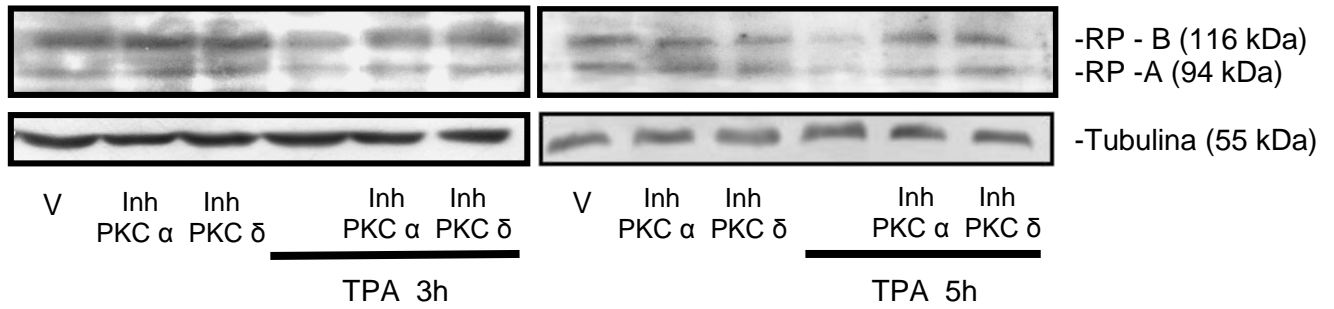


Figura 10. Papel de PKC α y PKC δ en la degradación del RP inducida por TPA. Las células U373 fueron tratadas con o sin el inhibidor (Inh) de PKC α , Gö6976 (Inh PKC α , 1 μ M) o el inhibidor (Inh) de PKC δ , Rottlerina (Inh PKC δ , 100 nM) durante 30 min previo al tratamiento con TPA (1 μ M en DMSO 10% (V)) durante 3 o 5 h. *Panel superior*, Western Blot representativo de 3 experimentos en donde se aprecian las isoformas del RP y la α -tubulina utilizada como control de carga. *Panel inferior* Análisis densitométrico de los receptores RP-A y RP-B total normalizado a 1 con respecto al vehículo, la gráfica muestra la media \pm ES (n=3, *P< 0.05 vs Todos los tratamientos).

8.5 Participación del proteosoma en la degradación del RP inducida por la activación de PKC

Para caracterizar si el proteosoma participa en la degradación del RP inducida por ésteres de forbol, células U373 se pretrataron con el inhibidor del proteosoma MG (1 μ M) durante 30 min y posteriormente se añadió TPA al medio durante 3 y 5 h, tiempos en los que se observó la degradación del receptor.

La Figura 11 muestra que al tratar las células U373 con el MG antes de estimular las PKCs con TPA, se inhibió la degradación de las isoformas del RP, tanto a las 3 como a las 5 horas, indicando que la activación de PKCs induce a la degradación del RP por la vía del proteosoma 26S.

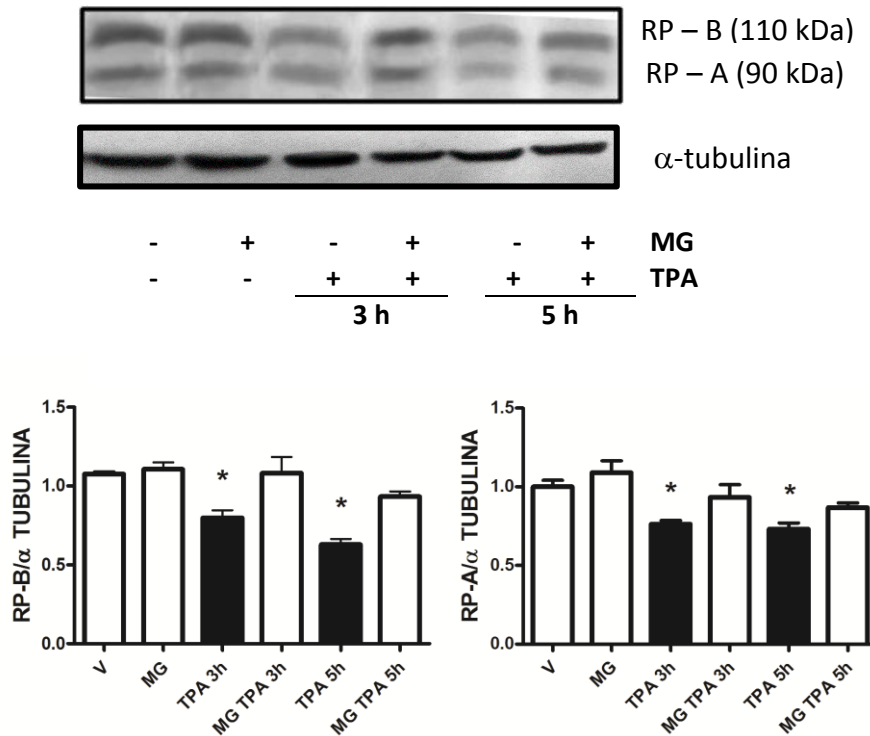


Figura 11. Participación del proteosoma en la degradación del RP inducida por PKCs. Las células U373 fueron tratadas con o sin el inhibidor del proteosoma MG 132 durante 30 min previo al tratamiento con TPA (1 μ M en DMSO 10%) durante 3 o 5 h. *Panel superior*, Western Blot representativo de 3 experimentos en donde se aprecian las isoformas del RP y la α -tubulina utilizada como control de carga. *Panel inferior* Análisis densitométrico de RP total normalizado a 1 con respecto al vehículo, la gráfica muestra la media \pm ES (n=3) (*P< 0.05 vs MG + TPA correspondiente).

9. Discusión

Los astrocitomas representan los tumores más agresivos y frecuentes del Sistema Nervioso Central en el ser humano. Trabajos realizados en nuestro laboratorio indican que la P4, mediante el RP, induce la proliferación de líneas celulares derivadas de este tipo de tumores (González-Agüero et al. 2001; Cabrera-Muñoz, 2009). El RP es una proteína cuya actividad, localización y degradación está regulada de forma importante por modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, la sumoilación y la acetilación. Dado que tanto las PKCs, como el RP son importantes para el crecimiento tumoral, en el presente trabajo se determinó si la PKC participa en la fosforilación del RP, y el impacto de ésta en la degradación del mismo. Utilizando distintos estudios *in silico* se encontramos varios residuos que podrían ser fosforilados directamente por PKC, siendo la serina 400 el residuo con mejor puntaje en la mayoría de los análisis (Wong et al. 2007).

Los resultados muestran que al activar a las PKCs con TPA, un éster de forbol, aumenta el contenido del RP fosforilado en la serina 400. Sin embargo, estos resultados sólo indican que la fosforilación de este residuo es dependiente de PKCs, y no necesariamente que la PKC fosforila al receptor directamente. Para corroborar y comprender mejor esta posible interacción RP-PKC, estudios de co-inmunoprecipitación realizados en nuestro laboratorio indican que al tratar las células U373 con TPA se induce la interacción de las dos isoformas de PKC con el RP desde los 5 minutos hasta 1h (datos no publicados). Esta interacción podría formar parte de un complejo con la C2dC o con otras cinasas, pero son necesarios más experimentos para conocer a fondo las interacciones que podrían darse entre la PKC y el RP.

Como ya se mencionó, se ha reportado que la C2dC puede fosforilar al RP en este residuo y además, se ha reportado que la PKC puede activar a diferentes reguladores del ciclo celular, como las cinasas dependientes de ciclina (Black y Black, 2013). Más estudios son necesarios para poder determinar si la fosforilación observada es mediante esta vía, o si es una fosforilación directa de la PKC al RP.

Después de demostrar que la PKC participa en la fosforilación del RP, se buscó determinar qué isoformas inducibles por TPA participaban en este proceso. Utilizando RNAi se determinó que las isoformas PKC α y PKC δ fosforilan al RP en la serina 400. Se ha reportado que estas cinasas regulan de manera opuesta al ciclo celular, por un lado se ha reportado que, en células de glioma, PKC α promueve proliferación, mientras que PKC δ típicamente actúa como inhibidor en diferentes tipos celulares, aunque no hay datos aún en gliomas (Black y Black, 2013). Cabe resaltar que los efectos de las PKCs dependen en gran medida del tipo celular, ya que tienen una gran variedad de sustratos, y dependiendo del contexto celular, puede haber preferencia por unos u otros. De igual manera, el RP es capaz de inducir la expresión de diversos genes blanco como la ciclina D1, VEGF y EGFR (Hernández-Hernández et al. 2012). Ya que se ha reportado que PKC α y PKC δ , así como el RP pueden regular la progresión del ciclo celular, esto podría indicar que probablemente en contextos fisiológicos y patológicos, el RP podría ser uno de los factores de transcripción que regulen la proliferación inducida por PKCs, aún en ausencia de P4.

Como se mencionó, otro de los efectos de la fosforilación del RP es un aumento en la actividad, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la activación de PKCs aumenta la actividad transcripcional del RP a niveles semejantes a los alcanzados con P4, 24 h después del estímulo con TPA. Dado que el contenido del RP fosforilado en la serina 400 disminuye desde los 10 min, es probable que esta fosforilación sea suficiente para marcar al receptor para ser blanco de otras modificaciones post-traduccionales que afecten la estabilidad y actividad del receptor. Es por esto que aunque el RP se desfosforile en este residuo, el tiempo que estuvo fosforilado bastó para incrementar su actividad e inducir su degradación. Fenómenos semejantes se han reportado en cáncer de mama, en donde la fosforilación del RP impide su sumoilación (Knutson et al. 2012).

Los resultados de degradación indican que el RP permanece estable hasta 1 h después del tratamiento con TPA, y disminuye su contenido a las 3 y 5 h. Estos tiempos de degradación prolongados del RP ya han sido reportados en otros

modelos, sobre todo en cáncer de mama (Lange et al. 2001). Llama la atención que el tiempo que el RP permanece estable coincide con el tiempo en el que se observa la interacción en el complejo con PKC (datos no publicados), resaltando la importancia de estudiar este tipo de interacciones y sus consecuencias en la estabilidad del RP.

Al bloquear a las isoformas PKC α y δ no se observó el aumento en la fosforilación del RP al tratar con TPA las células U373 (Figura 8), por lo tanto, PKC α y δ participan en la fosforilación del receptor. Se observa también que ambas isoformas de PKC participan en la degradación del RP a las 3 y 5 h de tratamiento con TPA (Figura 10), indicando que estas isoformas de PKC regulan el contenido del RP mediante la fosforilación de este receptor. Otro punto a tomar en cuenta es que mucho se ha discutido sobre la especificidad de los inhibidores de PKC (Mackay y Twelves, 2007), ya que al tener dominios tan conservados, no hay inhibidores completamente específicos, y la gran mayoría son capaces de inhibir a varios miembros de la misma familia e incluso de otras familias de PKC. Aun así, son una buena herramienta para hacer aproximaciones, y en el caso del presente proyecto, confirman que la PKC regula la fosforilación del RP y además, su degradación.

En el presente trabajo se encontró que los ésteres de forbol aumentan el contenido del RP fosforilado en la serina 400, e inducen la degradación del receptor. El contenido del RP está relacionado al grado de evolución del tumor, y su activación por ligando induce la proliferación de la línea U373 (González-Agüero et al. 2007), por lo que los mecanismos de su degradación son muy importantes. Para comprender mejor los mecanismos de regulación del contenido del RP en este tipo de líneas, se utilizó el inhibidor del proteosoma MG132. Los resultados muestran que el proteosoma 26S participa en la degradación del receptor inducida por ésteres de forbol. La fosforilación del RP por PKC marca al receptor para que probablemente sea poli-ubiquitinado y marcado para degradación. Ya que la degradación del receptor se ve a tiempos largos (3 y 5 h después del tratamiento con TPA), probablemente haya otros mecanismos de regulación que retarden la

degradación, ya sea en la poli-ubiquitinación o en otras modificaciones post-traduccionales que estén asociadas a la degradación, como la sumoilación.

Otro aspecto importante que se observa en todos los resultados, es que el RP está fosforilado de manera basal, en ausencia de ligando, lo que aumenta su importancia como factor de transcripción en condiciones fisiológicas y patológicas, ya que podría ser activado por una gran variedad de vías de transducción. Aunque típicamente las PKCs se activan por los productos de la PLC (el DAG e IP₃, que aumentan el Ca²⁺ intracelular), las PKCs pueden activarse por muchos mecanismos y participar en una gran diversidad de vías de señalización. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra una relación entre la actividad de PKC y el RP, por lo que este receptor podría estar activo por mecanismos no contemplados en sus vías de activación canónica.

Finalmente, nuestros resultados muestran que la PKC participa en la regulación de la función del RP como su fosforilación y degradación por la vía del proteosoma (Resumido en la Figura 12). Sin embargo, los experimentos realizados no permiten comprobar que la PKC fosforile directamente al receptor o si forma parte de una vía o un complejo que involucre a otras cinasas, como la C2dC. Además, se desconoce si la fosforilación y activación del RP tienen efectos en algunos procesos de malignidad característicos de este tipo de tumores, como la invasividad y la proliferación. Estudios que evalúen estos procesos, como la migración en matrigel y la incorporación de BrdU, nos darían una mejor idea de la importancia de la interacción PKC-RP, además de comprender mejor los mecanismos por los que estos procesos se ven aumentados en gliomas.

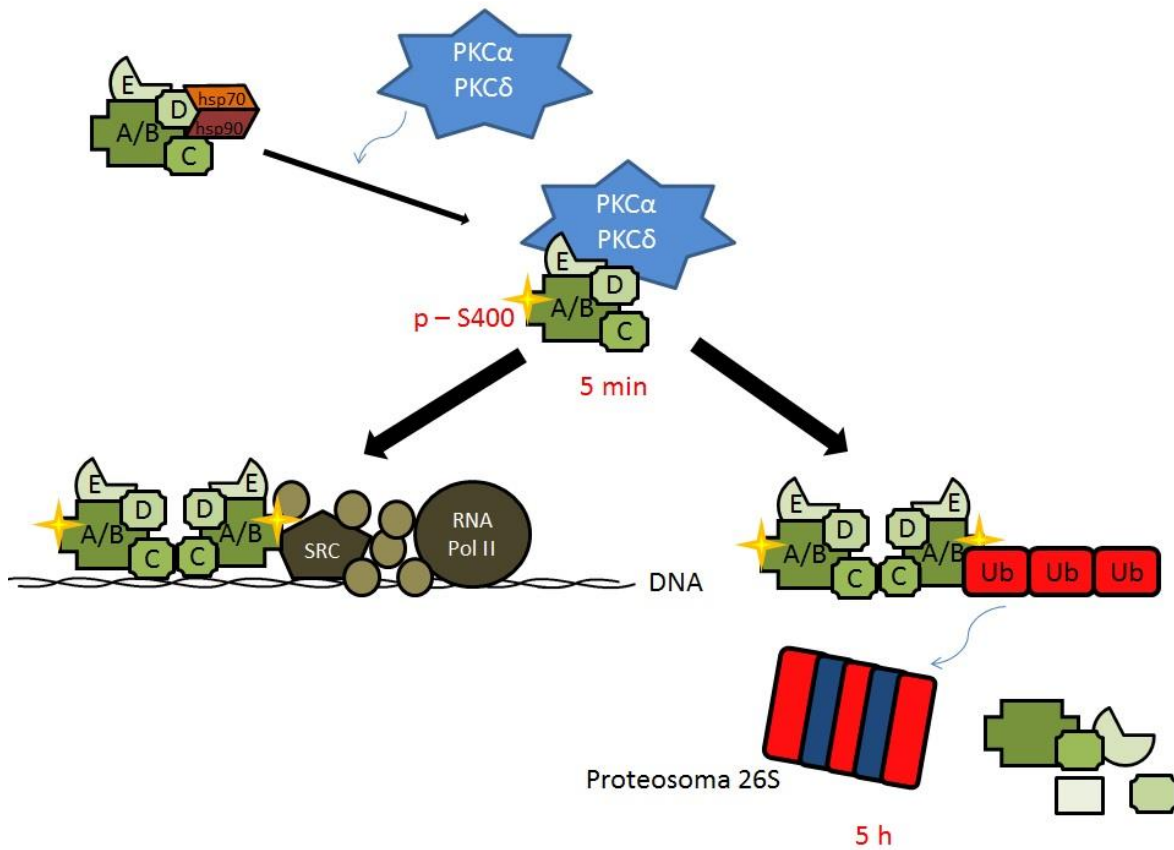


Figura 12. PKC α y δ participan en la fosforilación del RP. La activación de PKCs por TPA induce la fosforilación del RP en la Ser 400 a los 5 min de tratamiento. Dicha fosforilación aumenta su actividad transcripcional e induce la degradación del RP por la vía del proteosoma. Se muestran los siguientes dominios del receptor: A/B, región amino terminal; C, de unión al DNA; D, bisagra; y E, de unión a la hormona. PKC: Proteína cinasa C, SRC: Coactivador de Receptores a Esteroides, RNA Pol II: RNA polimerasa, Ub: Ubiquitina.

10. Conclusiones

En células U373, el TPA induce la fosforilación de la Ser400 del RP a través de las PKCs α y δ .

La activación de PKCs induce la degradación del RP por el proteosoma 26S.

11. Perspectivas

- * Observar la localización celular del RP y PKC después de la activación por TPA o P4.
- * Caracterizar el efecto de la fosforilación del RP por PKC en la migración y proliferación de líneas celulares de astrocitomas humanos.
- * Estudiar las probables interacciones mediadas por PKC del RP con otras cinasas como MAPK o CDK2.
- * Evaluar los mecanismos de activación de PKC por P4, particularmente los que involucren RPs de membrana (mRP).

11. Referencias

- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., y Parada, L.F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 15, 45–56.
- Arbogast, L.A., y Voogt, J.L. (2002). Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* 75, 273–281.
- Arévalo, M.A., Santos-Galindo, M., Acáz-Fonseca, E., Azcoitia, I., y García-Segura, L.M. (2013). Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. *Hormones and Behavior* 63, 216–221.
- Atif, F., Sayeed, I., Yousuf, S., Ishrat, T., Hua, F., Wang, J., Brat, D.J., y Stein, D.G. (2011). Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: in vitro and in vivo evidence. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 17, 1084–1094.
- Aziz, M.H., Hafeez, B.B., Sand, J.M., Pierce, D.B., Aziz, S.W., Dreckschmidt, N.E., y Verma, A.K. (2010). Protein kinase C ϵ mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression y cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2 y ERK1/2). *Oncogene* 29, 3100–3109.
- Backstrom, T., Andreen, L., Birzniece, V., Bjorn, I., Johansson, I.M., Nordenstam-Haghjo, M., Nyberg, S., Sundstrom-Poromaa, I., Wahlstrom, G., Wang, M., et al. (2003). The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome. *CNS Drugs* 17, 325–342.
- Beck, C.A., Weigel, N.L., y Edwards, D.P. (1992). Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding y phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 6, 607–620.
- Black, A.R., y Black, J.D. (2013). Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front Immunol* 3, 423.
- Boonyaratanakornkit, V., y Edwards, D.P. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Seminars in Reproductive Medicine* 25, 139–153.
- Bosco, R., Melloni, E., Celeghini, C., Rimondi, E., Vaccarezza, M., y Zauli, G. (2011). Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. *Mini Rev Med Chem* 11, 185–199.
- Cabrera-Munoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., y Camacho-Arroyo, I. (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113, 80–84.
- Cabrera-Munoz, E., Hernandez-Hernandez, O.T., y Camacho-Arroyo, I. (2011). Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem* 11, 1663–1667.
- Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pelaprat, D., y Di Paolo, T. (2001). Neuroprotective properties of 17 β -estradiol, progesterone y raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse* 41, 131–138.
- Camacho-Arroyo, I., y Rodríguez-Dorantes, M. (2006). Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Research Signpost:25-38*. (Kerala, India: Molecular Endocrinology).

Camacho-Arroyo, I., y Tapia, R. (1992). Levels, uptake y release of glycine and glutamate in the rat pontine reticular formation. *Neurochem Res* 17, 463–467.

Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R., Manjarrez, J., y Tapia, R. (1991a). Microinjections of muscimol and bicuculline into the pontine reticular formation modify the sleep-waking cycle in the rat. *Neurosci Lett* 129, 95–97.

Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R., y Tapia, R. (1991b). Release of acetylcholine and GABA y activity of their synthesizing enzymes in the rat pontine reticular formation. *Neurochem Res* 16, 837–841.

Camacho-Arroyo, I., Perez-Palacios, G., Pasapera, A.M., y Cerbon, M.A. (1994a). Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50, 299–303.

Camacho-Arroyo, I., Ruiz, A., Gamboa-Dominguez, A., Perez-Palacios, G., y Cerbon, M.A. (1994b). Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocrinol* 142, 311–316.

Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Perez-Palacios, G., y Cerbon, M.A. (1995). [Progesterone and its metabolites in central nervous system function]. *Rev Invest Clin* 47, 329–340.

Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., y Cerbon, M.A. (1996). Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 214, 25–28.

Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Dominguez, R., Mendoza-Rodríguez, C.A., Cruz, M.E., y Cerbon, M.A. (1998a). C-fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci* 62, 1153–1159.

Camacho-Arroyo, I., Mendez-Cruz, S.T., Guerra-Araiza, C., y Cerbon, M.A. (1998b). Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol* 157, 71–74.

Camacho-Arroyo, I., González-Aguero, G., Gamboa-Dominguez, A., Cerbon, M.A., y Ondarza, R. (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* 49, 1–7.

Camacho-Arroyo, I., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., y Guerra-Araiza, C. (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76, 267–271.

Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González-Aguero, G., Guerra-Araiza, C., y González-Moran, G. (2003). Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 136, 447–452.

Camacho-Arroyo, I., Neri-Gomez, T., González-Arenas, A., y Guerra-Araiza, C. (2005). Changes in the content of steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors in the rat brain during the estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 267–272.

Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., y González-Moran, G. (2007a). 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, 644–652.

Camacho-Arroyo, I., Hernandez-Molina, V.I., Rivas-Suarez, M., Guerra-Araiza, C., y González-Moran, M.G. (2007b). Changes in progesterone receptor isoforms content in the brain of immature, mature and aged male and female chickens. *Gen Comp Endocrinol* 150, 381–385.

Camacho-Arroyo, I., Mendoza-Rodríguez, C.A., Mendoza-Garces, L., Vanoye-Carlo, A., y Cerbon, M. (2007c). Progesterone receptor mRNA expression and distribution in the female rabbit brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 100–104.

Camacho-Arroyo, I., Lopez-Griego, L., y Morales-Montor, J. (2009). The role of cytokines in the regulation of neurotransmission. *Neuroimmunomodulation* 16, 1–12.

Cervantes, M., González-Vidal, M.D., Ruelas, R., Escobar, A. y Morali, G. (2002). Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res* 33, 6–14.

Conneely, O.M., y Jericevic, B.M. (2002). Progesterone regulation of reproductive function through functionally distinct progesterone receptor isoforms. *Rev Endocr Metab Disord* 3, 201–209.

Conneely, O.M., Maxwell, B.L., Toft, D.O., Schrader, W.T., y O'Malley, B.W. (1987). The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 493–501.

Daniel, A.R., y Lange, C.A. (2009). Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14287–14292.

Daniel, A.R., Faivre, E.J., y Lange, C.A. (2007). Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 21, 2890–2906.

Denning, M.F., Dlugosz, A.A., Threadgill, D.W., Magnuson, T., y Yuspa, S.H. (1996). Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J Biol Chem* 271, 5325–5331.

Deutsch, E.R., Espinoza, T.R., Atif, F., Woodall, E., Kaylor, J. y Wright, D.W. (2013). Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. *Brain Research* 1530, 82–105.

Dressing, G.E., Hagan, C.R., Knutson, T.P., Daniel, A.R. y Lange, C. a (2009). Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. *Endocrine-related Cancer* 16, 351–361.

Dressing, G.E., Goldberg, J.E., Charles, N.J., Schwertfeger, K.L. y Lange, C. a (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids* 76, 11–17.

Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M.W., Strick, R. y Strissel, P.L. (2009). Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 66, 2405–2426.

Engel, S.R., Purdy, R.H. y Grant, K.A. (2001). Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 489–495.

Espinosa-García, C., Viguera-Villaseñor, R.M., Rojas-Castañeda, J.C., Aguilar-Hernández, A., Monfil, T., Cervantes, M. y Morali, G. (2013). Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* 550, 98–103.

Etgen, A.M., Ansonoff, M.A. y Quesada, A. (2001). Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology. *Horm Behav* 40, 169–177.

Felix, C.A., Slavic, I., Dunn, M., Strauss, E.A., Phillips, P.C., Rorke, L.B., Sutton, L., Bunin, G.R. y Biegel, J.A. (1995). p53 gene mutations in pediatric brain tumors. *Med Pediatr Oncol* 25, 431–436.

Finocchi, C. y Ferrari, M. (2011). Female reproductive steroids and neuronal excitability. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 32 Suppl 1, S31–5.

Freeman, E.W., Frye, C.A., Rickels, K., Martin, P.A. y Smith, S.S. (2002). Allopregnanolone levels and symptom improvement in severe premenstrual syndrome. *J Clin Psychopharmacol* 22, 516–520.

Fujimoto, J., Ichigo, S., Hirose, R., Sakaguchi, H. y Tamaya, T. (1997). Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62, 449–454.

Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology y paths to treatment. *Genes & Development* 21, 2683–2710.

Gellersen, B., Fernandes, M.S. y Brosens, J.J. (2009). Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Human Reproduction Update* 15, 119–138.

Genazzani, A.R., Stomati, M., Morittu, A., Bernardi, F., Monteleone, P., Casarosa, E., Gallo, R., Salvestrioni, C. y Luisi, M. (2000). Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Hum Reprod* 15 Suppl 1, 14–27.

Giangrande, P.H. y McDonnell, D.P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 54, 291–294.

Gomez, C., Saldivar-González, A., Delgado, G. y Rodríguez, R. (2002). Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 543–550.

González-Aguero, G., Ondarza, R., Gamboa-Dominguez, A., Cerbon, M.A. y Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56, 43–48.

González-Aguero, G., Gutierrez, A.A., González-Espinosa, D., Solano, J.D., Morales, R., González-Arenas, A., Cabrera-Munoz, E. y Camacho-Arroyo, I. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32, 129–135.

- González-Arenas, A. y Hernandez-Hernandez, T. (2011). Papel de la progesterona y sus receptores en la proliferación celular de astrocitomas humanos (México,DF: UAM-PUIS).
- González-Arenas, A., Villamar-Cruz, O., Guerra-Araiza, C. y 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.
- González-Arenas, A., Aguilar-Maldonado, B., Avendano-Vazquez, S.E. y Garcia-Sainz, J.A. (2006). Estrogens cross-talk to alpha1b-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 70, 154–162.
- González-Arenas, A. y Agramonte-Hevia, J. (2012). Sex steroid hormone effects in normal and pathologic conditions in lung physiology. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 12, 1055–1062.
- González-Arenas, A., Piña-Medina, A.G., González-Flores, O., Galván-Rosas, A., Porfirio Gómora-Arrati y Camacho-Arroyo, I. (2013). Sex hormones and expression pattern of cytoskeletal proteins in the rat brain throughout pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
- González-Flores, O., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Miranda-Martínez, A., Armengual-Villegas, A., Camacho-Arroyo, I. y Guerra-Araiza, C. (2011). Progesterone receptor isoforms differentially regulate the expression of tryptophan and tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in the rat hypothalamus. *Neurochemistry International* 59, 671–676.
- Graham, J.D. y Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502–519.
- Guerra-Araiza, C. y Camacho-Arroyo, I. (2000). [Progesterone receptor isoforms: function and regulation]. *Rev Invest Clin* 52, 686–691.
- Guerra-Araiza, C., Reyna-Neyra, A., Salazar, A.M., Cerbon, M.A., Morimoto, S. y Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res Bull* 54, 13–17.
- Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R. y Camacho-Arroyo, I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 15, 984–990.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, M.A., Camacho-Arroyo, I. y Garcia-Segura, L.M. (2007). Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein tau in the rat cerebellum. *Dev Neurobiol* 67, 510–520.
- Guerra-Araiza, C., Miranda-Martinez, A., Neri-Gomez, T. y Camacho-Arroyo, I. (2008a). Sex steroids effects on the content of GAD, TH, GABA(A) y glutamate receptors in the olfactory bulb of the male rat. *Neurochem Res* 33, 1568–1573.
- Guerra-Araiza, C., Miranda-Martinez, A., Neri-Gómez, T. y Camacho-Arroyo, I. (2008b). Sex steroids effects on the content of GAD, TH, GABA(A) y glutamate receptors in the olfactory bulb of the male rat. *Neurochemical Research* 33, 1568–1573.
- Guerra-Araiza, C., Gomora-Arrati, P., Garcia-Juarez, M., Armengual-Villegas, A., Miranda-Martinez, A., Lima-Hernandez, F.J., Camacho-Arroyo, I. y González-Flores, O. (2009). Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90, 73–81.

- Hagan, C.R., Daniel, A.R., Dressing, G.E. y Lange, C.A. (2012). Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol Cell Endocrinol* 357, 43–49.
- Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M.A., García-Gómez, E., Rodríguez-Dorantes, M. y Camacho-Arroyo, I. (2013). The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 78, 500–507.
- Hernandez-Hernandez, O.T. y Camacho-Arroyo, I. (2013). Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF. *Mini Rev Med Chem* 13, 635–642.
- Hernandez-Hernandez, O.T., González-García, T.K. y Camacho-Arroyo, I. (2012). Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 132, 127–134.
- Hill, K.K., Roemer, S.C., Churchill, M.E. a y Edwards, D.P. (2012). Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 418–429.
- Hulleman, E. y Helin, K. (2005). Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res* 94, 1–27.
- Huse, J.T., Phillips, H.S. y Brennan, C.W. (2012). Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia* 59, 1190–1199.
- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A. y Korach, K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4658–4662.
- Jacobsen, B.M. y Horwitz, K.B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357, 18–29.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. y Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* 9, 1603–1614.
- Kazmi, S.M., Visconti, V., Plante, R.K., Ishaque, A. y Lau, C. (1993). Differential regulation of human prKazmi, S. M., Visconti, V., Plante, R. K., Ishaque, A., & Lau, C. (1993). Differential regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated trans-activation by phosphorylation. *Endocrinology*, 133(3), 1230–1238. *Endocrinology* 133, 1230–1238.
- Khalid, H., Shibata, S., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Iseki, M. y Hiura, T. (1997). Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 80, 2133–2140.
- Khan, J. a, Amazit, L., Bellance, C., Guiochon-Mantel, A., Lombès, M. y Loosfelt, H. (2011). p38 and p42/44 MAPKs differentially regulate progesterone receptor A and B isoform stabilization. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 25, 1710–1724.
- Kim, J.J., Kurita, T. y Bulun, S.E. (2013). Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids y breast cancer. *Endocrine Reviews* 34, 130–162.

- Knotts, T.A., Orkiszewski, R.S., Cook, R.G., Edwards, D.P. y Weigel, N.L. (2001). Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem* 276, 8475–8483.
- Knutson, T.P., Daniel, A.R., Fan, D., Silverstein, K.A., Covington, K.R., Fuqua, S.A. y Lange, C.A. (2012). Phosphorylated and sumoylation-deficient progesterone receptors drive proliferative gene signatures during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 14, R95.
- Konopatskaya, O. y Poole, A.W. (2009). Protein kinase Calpha: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci* 31, 8–14.
- Koonce, C.J. y Frye, C. a (2013). Progesterone facilitates exploration, affective and social behaviors among wildtype, but not 5 α -reductase Type 1 mutant, mice. *Behavioural Brain Research* 253, 232–239.
- Lange, C. a (2008). Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108, 203–212.
- Lange, C.A. (2004). Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol* 18, 269–278.
- Lange, C.A. y Yee, D. (2008). Progesterone and breast cancer. *Women's Health (London, England)* 4, 151–162.
- Lange, C.A., Shen, T. y Horwitz, K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1032–1037.
- Li, W., Yu, J.C., Shin, D.Y. y Pierce, J.H. (1995). Characterization of a protein kinase C-delta (PKC-delta) ATP binding mutant. An inactive enzyme that competitively inhibits wild type PKC-delta enzymatic activity. *J Biol Chem* 270, 8311–8318.
- Lima, F.R., Kahn, S.A., Soletti, R.C., Biasoli, D., Alves, T., da Fonseca, A.C., Garcia, C., Romao, L., Brito, J., Holanda-Afonso, R., et al. (2012). Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochim Biophys Acta* 1826, 338–349.
- Lin, C.W., Shen, S.C., Chien, C.C., Yang, L.Y., Shia, L.T. y Chen, Y.C. (2010). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKCalpha/ERK/NF-kappaB-dependent MMP-9 expression. *J Cell Physiol* 225, 472–481.
- Liu, Z., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (2001). Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12426–12431.
- Louis, D.N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review of Pathology* 1, 97–117.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. y Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 114, 97–109.
- Mackay, H.J. y Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 7, 554–562.

- Martiny-Baron, G. y Fabbro, D. (2007). Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res* 55, 477–486.
- Medina, V.M., Dawson-Basoa, M.E. y Gintzler, A.R. (1993). 17 beta-estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: relevance to the analgesia of pregnancy. *Neuroendocrinology* 58, 310–315.
- Melcangi, R.C., Magnaghi, V., Galbiati, M. y Martini, L. (2001). Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int Rev Neurobiol* 46, 145–176.
- Le Mercier, M., Hastir, D., Moles Lopez, X., De Neve, N., Maris, C., Trepant, A.L., Rorive, S., Decaestecker, C. y Salmon, I. (2012). A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One* 7, e45475.
- Murphy, L.J., Sutherland, R.L., Stead, B., Murphy, L.C. y Lazarus, L. (1986). Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 46, 728–734.
- Musgrove, E.A. y Sutherland, R.L. (1991). Steroids, growth factors y cell cycle controls in breast cancer. *Cancer Treat Res* 53, 305–331.
- Musgrove, E.A. y Sutherland, R.L. (1993). Acute effects of growth factors on T-47D breast cancer cell cycle progression. *Eur J Cancer* 29A, 2273–2279.
- Musgrove, E.A., Lee, C.S. y Sutherland, R.L. (1991). Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos y c-myc genes. *Mol Cell Biol* 11, 5032–5043.
- Musgrove, E.A., Hamilton, J.A., Lee, C.S., Sweeney, K.J., Watts, C.K. y Sutherland, R.L. (1993). Growth factor, steroid y steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13, 3577–3587.
- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9, 161–167.
- Nguyen, J.P., Caron, J.P., Gaston, A., Louarn, F. y Poirier, J. (1984). [Anatomo-radiological correlations in astrocytic cerebral tumors]. *Neurochirurgie* 30, 11–15.
- Nillni, Y.I., Toufexis, D.J. y Rohan, K.J. (2011). Anxiety sensitivity, the menstrual cycle y panic disorder: a putative neuroendocrine and psychological interaction. *Clinical Psychology Review* 31, 1183–1191.
- Nilsen, J. y Brinton, R.D. (2002). Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 143, 205–212.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.-J., Songyang, Z. y Cantley, L. (1997). Determination of the Specific Substrate Sequence Motifs of Protein Kinase C Isozymes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 952–960.
- Omulecka, A., Papierz, W., Nawrocka-Kunecka, A. y Lewy-Trenda, I. (2006). Immunohistochemical expression of progesterone and estrogen receptors in meningiomas. *Folia Neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 44, 111–115.

- Pierson-Mullany, L.K. y Lange, C.A. (2004). Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol Cell Biol* 24, 10542–10557.
- Pluchino, N., Cubeddu, A., Giannini, A., Merlini, S., Cela, V., Angioni, S. y Genazzani, A.R. (2009). Progestogens and brain: an update. *Maturitas* 62, 349–355.
- Rodríguez-Dorantes, M., Lizano-Soberon, M., Camacho-Arroyo, I., Calzada-Leon, R., Morimoto, S., Tellez-Ascencio, N. y Cerbon, M.A. (2002). Evidence that steroid 5alpha-reductase isozyme genes are differentially methylated in human lymphocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 323–330.
- Rodríguez-González, A., Cyrus, K., Salcius, M., Kim, K., Crews, C.M., Deshaies, R.J. y Sakamoto, K.M. (2008). Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer. *Oncogene* 27, 7201–7211.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J.M. y Garabedian, M.J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274, 22296–22302.
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A.J., Boeckeler, K. y Parker, P.J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 103–112.
- Rowan, B.G., Weigel, N.L. y O'Malley, B.W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275, 4475–4483.
- Sánchez, M.G., Bourque, M., Morissette, M. y Di Paolo, T. (2010). Steroids-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 16, e43–71.
- Sarkar, S. y Yong, V.W. (2009). Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix. *J Neurooncol* 91, 157–164.
- Sarkar, S. y Yong, V.W. (2010). Reduction of protein kinase C delta attenuates tenascin-C stimulated glioma invasion in three-dimensional matrix. *Carcinogenesis* 31, 311–317.
- Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P. a y Clarke, C.L. (2009). Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nuclear Receptor Signaling* 7, e009.
- Schumacher, M., Coirini, H., Robert, F., Guennoun, R. y El-Etr, M. (1999). Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res* 105, 37–52.
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J.-P., Mattern, C. y Ghoumari, A.M. (2012). Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in Neuroscience* 6, 10.
- Sharif, T.R. y Sharif, M. (1999). Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J Oncol* 15, 237–243.

Shen, T., Horwitz, K.B. y Lange, C.A. (2001). Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21, 6122–6131.

Sheridan, P.L., Evans, R.M. y Horwitz, K.B. (1989). Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem* 264, 6520–6528.

Singh, M. y Su, C. (2013). Progesterone and neuroprotection. *Hormones and Behavior* 63, 284–290.

Skildum, A., Faivre, E. y Lange, C.A. (2005). Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19, 327–339.

Soltoff, S.P. y Toker, A. (1995). Carbachol, substance P y phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in salivary gland epithelial cells. *J Biol Chem* 270, 13490–13495.

Steinberg, S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88, 1341–1378.

Sutherland, R.L., Prall, O.W., Watts, C.K. y Musgrove, E.A. (1998). Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 63–72.

Takimoto, G.S., Hovland, A.R., Tasset, D.M., Melville, M.Y., Tung, L. y Horwitz, K.B. (1996). Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 271, 13308–13316.

Tata, J.R. (2002). Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 702–710.

Techasen, A., Loilome, W., Namwat, N., Takahashi, E., Sugihara, E., Puapairoj, A., Miwa, M., Saya, H. y Yongvanit, P. (2009). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation promotes cholangiocarcinoma cell migration and metastasis via the protein kinase C-dependent pathway. *Cancer Sci* 101, 658–665.

Terán-Pérez, G., Arana-Lechuga, Y., Esqueda-León, E., Santana-Miranda, R., Rojas-Zamorano, J.Á. y Velázquez Moctezuma, J. (2012). Steroid hormones and sleep regulation. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 12, 1040–1048.

Thomas, P. y Pang, Y. (2012). Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology* 96, 162–171.

Tomiya, T., Kang, J.H., Toita, R., Niidome, T. y Katayama, Y. (2009). Protein kinase Calpha-responsive polymeric carrier: its application for gene delivery into human cancers. *Cancer Sci* 100, 1532–1536.

Treviño, L.S., Bingman, W.E., Edwards, D.P. y NI, W. (2013). The requirement for p42/p44 MAPK activity in progesterone receptor-mediated gene regulation is target gene-specific. *Steroids* 78, 542–547.

- Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451–486.
- Turgeon, J.L. y Waring, D.W. (2000). Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology* 141, 3422–3429.
- Valenzuela, J.I., Hasan, S.J. y Steeves, J.D. (1990). Stimulation of the brainstem reticular formation evokes locomotor activity in embryonic chicken (in ovo). *Brain Res Dev Brain Res* 56, 13–18.
- Vicent, G.P., Nacht, a S., Zaurín, R., Ballaré, C., Clausell, J. y Beato, M. (2010). Minireview: role of kinases and chromatin remodeling in progesterone signaling to chromatin. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) 24, 2088–2098.
- Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R. y Camacho-Arroyo, I. (2006a). Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors y their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull* 69, 276–281.
- Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R. y Camacho-Arroyo, I. (2006b). Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors y their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull* 69, 276–281.
- Ward, R.D. y Weigel, N.L. (2010). NIH Public Access. 35, 528–536.
- Wang, S., Li, Y., Hsu, P.-H., Lee, S.-Y., Kim, Y. y Lee, E.Y.-H.P. (2013). Progesterone receptor A stability is mediated by glycogen synthase kinase-3 β in the Brca1-deficient mammary gland. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 26265–26274.
- Weigel, N.L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319 (Pt 3, 657–667.
- Wong, Y.-H., Lee, T.-Y., Liang, H.-K., Huang, C.-M., Wang, T.-Y., Yang, Y.-H., Chu, C.-H., Huang, H.-D., Ko, M.-T. y Hwang, J.-K. (2007). KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Research* 35, W588–94.
- York, B. y O'Malley, B.W. (2010). Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 38743–38750.
- Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P. y Weigel, N.L. (1994). Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* 269, 31034–31040.
- Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P. y Weigel, N.L. (1995). Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 9, 1029–1040.
- Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Clement, J.P. th, Prendergast, P., Yip, T.T., Hutchens, T.W., Edwards, D.P. y Weigel, N.L. (1997). Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 11, 823–832.
- Zwain, I.H. y Yen, S.S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes y neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140, 3843–3852.

“.. diciéndose que al fin y al cabo algún encuentro había, aunque no pudiera durar más que ese instante terriblemente dulce en el que lo mejor sin lugar a dudar hubiera sido inclinarse apenas hacia afuera y dejarse ir, **paf se acabó**”

- Julio Cortázar. *Rayuela*, Capítulo 56.