



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DEL FACTOR DE BLOQUEO INDUCIDO POR
PROGESTERONA (PIBF) EN LA PROLIFERACIÓN Y EN LA
FOSFORILACIÓN DE LAS CINASAS JANUS (JAK) EN
CELULAS DERIVADAS DE ASTROCITOMAS HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MÓNICA LÓPEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

VOCAL: Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez

SECRETARIO: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

1er. SUPLENTE: Dra. Olivia Tania Hernández Hernández

2do. SUPLENTE: Dra. Carolina Guzmán Arriaga

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 107 EDIFICIO “F”,
FACULTAD DE QUÍMICA, Av. Universidad no. 3000, Universidad Nacional
Autónoma de México, C.U., Distrito Federal, 04510.**

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

SUSTENTANTE: MÓNICA LÓPEZ SÁNCHEZ

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1 Tumores cerebrales.....	3
3.1.1 Generalidades.....	3
3.1.2 Astrocitomas.....	3
3.2 Progesterona.....	9
3.2.1 Estructura y función de la progesterona (P4).....	9
3.2.2 Mecanismo de acción.....	13
3.3 Receptores intracelulares a P4 (RP).....	15
3.3.1 Características.....	15
3.3.2 Isoformas del RP.....	18
3.4 Factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF).....	19
3.4.1 Características.....	19
3.4.2 P4, PIBF y cáncer.....	23
3.5 Proteínas JAK.....	25
4. Planteamiento del problema	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivos	30
6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos particulares.....	30
7. Metodología	30
7.1 Cultivo celular.....	30
7.2 Crecimiento celular.....	31
7.3 Extracción de proteínas totales.....	31
7.4 Coinmunoprecipitación.....	32
7.5 Western blot.....	32
7.6 Análisis densitométrico y estadístico.....	34

8. Resultados	34
8.1 Efecto del PIBF en la proliferación de las células U373 derivadas de astrocitomas humanos grado III.....	34
8.2 Estudio del efecto del PIBF y la P4 en la fosforilación de la proteína JAK en células U373.....	36
8.3 Determinación de la asociación entre el PIBF y el receptor de IL-4 en la línea celular U373.....	37
9. Discusión	38
10. Conclusiones	40
11. Referencias	41

1. RESUMEN

La progesterona (P4) es una hormona esteroide que participa en la regulación de procesos patológicos como el cáncer y se ha propuesto que puede regular el crecimiento de los astrocitomas, que son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano. Evidencia experimental reciente sugiere que la P4 induce el desarrollo de distintos tipos de tumores a través de la sobreexpresión del Factor de Bloqueo Inducido por Progesterona (PIBF). Las cinasas asociadas Janus (JAK) son responsables de la activación de STAT6 y se sabe que el PIBF y la P4 pueden ejercer sus efectos a través de la activación de la proteína STAT6, la cual es activada por la interleucina 4 (IL-4). Sin embargo, se desconoce el papel del PIBF en el crecimiento de la línea U373 derivada de astrocitomas humanos de alta malignidad, el efecto de éste y de la P4 en la fosforilación de JAK, así como el mecanismo por el cual se induce la fosforilación de las proteínas STAT6 en astrocitomas humanos, por lo que en el presente trabajo se determinaron dichos efectos, mediante las técnicas de tinción por exclusión y Western blot en la línea celular U373. Los resultados mostraron que al día 4 de cultivo el PIBF (200 ng/mL) y el tratamiento conjunto de P4+PIBF incrementaron el número de células. Por otra parte, no se observó un efecto sinérgico de P4+PIBF sobre el incremento en el número de células, lo que sugiere que el PIBF y la P4 podrían ejercer sus efectos a través de vías de activación en común. En los estudios para conocer el mecanismo por el que se induce la fosforilación de las proteínas STAT6, se observó que existe la asociación del PIBF con el receptor a IL-4 (RIL-4), lo que nos indica que la inducción de las proteínas STAT6 por el PIBF en esta línea celular podría darse a través de la activación del RIL-4. Los estudios de fosforilación revelaron que las células U373 tratadas durante 20 minutos con PIBF muestran un aumento significativo en la expresión de JAK fosforilada respecto a las tratadas durante 24 horas con vehículo y P4. Estos datos sugieren que el PIBF es capaz de inducir la fosforilación de la proteína JAK en esta línea celular, lo cual puede estar relacionado con los efectos del PIBF en el aumento del número de células de la línea U373.

2. INTRODUCCIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen una causa frecuente de muerte en la población mundial. Dentro de éstos, los tumores derivados de células gliales (gliomas) representan más del 50% de ellos y se registran aproximadamente 6.5 casos por cada 100,000 personas por año. Los astrocitomas son un tipo de glioma y representan el 40-50% de todos los tumores del SNC y hasta 70% de los gliomas. El astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme (GBM) (grados III y IV) son las variantes más malignas y frecuentes de los tumores astrocíticos. El pronóstico de los pacientes con astrocitomas depende del grado de malignidad del tumor, localización y tamaño; sin embargo, el tiempo de supervivencia de los pacientes con diagnóstico de gliomas astrocíticos de alta malignidad es corto. Estas lesiones son generalmente incurables y, a pesar de los tratamientos y terapias existentes, dentro de los primeros 2 años después del diagnóstico, el 90% de los pacientes fallece (Pérez et al., 2001).

Se han encontrado diversos factores asociados con el desarrollo y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar et al., 2009). Existen informes que sugieren que las hormonas sexuales, entre las que se encuentra la progesterona (P4), pueden participar en el crecimiento de los astrocitomas (Camacho-Arroyo et al., 2000; Gonzalez-Agüero et al., 2007; Gonzalez-Agüero et al., 2001) a través de la interacción con su receptor intracelular (RP) y que la administración de su antagonista, el RU486 bloquea los efectos de la P4 (Cabrera-Muñoz et al., 2009; Gonzalez-Agüero et al., 2007; Ramaswamy et al., 2012).

Varios estudios han mostrado que la P4 regula positivamente la expresión del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) a través de su interacción con el RP en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos grado III (Valadez, 2013).

También se ha observado que el PIBF y la P4 pueden ejercer sus efectos en estas mismas células a través de la activación de STAT6 (Valadez, 2013).

Sin embargo, se desconoce el papel del PIBF en el crecimiento celular de la línea U373, el mecanismo por el cual el PIBF activa a las proteínas STAT6 y el

efecto del PIBF sobre la fosforilación de JAK (involucrado en el mecanismo de activación de las proteínas STAT6) en estas células. Por esta razón en este trabajo se estudiaron dichos aspectos en la línea celular U373.

3. ANTECEDENTES

3.1. Tumores cerebrales

3.1.1 Generalidades

La incidencia anual de tumores cerebrales primarios a nivel mundial es de aproximadamente siete por cada 100 mil individuos (Furnari et al., 2007; Xie, 2009), de los cuales los gliomas representan el 70% (Schwartzbaum et al., 2006). Los gliomas son tumores neuroectodérmicos que tienen características de células gliales, pero se desconoce su origen. En un principio se creía que surgían a partir de células gliales bien diferenciadas, pero hoy en día se piensa que existen eventos oncogénicos en células fetales en proliferación. Se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se encuentran en el adulto y tienen una alta capacidad de proliferar y migrar, por lo que son potenciales progenitores de tumores gliales (Alcantara Llaguno et al., 2009; Louis et al., 2007).

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 (Kim et al., 1991). Todos los gliomas son más frecuentes en hombres que en mujeres (3:2) (Schwartzbaum et al., 2006).

3.1.2 Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales que se pueden originar de los astrocitos, que son un tipo de célula glial, por lo que, un astrocitoma es un tipo de glioma (Badash, 2009). Evidencias sugieren que la capacidad de un tumor para crecer y propagarse es dependiente de un pequeño subconjunto de células dentro

de un tumor, denominadas células troncales cancerosas. Estas pueden originarse por la auto-renovación y las vías de diferenciación que ocurren en células madre multi-potenciales, células madre específicas de tejido, células progenitoras y células cancerosas. Se ha demostrado que las células troncales cancerosas tienen un papel en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de ovario, mama, cerebro, próstata, páncreas, hepatocelular, de cabeza, cuello y tumores hematológicos (Moorthy P Ponnusamy and Surinder K Batra., 2008). Los astrocitomas son las neoplasias cerebrales más comunes en humanos, se presentan principalmente en adultos de entre 50 y 70 años y poseen un alto potencial de malignidad (Gonzalez-Agüero et al., 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a los astrocitomas según sus características histológicas (presencia de atipia, proporción de células en mitosis, proliferación endotelial y necrosis), capacidad de invasión y progresión, en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV los de mayor agresividad (Tabla 1).

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 1. Clasificación de los grados de astrocitomas humanos. La tabla muestra las características de los diferentes astrocitomas dependiendo del grado de los mismos (I-IV; Basada en Hüllerman, 2005).

En general, los primeros síntomas a causa de estos tumores pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debido al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, ataques, cambios de personalidad, demencia o problemas con la memoria, el aprendizaje, la concentración y problemas motores. Los síntomas subsecuentes varían dependiendo de la localización del astrocitoma (Badash, 2009) y se ha reportado que la sobrevivencia de los pacientes está inversamente relacionada al grado del tumor (Daumas-Duport et al., 1988).

Los astrocitomas de grado I, también conocidos como astrocitomas pilocíticos, son tumores relativamente delimitados, de crecimiento lento, que suele ser quístico y se presentan principalmente en niños y adultos jóvenes. Afectan más comúnmente al cerebelo, hipotálamo, nervio y quiasma ópticos, tálamo, ganglios basales, tallo cerebral y hemisferios cerebrales. Se caracterizan por un patrón bifásico de tejidos compacto (densos agregados de astrocitos bipolares alargados) y laxo (astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos). Las células que componen al astrocitoma grado I presentan fuerte inmunopositividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sarkar et al., 2009). Estos tumores usualmente pueden ser eliminados mediante resección quirúrgica (total o parcial) y/o radio/quimioterapia (Bristol, 2009). En la mayoría de los casos donde el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las probabilidades de supervivencia son mayores a 20 años en más del 85% de los casos (Tihan and Bloomer, 2010).

Los astrocitomas de grado II, también conocidos como astrocitomas difusos o infiltrantes, afectan comúnmente a adultos entre 30 y 40 años de edad y tienen una tendencia intrínseca hacia la progresión a astrocitomas anaplásicos y en el peor de los casos a glioblastomas. Estos tumores están caracterizados por un alto grado de diferenciación, bajo grado de infiltración difusa en el cerebro, lento crecimiento celular y bordes no definidos. Se presentan comúnmente en los hemisferios cerebrales, seguidos por el tallo cerebral y la médula espinal. Histológicamente, se observa en éstos un moderado incremento celular, astrocitos

bien diferenciados y con atipia nuclear ocasional. La inmunorreactividad a GFAP es en general alta. Usualmente son positivos también a otras dos proteínas, vimentina (proteína que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto en particular de células embrionarias y ciertas células endoteliales y sanguíneas) y S-100 (familia de proteínas involucradas en diversos procesos fisiológicos y que sirven como marcadores de algunos tipos de cáncer), aunque tienen poca relevancia en su diagnóstico (Sarkar et al., 2009). El tratamiento puede incluir resección quirúrgica (aunque en mucho menor medida que en los astrocitomas grado I debido a su capacidad de infiltración), quimioterapia y/o radioterapia (Bristol, 2009). En general, la media de supervivencia de los pacientes es de 6-8 años (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado III son también conocidos como astrocitomas anaplásicos. Según la clasificación de la OMS 2007, los astrocitomas anaplásicos constituyen el 4% de todos los tumores primarios del Sistema Nervioso Central. De manera similar a los astrocitomas de grado II, los astrocitomas anaplásicos están preferencialmente localizados en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos de entre 40 y 60 años de edad. Este tipo de tumor, puede surgir a partir de un astrocitoma grado II o manifestarse de novo. Los astrocitomas de grado III están caracterizados histológicamente por atipia nuclear, aumento celular y actividad proliferativa significativa. Se presentan células tumorales multinucleadas con anormalidades en la mitosis y positivas a GFAP. Los astrocitomas anaplásicos son el grado de astrocitoma más común y tienden a progresar a tumores grado IV en tiempos cortos (Sarkar et al., 2009). El tratamiento inicial estándar incluye la máxima remoción posible del tumor sin causar deficiencias neurológicas (en la mayoría de los casos resulta muy poco efectiva), radioterapia y/o quimioterapia (Buckner et al., 2007). El tiempo de supervivencia de los pacientes con esta patología es de 2-3 años (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas multiformes son el tumor primario del SNC de mayor frecuencia y malignidad. Comúnmente se presentan en adultos entre las edades de 45 a 70 años (Daumas-Duport et al., 1988) y de forma preferencial en los hemisferios cerebrales (Sarkar et al., 2009), ganglios basales y tálamo. Estos tumores llegan a medir hasta 5 cm, microscópicamente son altamente anaplásicos y pueden estar compuestos de células de morfología diversa. Algunos de estos tipos celulares tienen una forma de estrella diferenciada y expresión de marcadores característicos como GFAP y S-100, mientras que otras de las células presentes están desdiferenciadas y se mezclan con elementos estromales como astrocitos reactivos (caracterizados por hipertrofia y regulación a la alta de varias moléculas, incluyendo GFAP y S-100), microglía y otros infiltrados inmunes (Hadjipanayis and Van Meir, 2009). La atipia nuclear en estas células es evidente y la gran actividad mitótica, incluyendo formas atípicas, es una característica prominente. La presencia de proliferación microvascular atípica debida a secreción de factores estimulantes de formación de vasos sanguíneos y/o necrosis es esencial para su diagnóstico y es un tumor altamente infiltrante (Tabla1).

Los glioblastomas pueden desarrollarse a partir de gliomas de menor malignidad (“glioblastoma secundario”) o surgir *de novo*, es decir, sin evidencia de una lesión previa de menor malignidad (“glioblastoma primario”), los cuales representan aproximadamente el 90% de los casos (Furnari et al., 2007). Morfológicamente, los glioblastomas primarios y secundarios son indistinguibles entre ellos. Clínicamente, los glioblastomas secundarios tienden a ocurrir en pacientes jóvenes (con una media de 45-50 años), mientras que los glioblastomas primarios ocurren mayormente en pacientes de edades más tardías (Sarkar et al., 2009). La sobrevida de los pacientes con glioblastoma multiforme es corta, generalmente fallecen dentro del primer año después del diagnóstico (Louis et al., 2007). Estos tumores son muy resistentes a la radioterapia y quimioterapia y debido a su alta capacidad de infiltración, por lo general no es posible realizar una resección quirúrgica (Hadjipanayis and Van Meir, 2009).

Las alteraciones encontradas en los astrocitomas humanos son resultado de la acumulación de anomalías genéticas, incluyendo mutaciones, aberraciones cromosómicas, así como amplificaciones y rearrreglos cromosómicos. Se han descrito una variedad de mutaciones que involucra a aquellos genes que participan en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis como el gen de cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (INK4A), así como el gen del retinoblastoma (RB) y de la proteína tumoral 53 (TP53). También se encuentra alterada la expresión de genes como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular (Hernandez-Hernandez et al., 2012; Ichimura et al., 2004) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis. En la mayoría de los astrocitomas de grado IV se han identificado anomalías cromosómicas como son la presencia de una o más copias del cromosoma 7, pérdida del cromosoma 10 y deleciones y translocaciones en el cromosoma 9. También se han detectado en menor grado pérdidas del cromosoma 22 y deleciones en los cromosomas 1 y 7 (Bigner et al., 1990).

La resistencia de los glioblastomas a las distintas terapias se debe principalmente a su frecuente recurrencia, y debido a la inestabilidad de los tumores, surgen subpoblaciones de células con diferentes mutaciones que son seleccionadas por el microambiente generado por el propio tumor durante la progresión del cáncer y/o por los tratamientos y a la presencia de células troncales capaces de propagarse, sostener el crecimiento prolongado del tumor o de iniciar la formación de uno nuevo. Estas células son relativamente quiescentes, tienen una mayor resistencia al daño al DNA y son muy eficientes en la exportación de moléculas dañinas como las usadas en quimioterapia, por lo que son difíciles de eliminar con las estrategias convencionales que atacan células altamente proliferativas. La hipótesis de las células troncales cancerosas ha llamado la atención dado que puede llevar a buscar nuevas estrategias terapéuticas (Dietrich et al., 2008; Xie, 2009) y para ello se requiere del estudio de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la formación de los glioblastomas.

Una terapia alternativa podría estar basada en hormonas sexuales tales como la progesterona (P4) (Camacho-Arroyo et al., 2003).

3.2. Progesterona

3.2.1 Estructura y función de la progesterona

La P4 (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol que contiene un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Ganong, 2006). Es sintetizada y secretada por los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), placenta, glándulas adrenales y testículos (Henley *et al.*, 2005). Además, puede ser sintetizada en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, ya sea *de novo* a partir del colesterol o a partir de la pregnenolona circulante (Baulieu, 1999). Su biosíntesis inicia con la conversión de colesterol en pregnenolona por el citocromo CYP_{11A}, localizado en la membrana interna de la mitocondria. Posteriormente, la pregnenolona se transporta al retículo endoplásmico liso donde es convertida en P4 por la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) (Schumacher et al., 2010) (Figura 1).

La síntesis y secreción de la P4 se encuentra regulada por diversas hormonas, entre las que se encuentran la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), prostaglandinas, estradiol y agentes β -adrenérgicos (Henley et al., 2005).

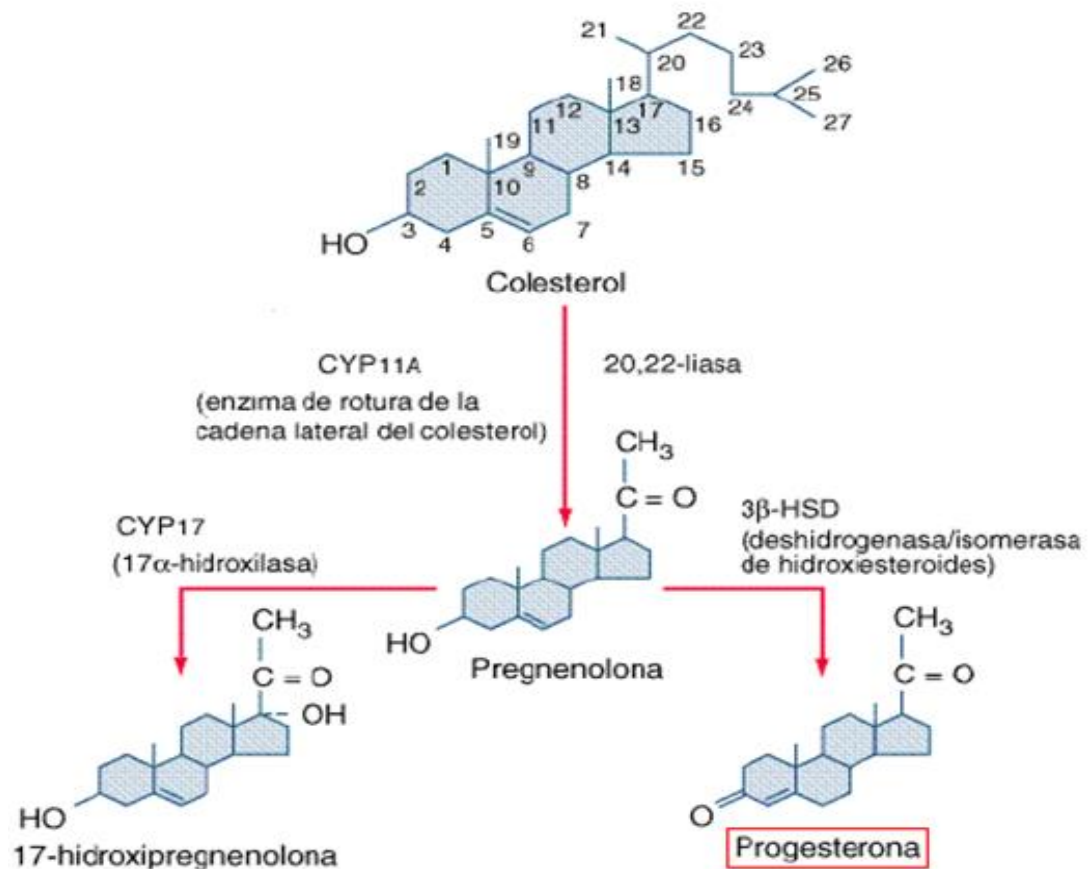


Figura 1. Síntesis de la P4. Conversión de colesterol a pregnenolona por CYP_{11A} (también llamada esteroide 20,22-liasa o P450_{scc}) y de ésta a P4 por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). La 3β-HSD cataliza 2 reacciones: la deshidrogenación del grupo OH del carbono (C) 3 y la subsecuente isomerización del doble enlace entre el C5 y C6 a un doble enlace entre el C4 y C5 (Modificado de Carr and Bradshaw, 2005).

La P4 es metabolizada a 5α-dihidroprogesterona (5α-DPH), la cual puede transformarse en alopregnanolona o epialopregnanolona (Figura 2). Estos metabolitos tienen actividad biológica, siendo la alopregnanolona un modulador alostérico positivo de los receptores GABA_A en el cerebro, mientras que la epialopregnanolona presenta un efecto inhibitorio sobre los mismos (Schumacher et al.,2012).

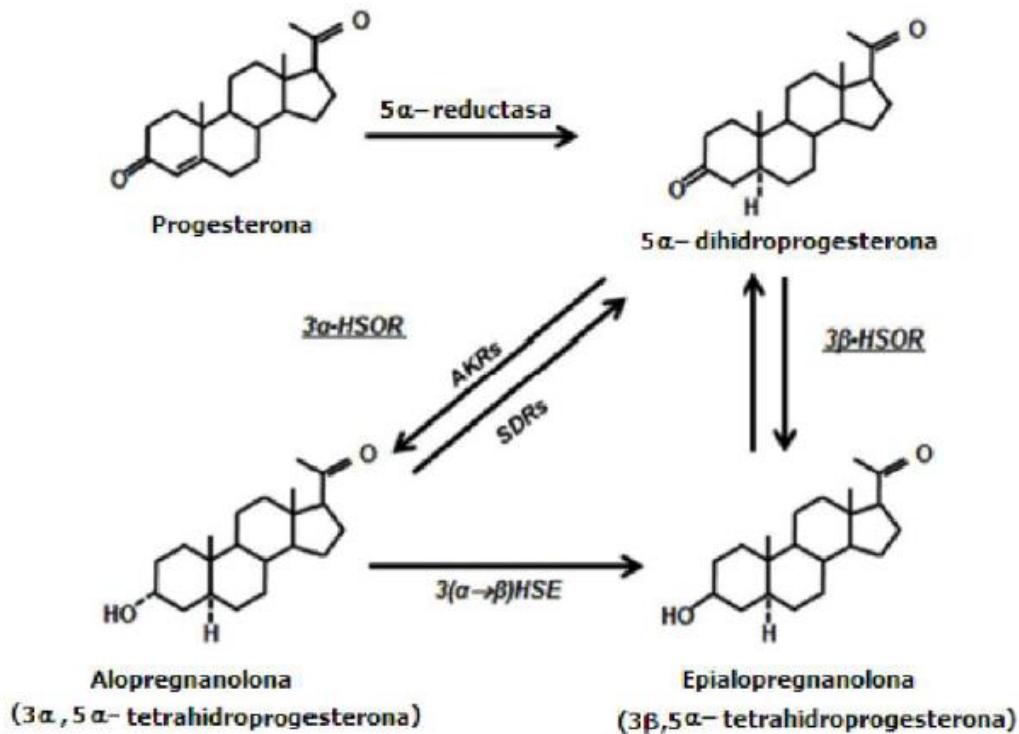


Figura 2. Metabolismo de la P4. La conversión de P4 a 5α-dihidroprogesterona (5α-DPH) es catalizada por dos isoformas de la enzima 5α-reductasa. La 5α-DPH puede ser metabolizada a alopregnanolona por la 3α-hidroxiesteroide oxidorreductasa (3α-HSOR), involucrando alo-ceto reductasas (AKRs) para la conversión a alopregnanolona, y deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs) para regresar de ésta a la 5α-DPH, la cual también puede convertirse en epialopregnanolona mediante la 3β-hidroxiesteroide reductasa (3α-HSOR). La 3(α→β) hidroxiesteroide epimerasa (HSE) cataliza la epimerización de alopregnanolona en epialopregnanolona (Tomado de Schumacher et al., 2012).

Aproximadamente 2% de la P4 circula de manera libre en el torrente sanguíneo, en tanto que el 80% está unida a la albúmina y el 18% a la globulina de unión a corticosteroides (Westphal and Harding, 1973). La P4 tiene una vida media de 36.5 horas (Klein et al., 2001; Miller et al., 1999) y en el hígado se convierte en pregnandirol, el cual se conjuga con ácido glucurónico y se excreta en la orina debido a su carácter hidrofílico (Ganong, 2006) (Figura 3).

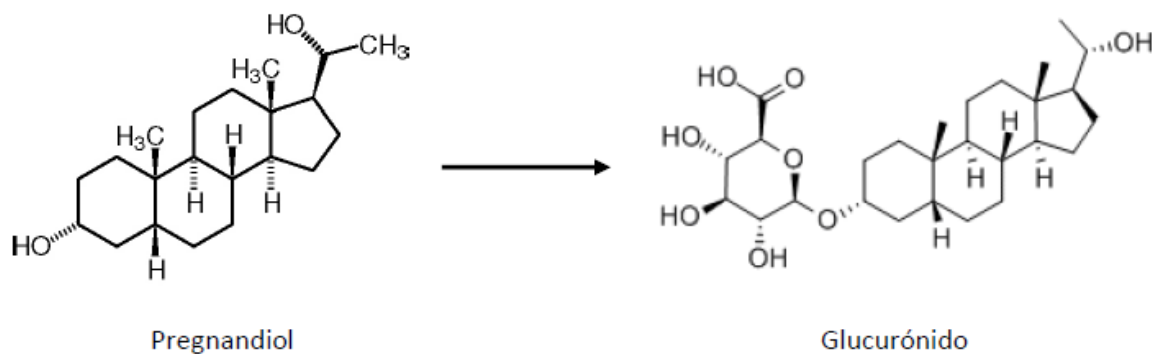


Figura 3. Formación de un glucurónido a partir de pregnandiol.

En los varones, la concentración plasmática de P4 es cercana a 300 pg/mL. En las mujeres, la concentración de P4 cambia a lo largo del ciclo menstrual (Tabla 2), en el embarazo y en la menopausia (Ganong, 2006).

Etapa	Progesterona (pg/mL)
Ciclo Menstrual	
Menstruación	100-500
Folicular	100-1000
Ovulatoria	1000-2000
Lútea	4000-15000
Embarazo	
Primer Trimestre	15000-50000
Tercer Trimestre	75000-150000
Posmenopausia	50-250

Tabla 2. Concentración plasmática de P4 en las diferentes etapas del ciclo menstrual (Tomado de Ganong, 2006).

La P4 está involucrada en la regulación de diversas funciones en los mamíferos. Participa en la regulación de la ovulación, mantenimiento del embarazo, desarrollo alveolar de la glándula mamaria como parte de la preparación para la lactancia (Graham and Clarke, 1997), ascenso de la

temperatura basal en la ovulación (Ganong, 2006), estimulación de la respiración, conducta sexual, modulación de la masa ósea, regulación del sistema inmune, neuroprotección, reducción de la excitabilidad neuronal, protección al daño neuronal, memoria y aprendizaje, ciclo sueño-vigilia y en el crecimiento de diversos tumores (Camacho-Arroyo et al., 2003; Camacho-Arroyo et al., 1995; Gonzalez-Arenas et al., 2003; Cabrera-Muñoz et al., 2011).

3.2.2 Mecanismo de acción

La P4 actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales conocidos como clásico (genómico) y membranal (no genómico) (Bramley, 2003). El primer mecanismo involucra la interacción de la P4 con el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la P4 con receptores membranales (RPm) de siete dominios transmembranales y canales iónicos (Camacho-Arroyo et al., 2003; Hernández-Hernández y Camacho-Arroyo, 2013), lo cual modifica la conductancia de iones (Blackmore, 1993), induce la formación de segundos mensajeros como el AMPc, así como la fosforilación de proteínas y la activación de cinasas (Hernández-Hernández y Camacho-Arroyo, 2013) (Figura 4).

A través del mecanismo clásico se generan cambios en la transcripción de genes blanco de la P4. En éste, la P4 atraviesa las membranas celulares por difusión simple debido a su carácter lipofílico y en el núcleo o en el citoplasma se une al RP, lo que provoca un cambio conformacional en el receptor que le permite la disociación de las proteínas de choque térmico (Hsp70, 90 y 56), lo que expone la región que le permite fosforilarse y dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el DNA conocidas como elementos de respuesta a P4 (ERP). Una vez unido al ERP, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes blanco de P4 como el VEGF y EGFR (Camacho-Arroyo and Rodríguez-Dorantes, 2006) (Figura 5).

El RP recluta correguladores que modifican la estructura de la cromatina y favorecen de manera indirecta la interacción del receptor con los factores generales de transcripción. El complejo formado puede reclutar otros correguladores como los coactivadores de receptores a hormonas esteroideas (SRC), los cuales facilitan el proceso de transcripción mediante cambios en el patrón de acetilación de las histonas (Hernández-Hernández et al., 2012).

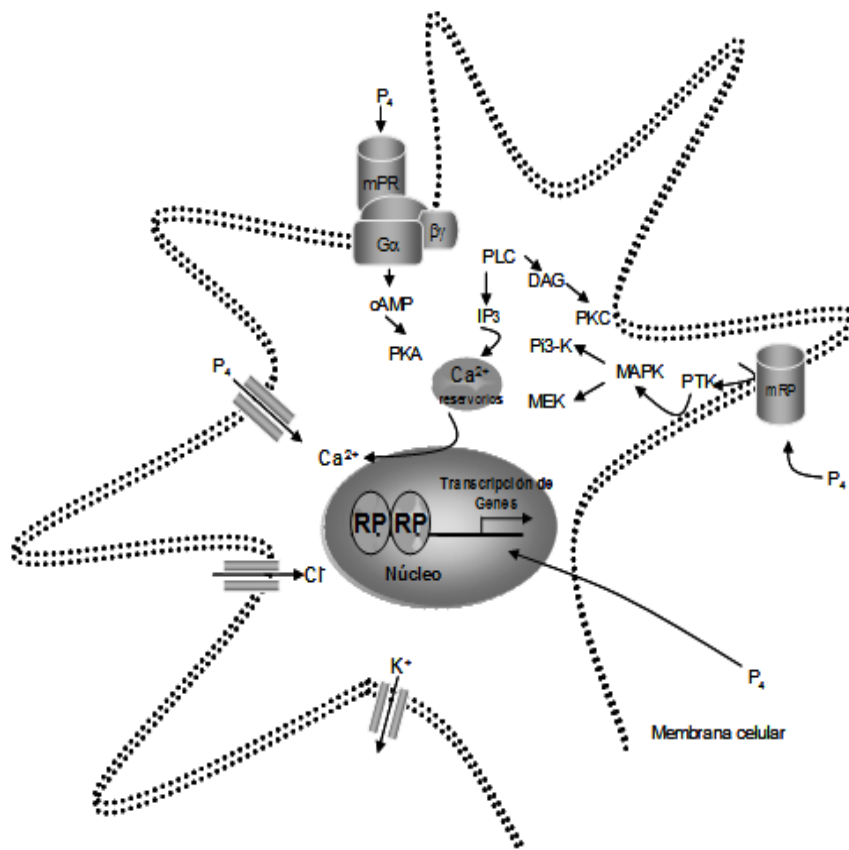


Figura 4. Mecanismos de acción de la P4. Los efectos de la P4 ocurren por dos diferentes mecanismos 1) a nivel membranar incluye receptores membranales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP (o mPR): Receptor membranar 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 Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, IP₃: Inositol Trifosfato 2) en el núcleo, donde el complejo hormona-receptor (P4-RP) se une con ERP, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así modulan directamente la expresión génica (Hernández-Hernández and Camacho-Arroyo, 2013).

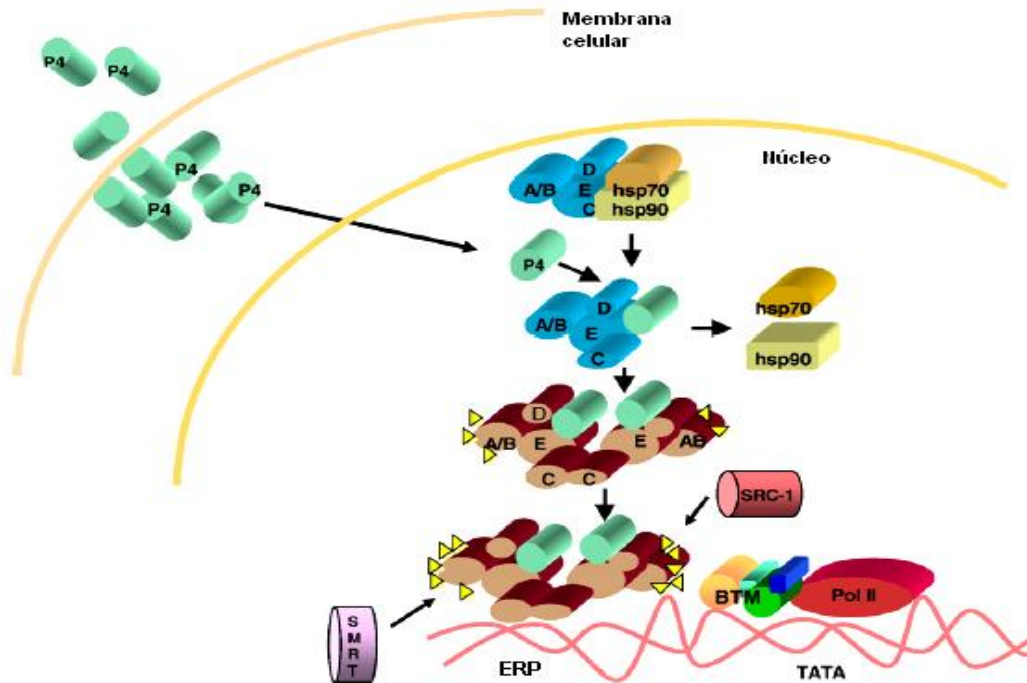


Figura 5. Regulación de la expresión génica por la P4 vía RP. En la forma libre, el RP (dominios A/B, C, D, E) está asociado a proteínas chaperonas como las proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90). La P4 atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear, tras la interacción de la P4 con el RP, este último se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otra molécula de RP. Posteriormente, el RP se fosforila (triángulos) y forma complejos con correguladores como el coactivador SRC-1 (coactivador de receptores a esteroides) o el correpresor SMRT (mediador de silenciamiento para receptores retinoides y tiroideos). El RP interactúa con elementos de respuesta a progesterona (ERP) en la región promotora de genes blanco de la P4 y recluta a la maquinaria de transcripción basal (BTM) involucrada en la expresión génica. (Tomado de Camacho-Arroyo, 2007).

3.3 Receptores intracelulares a P4 (RP)

3.3.1 Características

Muchos de los efectos biológicos de la P4 están mediados a través del RP, el cual se encuentra localizado en el citoplasma y en el núcleo (Camacho-Arroyo and Rodríguez-Dorantes, 2006). El RP pertenece a la superfamilia de receptores nucleares cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990).

El gen que codifica al RP en el humano presenta una sola copia de más de 90 kb compuesta por 8 exones y 7 intrones (Misrahi et al., 1993) que generan un mRNA de aproximadamente 3000 nucleótidos (Theveny et al., 1987) el cual da origen a un polipéptido de 933 aminoácidos (Misrahi et al., 1993) (Figura 6).

En el humano este gen se localiza en el cromosoma 11q22-23 (Misrahi et al., 1993; Rousseau-Merck et al., 1987).

En una gran variedad de especies, incluyendo aves, roedores, monos y humanos, el RP está expresado en dos isoformas: una larga denominada RP-B y una corta denominada RP-A (Guerra-Araiza et al., 2000) con excepción del conejo en el cual sólo se ha detectado la isoforma RP-B (Loosfelt et al., 1986). Ambas isoformas del RP son producto de un único gen, pero generadas a partir de diferentes sitios de inicio de la transcripción y reguladas por diferentes promotores.

Las isoformas de este receptor están compuestas por cuatro dominios (Tata, 2002; Tsai and O'Malley, 1994). El dominio amino terminal (A/B), el dominio de unión al DNA (DBD) (C), el dominio bisagra (D) y el dominio de unión al ligando (LBD) (E).

El dominio amino terminal (N-terminal) se codifica a partir del exón 1 y participa en la regulación de la transcripción de genes blanco, este es el dominio variable para cada isoforma. El dominio de unión al DNA (DBD), es el más conservado, se codifica a partir de los exones 2 y 3, y participa en el proceso de dimerización con otro RP; Asimismo, interviene en la unión del receptor (unido a su ligando) a los ERP, a través de los dedos de zinc. Los ERP, de manera general, consisten en secuencias consenso (palindrómicas o directamente repetidas) de seis nucleótidos que están separadas por un espaciador de tres nucleótidos. Adyacente al DBD se encuentra la región de bisagra, la cual es codificada a partir del exón 4 y participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas de choque térmico (Hsp) y en la localización nuclear ya que contiene el péptido señal de localización nuclear (NLS). El dominio de unión al ligando (LBD), consiste de 10-12 α -hélices que forman un sitio hidrofóbico de unión al ligando y se codifica del exón 5 al exón 8, este dominio también participa en la regulación de la transcripción (Misrahi et al., 1993; Tetel and Lange, 2009). Al igual que la mayoría de los receptores a esteroides, el RP tiene al menos dos funciones de activación de la transcripción (AF) (Figuras 6 y 7).

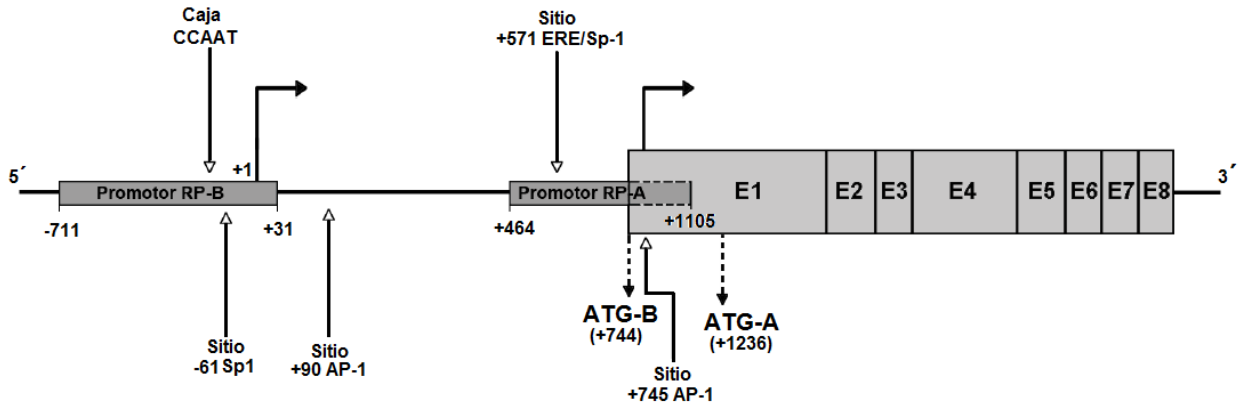


Figura 6. Estructura del gen del RP humano. El gen está compuesto por ocho exones (E1-E8) y tiene dos promotores que inducen la expresión de las dos isoformas del receptor, RP-A y RP-B. Las flechas en horizontal representan los sitios de inicio de la transcripción para RP-A y RP-B. El esquema también muestra los sitios de inicio de la traducción (ATG-A y ATG-B). Se muestra la localización de los diferentes sitios de unión a las proteínas Sp1 y AP-1 al igual que los sitios de unión al receptor de estrógenos (ER) y la caja CCAAT (Modificado de Hansberg, 2011)

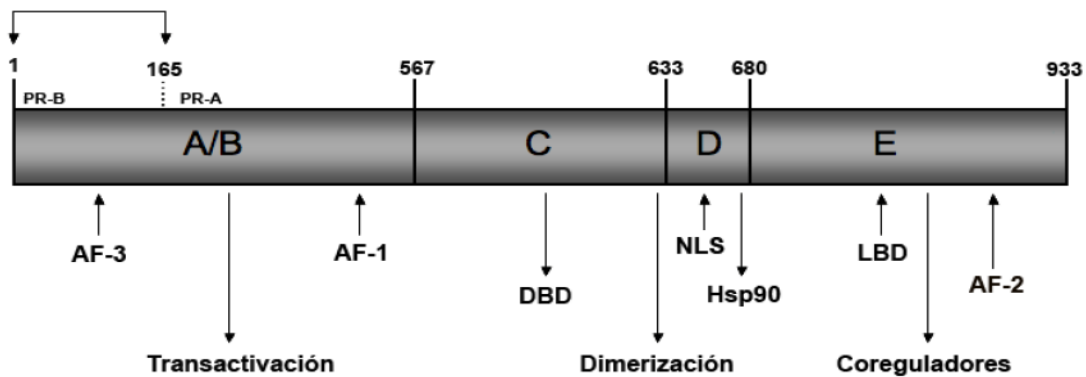


Figura 7. Representación de los dominios del RP. El receptor consta de cinco dominios denominados de la A a la E. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que señalan el inicio y término de cada dominio, mientras que las flechas (↓) indican el sitio de inicio de la traducción de las dos isoformas. El dominio (A/B) se encuentra en el extremo amino terminal y tiene dos funciones de activación (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 (Hsp90). El dominio E tiene la región de unión al ligando (LBD), la de unión a coreguladores y hacia el extremo carboxilo terminal tiene una función de activación (AF-2). En el esquema también se muestran el número de aminoácidos que tiene cada dominio y las isoformas RP-A y RP-B. (Modificada de Camacho-Arroyo and Rodríguez-Dorantes, 2006).

3.3.2 Isoformas del RP

Se han descrito dos isoformas del RP, las cuales como se mencionó anteriormente, se han denominado RP-A (80-94 kDa; en el humano, 94 kDa) y RP-B (108-120 kDa; en el humano, 114 kDa). RP-A es una forma truncada de RP-B ya que carece de 164 aminoácidos en la región amino terminal (Figura 7). Este segmento es conocido como BUS (por sus siglas en inglés: B-receptor upstream segment). (Conneely y Jericevic,2002; Giangrande y McDonnell,1999). El RP-A posee solamente dos regiones con funciones de activación, mientras que el RP-B contiene además una tercera región (AF-3) presente en el extremo amino terminal (Figura 7). Además existe la presencia de una región con función inhibitoria localizada en la región adyacente a AF-1 que sólo es funcional en RP-A (Guerra-Araiza and Camacho-Arroyo, 2000). Estudios cinéticos indican que la constante de unión de la P4 por RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente (Raaijmakers et al., 2009).

En el ser humano, ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de la regulación de dos secuencias promotoras distintas que dan lugar a diferentes mRNAs. Una secuencia es distal (de -711 a +31) y que corresponde a la secuencia promotora de RP-B, mientras que la otra es proximal (de +464 a +1105) y que corresponde a la secuencia promotora de RP-A (Kastner et al., 1990; Kraus et al., 1993) (Figura7).

Las isoformas del RP tienen diferentes funciones que dependen del contexto celular, gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). RP-B y RP-A pueden coexistir en la misma célula y después de su activación por P4 se pueden unir al ADN como 3 especies diméricas: AA, BB y AB (Carbajo et al., 1996).

En muchos sistemas celulares el RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional (Clemm et al., 1995; Sartorius et al., 1994; Tung et al.,

1993; Vegeto et al., 1993). Lo anterior se debe a que RP-A tiene mayor afinidad por los correpresores como SMRT y RP-B por coactivadores como SRC-1 (Giangrande and McDonnell, 1999). La capacidad represora permite al RP-A mediar las acciones de la P4 al mismo tiempo que regula los efectos de otras hormonas, participando de forma importante en la integración de señales (*cross-talk*) mediados por otros receptores a hormonas esteroides (Camacho-Arroyo and Rodríguez-Dorantes, 2006).

3.4 Factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF)

3.4.1 Características

El factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF), fue descubierto como un inmunomodulador secretado por los linfocitos γ/δ durante el embarazo (Polgar et al., 1999) necesario para el mantenimiento del mismo (Szekeres-Bartho et al., 1985). El PIBF regula la síntesis de citocinas, la actividad de las células asesinas naturales (NK) y el metabolismo del ácido araquidónico (Szekeres-Bartho et al., 1990) (Figura 8).

El gen que codifica al PIBF en el ser humano presenta una sola copia de casi 90 kb compuesta por 18 exones y 17 intrones los cuales generan un mRNA de 2765 nucleótidos con un marco abierto de lectura de 2271pb, el cual da origen a un polipéptido de 757 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 90 kDa y con un punto isoeléctrico teórico de 5.73 (Polgar et al., 2003) (Figura 9). En el humano este gen se localiza en el cromosoma 13q22.1.

Actualmente se conoce que en el humano y en el ratón el PIBF presenta varias isoformas producto de un mecanismo de “splicing” alternativo, dichas isoformas presentan tamaños que van de los 10 a los 76 kDa y varían en cuanto a su localización tisular (Lachmann et al., 2004).

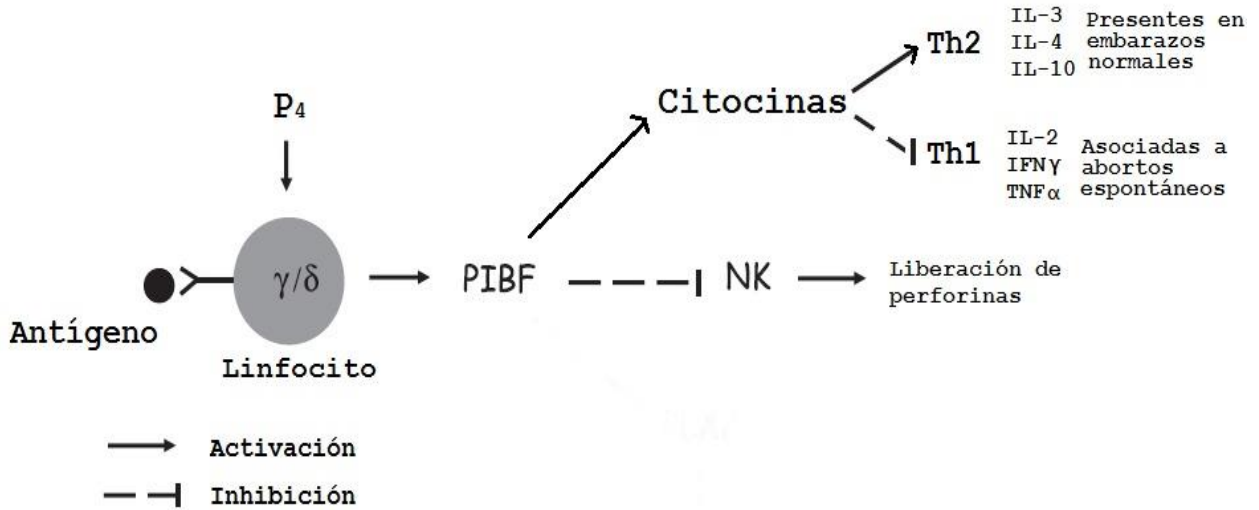


Figura 8. Efectos del PIBF en el embarazo. Los linfocitos γ/δ activados por un antígeno o por la P4 son capaces de secretar PIBF el cual tiene un efecto modulador sobre la producción de citocinas y un efecto inhibitorio sobre la actividad de las células NK (Modificada de Szekeres-Bartho and Polgar, 2010).

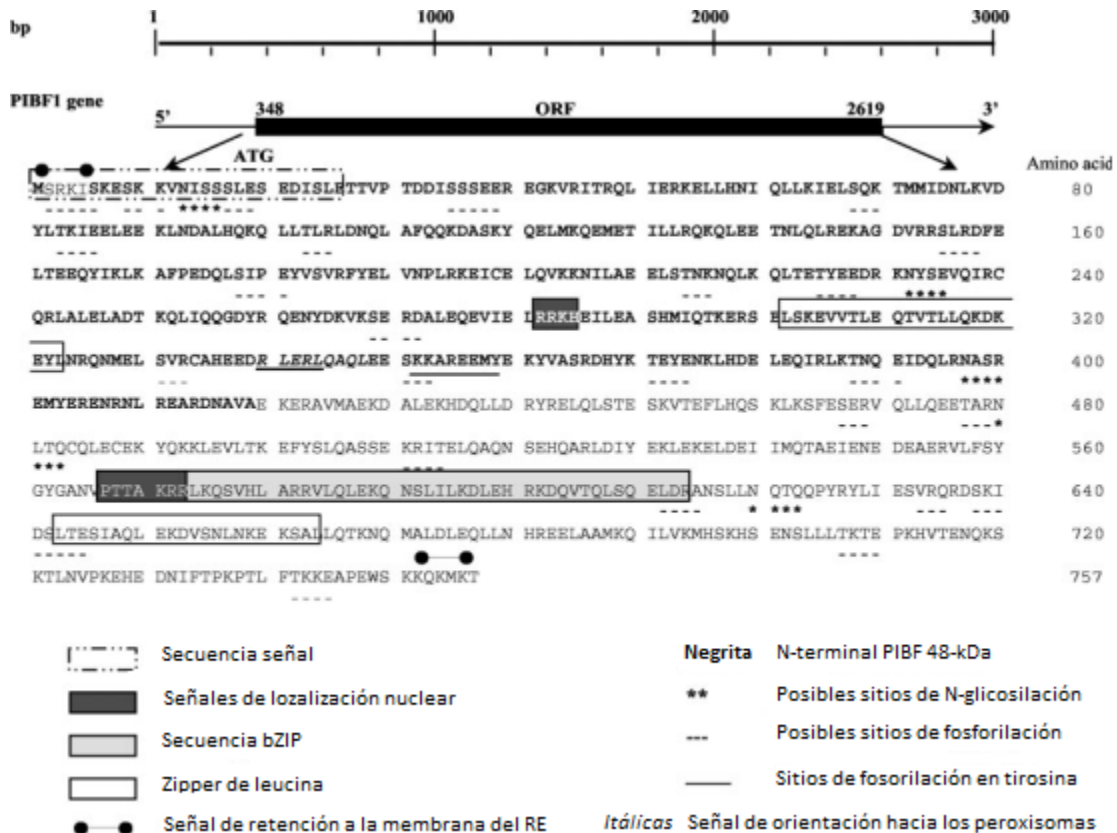


Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen del PIBF. Se muestran las principales características de la proteína como los zipper de leucina y las señales de localización nuclear (NLS) (Tomado de Polgar et al., 2003).

La composición de aminoácidos de la proteína de 90 kDa muestra un contenido relativamente alto de ácido glutámico (Glu) (14.4%), leucina (Leu) (13.6%) y lisina (Lys) (10.2%) y un porcentaje bajo de triptófano (Trp) (0.1%) y cisteína (Cys) (0.8%) (Polgar et al., 2003). Un análisis de hidrofobicidad *in silico* muestra que el PIBF es una proteína hidrofílica y que tiene una estructura general de alfa hélices (Polgar et al., 2003), con un zipper de leucina y señales de localización nuclear (NLS), así como características básicas de proteína de unión al DNA (Lachmann et al., 2004; Polgar et al., 2003). El PIBF presenta varios sitios potenciales de fosforilación por tirosina cinasa y sitios de glicosilación por N-glicosilación (Polgar et al., 2003). La molécula contiene una secuencia putativa PEST (Secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)) lo que sugiere un tiempo de vida media corto (Polgar et al., 2003). Asimismo, se han predicho una pequeña secuencia señal en la región amino terminal y una señal de retención para la membrana del retículo endoplásmico (Polgar et al., 2003) (Figura 10).

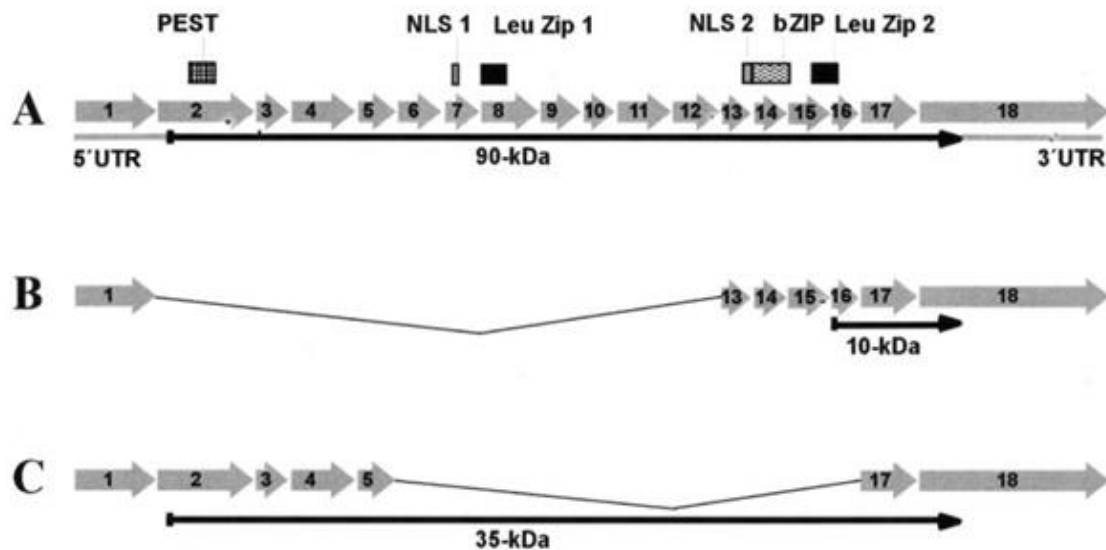


Figura 10. Estructura de algunas de las isoformas del PIBF. A) Forma completa del gen del PIBF, B) Isoforma encontrada en tumor de estómago, C) Isoforma encontrada en tumor de útero. Las distintas flechas indican los exones que conforman cada isoforma, asimismo se muestra el tamaño de las proteínas. Se observa que la forma completa del PIBF cuenta con 18 exones y que presenta secuencias de localización nuclear (NLS), mientras que las isoformas más pequeñas no presentan estas secuencias por lo que se sugiere que son excretadas. También se esquematizan los zipper de leucina y PEST (Tomado de Lachmann et al., 2004; Polgar et al., 2003).

Con respecto a la localización celular de las isoformas del PIBF, se sabe que la proteína de 90 kDa del PIBF está asociada al núcleo, mientras que la secreción de las isoformas más pequeñas como la de 34 kDa es inducida por la estimulación de la célula por ejemplo mediante el tratamiento con insulina (Polgar et al, 2003; Lachmann et al., 2004). La actividad biológica del PIBF parece residir en los 48 kDa de la región amino terminal (Polgar et al, 2003), además la presencia de los zipper de leucina indican que el PIBF podría interactuar con el DNA. Estas características sugieren que los productos del mismo gen del PIBF podrían actuar como un factor de transcripción y/o como una citocina (Polgar et al, 2003).

Durante el embarazo el PIBF regula los efectos anti-abortivos de la P4 al modular la actividad de las células NK (Szekeres-Bartho et al., 1997) (Figura 8) debido a que el feto es particularmente sensible al ataque de estas células (Polgar et al., 2004). En presencia del PIBF, las células NK no son capaces de liberar las perforinas de los gránulos de almacenamiento por lo que no pueden lisar a sus células blanco (Faust et al., 1999) (Figura 8).

Otro mecanismo por el que el PIBF presenta un efecto anti-abortivo es a través de la alteración en la producción de citocinas (Laskarin et al., 2002; Szekeres-Bartho et al., 1996); el PIBF regula la supresión de la citotoxicidad de linfocitos deciduales inducida por P4 mediante la inhibición de la producción de citocinas tipo Th1 (IFN γ , IL-2 y TNF α) que están relacionadas con abortos espontáneos, y la estimulación de la producción de citocinas tipo Th2 como la IL-10, IL-3 e IL-4 que están mayoritariamente presentes en mujeres con un embarazo normal (Makhseed et al., 2003; Szekeres-Bartho et al., 1996) (Figura 8).

Un tercer proceso en el que participa el PIBF y que también está involucrado en el embarazo es el metabolismo del ácido araquidónico. En este sentido se sabe que la P4 por sí misma o mediante el PIBF, inhibe la síntesis y liberación de la prostaglandina F 2α (PG-F 2α) promoviendo así la quiescencia uterina, lo que reduce el riesgo de abortos espontáneos debidos a la contractilidad del útero (Szekeres-Bartho et al., 1985).

3.4.2 P4, PIBF y cáncer

Varios trabajos han demostrado que a nivel del mRNA el PIBF es expresado en líneas celulares humanas provenientes de distintos tejidos (Lachmann et al., 2004). Un análisis de tumores de mama RP+ y RP-, reveló que el mRNA del PIBF se encuentra sobre-expresado en células con alta tasa de proliferación independientemente de la presencia del RP (Lachmann et al., 2004).

La presencia del mRNA del PIBF se ha observado también en varias líneas celulares de leucemia humana, células mononucleares de cordón umbilical (Giannoni et al., 2011) y linfocitos deciduales (Laskarin et al., 2002), algunas de las cuales también expresan el PIBF a nivel de la proteína (Srivastava et al., 2007). Estos mismos estudios mostraron que la adición de P4 al medio incrementó la expresión del PIBF mientras que el RU486 (antagonista de la P4) que interactúa con el RP, reguló a la baja su expresión. Asimismo, el tratamiento con RU486 incrementó la duración y mejoró la calidad de vida de ratones con leucemia (Srivastava et al., 2007).

Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que la proteína de 90 kDa del PIBF se encuentra en el centrosoma (Lachmann et al., 2004). Muchas proteínas involucradas en la formación de tumores están asociadas al centrosoma, provocando alteraciones en la función centrosomal y por lo tanto una segregación desigual de los cromosomas. La localización centrosomal de la forma completa del PIBF sugiere un posible papel en la regulación del ciclo celular (Szekeres-Bartho and Polgar, 2010).

Las isoformas pequeñas del PIBF que son secretadas, tienen un papel en la regulación de la actividad de las células NK y de algunas citocinas, por lo que se plantea que una alta producción de PIBF por los tumores malignos podría facilitar el desarrollo del tumor por la supresión de las respuestas inmunes locales anti-tumorales (Faust et al., 1999; Szekeres-Bartho et al., 1997a, 1997b). Se ha propuesto que algunos tipos de cáncer podrían evadir a las células NK por medio de la secreción de un esteroide similar a la P4, el cual interactúa con el RP, induce

la producción del PIBF y permite que el tumor escape de las respuestas inmunes anti-tumorales (Check et al., 2009; Szekeres-Bartho and Polgar). Además, otro hecho que relaciona al PIBF con el cáncer, es su localización cromosómica, puesto que el gen del PIBF se encuentra en el cromosoma 13 en la proximidad de los genes de susceptibilidad a cáncer de mama (Rozenblum et al., 2002).

A pesar de que varios grupos de investigación se dedican a estudiar las funciones del PIBF, actualmente se desconoce cuáles son los mecanismos por los que éste ejerce sus funciones, sin embargo, investigaciones recientes sugieren que la isoforma de 90 kDa del PIBF puede unirse al DNA e inducir la expresión de genes relacionados con proliferación celular como EGFR (Kozma et al., 2006), cuya expresión aumenta con P4 en células de astrocitomas humanos (Hernández-Hernández et al., 2012). Asimismo, se ha reportado que una de las vías por las que el PIBF actúa es mediante la activación de las proteínas STAT6 por dos citocinas, la interleucina 4 y la interleucina 13 (IL-4 e IL-13) (Zamorano et al., 2003; Kozma et al., 2006).

Trabajos de otros grupos de investigación han reportado la presencia de PIBF en células cultivadas de glioblastomas, estas células muestran una expresión simultánea de PIBF tanto en el citoplasma y núcleo y se puede especular que la isoforma de la proteína completa que se encuentra en el núcleo podría participar en el control de la síntesis y la secreción de IL-6 en glioblastomas. Otro aspecto de la participación del PIBF en la facilitación de la invasión tumoral es la posible supresión de la respuesta inmune local (Halasz et al. 2013), este efecto se asocia con las isoformas más pequeñas de la proteína que se localizan ya sea en el citoplasma o que son secretadas a los tejidos adyacentes (Halasz et al., 2013; Lachmann et al., 2004).

Por otra parte en nuestro laboratorio, varios estudios han sugerido que la P4 podría ejercer sus efectos en la expresión del PIBF mediante el mecanismo clásico. Se observó que en la línea U373, la P4 (10 nM) incrementa la expresión del PIBF a partir de 1 hora manteniéndose este efecto hasta las 24 horas. El incremento en la expresión del PIBF por P4 desde 1 hora sugiere que este último

puede considerarse como un gen de respuesta temprana (Valadez, 2013), los cuales codifican para enzimas citoplásmicas, proteínas secretoras y factores de transcripción que están involucrados en diferenciación, proliferación y metabolismo celular (Herschman, 1991; O'Donnell et al., 2012). Por último se sabe que el PIBF favorece la fosforilación de proteínas STAT6 las cuales están implicadas en la proliferación celular (Valadez, 2013)

3.5 Proteínas JAK

Las proteínas JAK (Janus cinasas) presentan actividad de tirosina-cinasa y se asocian con los receptores de citocinas. Después de la unión citocina-receptor, las proteínas JAK se activan y éstas a su vez hacen lo propio con las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT), las cuales son una familia de proteínas que activan la transcripción de genes en respuesta a diferentes citocinas (Hoey and Grubsky, 1999; O'Shea et al., 2013). Las JAKs están constitutivamente asociadas a las regiones Box 1 y Box 2 del dominio intracelular del receptor a citocinas, de forma que el cambio conformacional que se produce en el receptor tras la unión del ligando hace que las JAKs se aproximen, lo que permite su transactivación (fosforilación recíproca en residuos de tirosina). Una vez activadas, las JAKs van a fosforilar tanto al receptor (en su dominio intracelular) como a la STAT6. En ausencia de estimulación, la STAT6 se encuentra en el citoplasma y son, por tanto, transcripcionalmente inactivas. Sin embargo, una vez fosforiladas por JAK, las STA6 dimerizan a través de sus dominios SH2 y se traslocan al núcleo.

Cada receptor de citocinas aparentemente se acopla a una serie específica de JAKs y STATs, aunque existe un traslape sustancial entre los diferentes receptores en diversos contextos biológicos (Liu et al., 1998). Se han identificado cuatro proteínas homólogas de la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) en mamíferos, todas ellas poseen entre 1100-1200 aminoácidos y se encuentran en un rango de peso molecular que va desde 120 a 130 kDa (O'Shea, 1997), organizados en siete dominios de homología Janus (JH), basados en su similitud en la secuencia entre los miembros de la familia (Wilks et al., 1991; Sedlacek,

2000). Esta familia no posee los dominios SH2 o SH3, y excepto por el dominio catalítico, exhiben poca homología con otras proteínas tirosina-cinasas. Las JAKs son únicas entre las proteínas tirosina-cinasas, ya que presentan un dominio catalítico C-terminal (JH1) yuxtapuesto con un dominio de pseudocinasa (JH2) (Chen et al., 1998) (Figura 11).

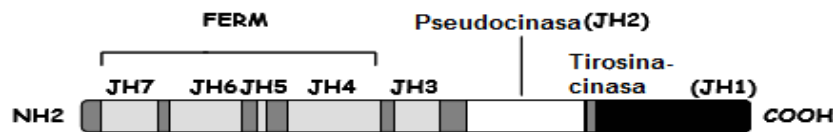


Figura 11. Esquema de las proteínas JAK. Dominios JH (JAK homology), dominio FERM (four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) Se muestra el dominio N-terminal (dominios JH3-JH7), el dominio de pseudocinasa (JH2) y el dominio tirosina-cinasa (JH1), estas incluyen tirosinas conservadas que constituyen un componente crítico del asa de activación; Y1038/1039 en JAK1, Y1007/1008 en JAK2, Y980/981 en JAK3 y Y1054/1055 en Tyk2. (Modificada de Kiu and Nicholson, 2012).

Aunque la mitad N-terminal de las cinasas JAK contienen los dominios JH3-JH7, los cuales son requeridos para la interacción con el receptor de citocinas, la naturaleza precisa de las interacciones aún se desconoce. La región proximal a la membrana de la cola citoplásmica del receptor de citocinas, conocida como Box1/Box2, es esencial para la transducción y activación de JAK, que se une directamente con estas regiones (Murakami et al., 1991). Estudios estructurales han determinado que la región JH3-JH4 muestra similitud con los dominios SH2 de las proteínas STAT, y que la región JH4-JH7 constituye un dominio de homología FERM (four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin); este dominio FERM media interacciones proteína-proteína (Yamaoka et al, 2004).

La presencia de un dominio de pseudocinasa distingue a las JAKs de otras tirosinas-cinasas. El dominio de pseudocinasa (JH2) muestra todas las características de un dominio de cinasa, excepto la actividad catalítica. No es muy claro el papel de este dominio en la actividad de las JAKs. Sin embargo, se ha propuesto que el dominio JH2 contribuye a la formación de complejos JAK-

receptor en respuesta al ligando, donde JH2 actúa como un switch que regula la transducción de señales (Saharinen and Silvennoinen, 2002).

El dominio de cinasa se encuentra en JH1 y muestra las características clásicas de una tirosina-cinasa. Estas incluyen tirosinas conservadas que constituyen un componente crítico del asa de activación (Y1038/1039 en JAK1). La fosforilación de estas tirosinas lleva a cambios conformacionales que facilitan la unión del sustrato.

Las proteínas JAKs son un componente central en la regulación de la señalización de las citocinas. Estudios establecen que JAK1 es un componente común de la vía JAK/STAT, JAK1 es compartido por todos los miembros de la familia de receptores de clase II, es decir, los receptores de citocinas; además, JAK1 en la hematopoyésis, solo se asocia a receptores de citocina que selectivamente inducen el desarrollo de poblaciones de células linfoides (Kiu and Nicholson, 2012).

Como se mencionó anteriormente, las JAKs activan a las proteínas STAT (STATs 1-4, 5a, 5b y 6) y se sabe que cada una es activada por una combinación específica de citocinas y receptores a citocinas o por factores de crecimiento (Wurster et al., 2000). Particularmente se conoce que la proteína STAT6 tiene un papel crítico en la función y desarrollo de las células T cooperadoras y por lo tanto en la respuesta inmune, esta proteína es activada principalmente por dos citocinas, la interleucina 4 y la interleucina 13 (IL-4 e IL-13) (Kiu and Nicholson, 2012).

Con respecto al mecanismo de acción, se sabe que una vez que las citocinas se unen a sus respectivos receptores, las cinasas asociadas Janus (JAK) son activadas y fosforilan residuos conservados en el receptor. Las proteínas STAT6 citoplasmáticas inactivas se unen al receptor fosforilado vía su dominio SH2 permitiendo que JAK fosforile la tirosina 641 en STAT6. Una vez fosforilada, STAT6 forma homodímeros y se transloca al núcleo donde se une a la secuencia de DNA TTCNNN(N)GAA presente en la región promotora de los genes de

respuesta a IL-4 e IL-13 y es capaz de regular la transcripción (Figura 12) (Fenghao et al., 1995; Wurster et al., 2000).

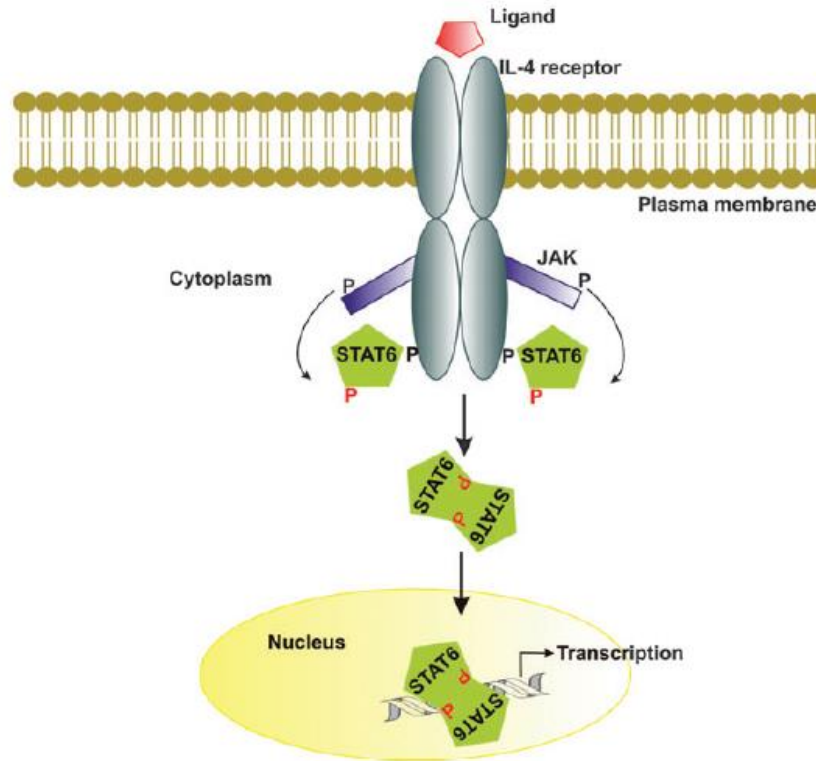


Figura 12. Modelo de regulación de la transcripción mediada por STAT6. Después de la estimulación por alguna citocina como IL-4, el receptor a IL-4 activa a las JAK (cinasas Janus), las cuales fosforilan y activan a STAT6. Una vez activado, STAT6 se dimeriza y migra al núcleo donde se une a sus elementos de respuesta en el promotor e induce la expresión de genes específicos (Tomada de Lahiri et al., 2010).

A pesar de que los mecanismos por los cuales se da la activación de las proteínas STAT6 por IL-4 e IL-13 han sido ampliamente estudiados (Wurster et al., 2000), se desconocen los mecanismos de la transcripción dependientes de STAT6, así como posibles mecanismos alternos de activación de la misma. En este sentido, recientemente se ha sugerido que en linfocitos humanos el PIBF es capaz de activar a las proteínas STAT6 mediante su unión a un nuevo receptor a IL-4 el cual es un heterocomplejo formado por la cadena α del receptor a IL-4 (asociado a JAK1) y el receptor a PIBF (Kozma et al., 2006).

De acuerdo a los antecedentes descritos, se ha sugerido que en linfocitos humanos la P4 regula a la alta la expresión del PIBF a nivel del mRNA y de la proteína y que éste incrementa la fosforilación y activación de las proteínas STAT6, por lo que la vía de señalización de STAT6 podría ser uno de los mecanismos por los que el PIBF lleva a cabo sus funciones.

Por otra parte estudios en nuestro laboratorio han mostrado que el PIBF aumentó significativamente la fosforilación de STAT6 en células U373, en el residuo de tirosina 641 (Y641) (Valadez, 2013). La fosforilación de las proteínas STAT6 es requerida para su posterior activación y una vez activadas estas proteínas actúan como factores de transcripción de genes relacionados con la proliferación celular (Wurster et al., 2000).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El PIBF tiene un papel importante en el desarrollo tumoral y se sabe que en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos, la P4 regula positivamente la expresión del PIBF. Esta regulación puede ser por un mecanismo que involucra al RP o por un mecanismo independiente de este receptor. Se ha reportado que el PIBF regula la fosforilación y activación de las proteínas STAT6 en astrocitomas humanos, las cuales están implicadas en la proliferación celular. Sin embargo, se desconoce el papel del PIBF en la proliferación celular de la línea U373, así como el rol de las proteínas JAK y el receptor de IL-4, en los mecanismos involucrados en la fosforilación de STAT6 inducidos por el PIBF. Debido a lo anterior, los estudios presentes ayudarán a entender los mecanismos moleculares mediante los cuales la P4 regula el desarrollo de este tipo de tumores.

5. HIPÓTESIS

El PIBF promoverá la fosforilación de las proteínas JAK que una vez activadas favorecerán el crecimiento de la línea U373 de astrocitomas humanos grado III.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Estudiar los efectos del PIBF en la fosforilación de la proteína JAK y su papel en el crecimiento de la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos.

6.2 Objetivos particulares

- Determinar el papel del PIBF en el crecimiento de la línea U373 con el uso de la técnica de tinción por exclusión.
- Estudiar por la técnica de Western blot el efecto de la P4 y del PIBF sobre la fosforilación de la proteína JAK, en la línea celular U373.
- Establecer si el PIBF se asocia al receptor de IL-4 en la línea celular U373.

7. METODOLOGIA

7.1 Cultivo celular

La línea celular U373 o U373-MG (ATCC: HTB 17) derivada de astrocitomas humanos grado III se cultivó en medio DMEM con rojo de fenol (In Vitro, S.A., México) suplementado con suero fetal bovino con hormonas (SFB) al 10%. 1×10^6 células se incubaron bajo condiciones estandarizadas de 37°C, 95% aire - 5% CO₂ y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta alcanzar una confluencia celular de 70- 80%. Una vez obtenida dicha confluencia, se realizaron tres lavados con PBS pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM), se cambió el medio por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas y las células se incubaron durante 24 h en las

condiciones ya mencionadas.

Para evaluar si el PIBF y la P4 inducen la fosforilación de las proteínas JAK, las células U373 se incubaron en presencia de: vehículo (agua desionizada) y PIBF recombinante (Abnova H00010464-P01) (200 ng/ mL) durante 20 minutos, o bien, vehículo (V, ciclodextrina al 0.02% en agua estéril) y P4 (10 nM) durante 24 horas (Kozma et al., 2006). Estos tiempos se seleccionaron debido a que estudios en nuestro laboratorio (Valadez, 2013) y en otro grupo de investigación (Kozma et al., 2006) se ha encontrado que el PIBF regula positivamente la fosforilación de STAT6 en linfocitos y astrocitomas humanos justo bajo estas condiciones. Se realizó la extracción de proteínas totales para los estudios de fosforilación de JAK como se menciona en el apartado 7.3.

Para determinar si el PIBF se une al receptor de IL-4 en la línea celular U373 no se empleó ningún tratamiento. Se realizó la extracción de proteínas totales como se indica en el apartado 7.3.

7.2 Crecimiento celular

En cajas de 24 pozos se sembraron homogéneamente 10,000 células derivadas de astrocitomas humanos grado III y estas recibieron diferentes tratamientos: vehículo (agua desionizada), PIBF recombinante (200 ng/mL), P4 (10 nM) y PIBF + P4, para determinar la proliferación de las células U373. Las células se cosecharon cada día durante 5 días consecutivos con PBS 1X + EDTA (1 mM). El número de células vivas se midió mediante exclusión con colorante azul de tripano, usando un microscopio invertido (Olympus CKX41, Center Valley, PA) y empleando una cámara de Neubauer.

7.3 Extracción de proteínas totales

Con la finalidad de determinar el contenido de la proteína JAK fosforilada y si existe alguna asociación entre el PIBF y el receptor a IL-4 se realizó primeramente la extracción de proteínas a partir de las células U373, para lo cual, se les agregaron 500 μ L de amortiguador RIPA con una mezcla de inhibidores de proteasas [Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40/Tritón 1%,

desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, AEBSF (amino etil bencenil sulfonil fluoruro) 2 mM, aprotinina 0.3 μ M, bestatina 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 100 μ g/mL] a 4°C y se incubaron durante 1 hora en hielo. Para asegurar el lisado de las células, las muestras se hicieron pasar a través de una aguja de 21G x 32 mm. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C, se separó el sobrenadante y fue almacenado a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior cuantificación y separación de las proteínas mediante electroforesis.

La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 280 nm en un Thermo Scientific NanoDrop.

7.4 Coimmunoprecipitación

Para inmunoprecipitar el PIBF y observar su interacción con el receptor de IL-4, a 1 mg de proteína total obtenida de las células U373 se le añadieron 50 μ L de proteína A-agarosa y 2 μ g de anticuerpo anti PIBF. La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 2 lavados del precipitado con buffer RIPA a 8000 rpm por 5 minutos cada uno a 4°C, finalmente, se agregaron 30 μ L de buffer de Laemmli.

7.5 Western blot

Para determinar el contenido de la proteína JAK fosforilada, cada muestra de proteína obtenida de las células tratadas para determinar el contenido de la proteína JAK fosforilada (tomando un volumen correspondiente a 100 μ g) se mezcló con amortiguador de Laemmli 2X (Tris-base pH 6.8 100 mM, azul de bromofenol al 0.1%, glicerol al 20%, SDS al 4%, β -mercaptoetanol al 10%) en una proporción proteína-amortiguador de 2:1 (v/v) a 4°C, se hirvieron durante 5 min y se depositaron en geles de poliacrilamida. En tanto que las muestras para determinar si el PIBF se une al receptor de IL-4 en la línea celular U373, se hirvieron durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 12,500 rpm durante

15 min. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5%. Las muestras se concentraron en el gel concentrador (poliacrilamida al 4%) a 80 volts y posteriormente se separaron en el gel de corrida (poliacrilamida al 7.5%) a 80 volts durante 2 horas.

Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 120 mA durante 2 h en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon con una solución rica en proteínas al 3% (GE Healthcare) en TBS-Tween durante 2 h a 37°C.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el siguiente anticuerpo: anti-fosfo-JAK1 (purified rabbit IgG; R&D SYSTEMS AF4510) en una dilución 1:500 (1 µg/mL) en TBS-Tween (Tween al 0.05%) y anti-hIL-4R (purified mouse monoclonal IgG_{2A}; R&D SYSTEMS 25463) en una dilución 1:500 (1 µg/mL) en TBS-Tween (Tween al 0.05%). Posteriormente fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos y después incubadas a temperatura ambiente durante 45 min con un anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2357) en una dilución de 1:7500 (0.05 µg/mL), en el caso de JAK fosforilado y un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2005) en una dilución de 1:5000 en el caso del receptor a IL-4 (0.08 µg/mL). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas por quimioluminiscencia. Con este sistema, el peróxido de luminol junto con un activador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario reaccionan y generan una señal de quimioluminiscencia la cual es detectada al exponer las membranas a placas autoradiográficas (Kodak BioMax light film).

Con la finalidad de determinar si el cambio en la fosforilación de JAK fue debido al tratamiento con PIBF recombinante o P4 y no por un cambio en la cantidad de JAK total y para saber si efectivamente el PIBF se había unido al receptor de IL-4 se realizó lo siguiente: Las membranas fueron lavadas con glicina ácida (0.1 M, pH 2.5) a 4°C durante toda la noche y se bloquearon 2 h a 37°C con

una solución rica en proteínas al 3% en TBS-Tween, se incubaron con un anticuerpo primario anti-JAK1 (purified rabbit policlonal; Abcam ab47435) en una dilución 1:300 (3.3 µg/mL) y un anticuerpo anti-PIBF (mouse monoclonal IgG; Santa Cruz sc-166372) en una dilución 1:100 (2 µg/mL) durante toda la noche a 4°C, a continuación fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos y se incubaron 45 min con un anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2357) en una dilución de 1:7500 (0.05 µg/mL), en el caso de JAK y un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a peroxidasa en el caso del PIBF (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2005) en una dilución de 1:5000 (0.08 µg/mL).

7.6 Análisis densitométrico y estadístico

Las imágenes obtenidas fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el uso del Software ImageJ para analizar las bandas obtenidas del western blot y cuantificar la expresión de las proteínas JAK fosforilada y JAK total.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico a través de la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunett para la comparación de cada tratamiento con el control. Se utilizó el programa GraphPad Prism 4 para calcular los valores de probabilidad. En todas las pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza del 95% por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto del PIBF en la proliferación de células U373 derivadas de astrocitomas humanos grado III.

Para estudiar el papel del PIBF en el crecimiento de astrocitomas humanos grado III, las células U373 recibieron los tratamientos de vehículo (agua

desionizada), PIBF recombinante (200 ng/mL), P4 (10 nM) y PIBF + P4, y se cosecharon cada día durante 5 días consecutivos. Se realizó el conteo de células por medio de la técnica de tinción por exclusión con colorante azul de tripano, el cual atraviesa la membrana de las células muertas, mientras que en las células viables con membrana intacta, no se incorpora.

En la figura 13 se observa que la P4 incrementa el número de células U373 a partir del día 3 y hasta el día 5 respecto al vehículo, mientras que el PIBF y el tratamiento conjunto lo hacen a partir del día 4. La P4 + PIBF no presentan un efecto sinérgico sobre el incremento en el número celular.

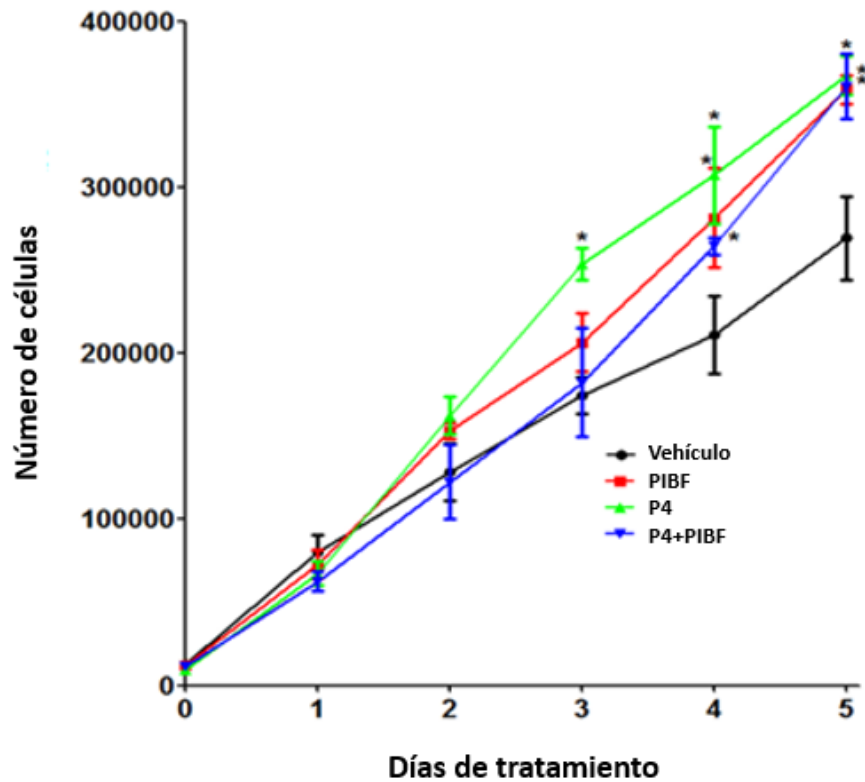


Figura 13. Efecto del PIBF en el número de células U373. Las células U373 recibieron los tratamientos de vehículo (agua desionizada), PIBF recombinante (200 ng/mL), P4 (10 nM) y PIBF + P4. Las células se cosecharon cada día durante 5 días consecutivos. El número de células vivas se midió mediante exclusión con colorante azul de tripano, usando un microscopio invertido y empleando una cámara de Neubauer. n=4. Los resultados son expresados como media \pm E.E * $p < 0.0001$ comparado con el vehículo.

8.2 Estudio del efecto del PIBF y la P4 en la fosforilación de la proteína JAK en células U373.

Para conocer el rol de la proteína JAK en los mecanismos de acción por los cuales el PIBF ejerce sus efectos en las células U373, se decidió estudiar el papel del PIBF sobre la fosforilación de la proteína JAK puesto que se sabe que se encuentra cascada arriba del mecanismo de activación de STAT6. Tanto el PIBF como la P4 pueden ejercer sus efectos en estas células a través de la activación de la proteína STAT6 (Valadez, 2013).

Para este propósito, las células U373 fueron tratadas con vehículo (agua desionizada) y P4 (10 nM) durante 24 horas, y PIBF recombinante (200 ng/mL) durante 20 minutos (Kozma et al., 2006), posteriormente se determinó la expresión de JAK fosforilada (p-JAK) por medio de la técnica de Western blot. Asimismo, se determinó la expresión de JAK total con el propósito de corroborar que el cambio en la fosforilación de JAK fuera debido al tratamiento con PIBF y no por un aumento en la expresión de JAK total. En el caso de los experimentos con P4, los resultados obtenidos tanto para p-JAK como para JAK total se normalizaron con respecto a α -tubulina.

En la figura 14 se observa que las células U373 tratadas con PIBF muestran un aumento significativo en la expresión de JAK fosforilada respecto a las tratadas con vehículo y P4, mientras que JAK total se mantiene constante. También se observa que la relación entre p-JAK y JAK total es significativamente mayor posterior al tratamiento con PIBF (figura 14).

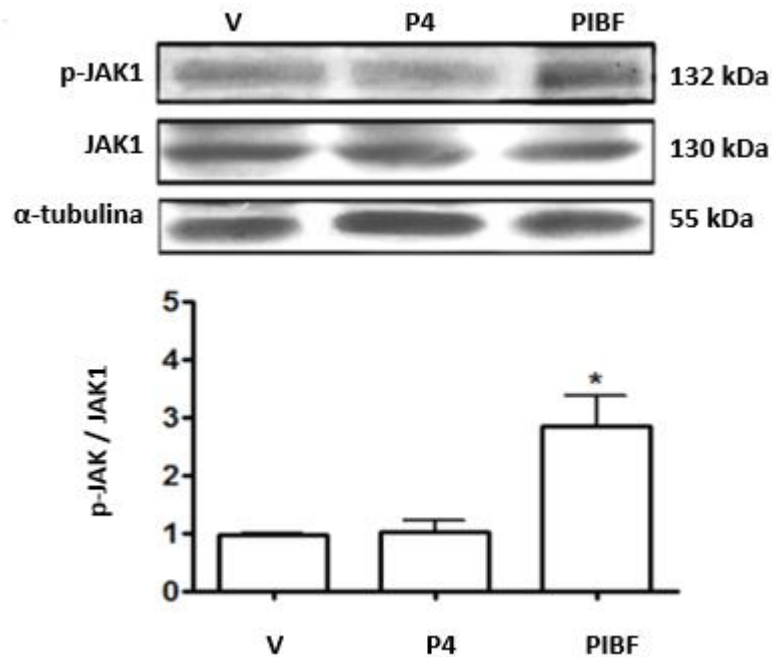


Figura 14. Efecto del PIBF y la P4 en la fosforilación de la proteína JAK en células U373. Las células U373 fueron tratadas con vehículo (agua desionizada) y P4 (10 nM) durante 24 horas, y con PIBF recombinante (200 ng/mL) durante 20 minutos, posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales y Western blot. El panel superior muestra las imágenes representativas de la expresión de la proteína JAK fosforilada y JAK total con un peso de 130 kDa. Las gráficas inferiores representan el análisis densitométrico de la expresión de JAK fosforilada con respecto a JAK total después de realizar 3 experimentos independientes. Los resultados son expresados en media \pm E.E * $p < 0.01$ comparado con vehículo (V).

8.3 Determinación de la asociación entre el PIBF y el receptor de IL-4 en la línea celular U373.

Se ha sugerido que en linfocitos humanos el PIBF es capaz de activar a las proteínas STAT6 mediante su unión al receptor de IL-4, para conocer si existe asociación del PIBF con el receptor de IL-4 en la línea celular U373, se obtuvieron proteínas totales mediante la lisis de las células U373, se coimmunoprecipitó el PIBF con un anticuerpo específico y posteriormente se identificó al receptor de IL-4 mediante Western blot.

En la figura 15 se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes, en donde se puede observar una banda de 90 kDa correspondiente al RIL-4 y dos bandas de menor peso, correspondientes a inmunoglobulinas tipo G, las cuales se observan debido al anticuerpo primario empleado para coimmunoprecipitar al PIBF.

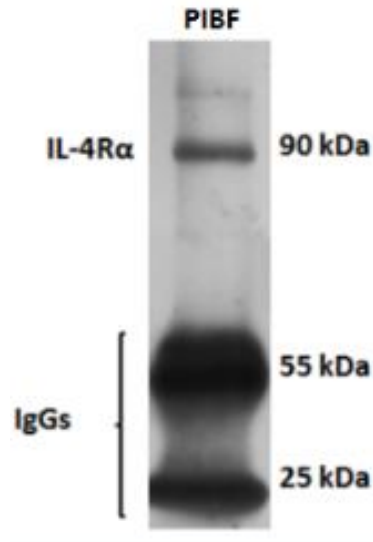


Figura 15. Asociación del PIBF con el receptor a IL-4 (RIL-4) en células U373. Para determinar la asociación del PIBF con el receptor de IL-4 en la línea celular U373, se obtuvieron proteínas totales mediante la lisis de las células U373, se coimmunoprecipitó el PIBF con un anticuerpo específico, para posteriormente identificar al receptor a IL-4 (RIL-4) mediante Western blot.

9. DISCUSIÓN

La P4 participa en la regulación de procesos patológicos como el crecimiento tumoral (Camacho-Arroyo et al., 2000). En el caso de los astrocitomas la P4 incrementa su proliferación (Carroll et al., 1995; González-Aguero et al., 2001; Khalid et al., 1997), Se ha demostrado que la P4 aumenta la proliferación celular en la línea U373 (grado III), a través de la interacción con su receptor intracelular, el RP (Carroll *et al.*, 1993; González-Agüero *et al.*, 2001., Henley et al., 2005), el cual mediante la activación de vías de señalización o de regulador transcripcional puede causar el aumento o disminución de la expresión de genes blanco (Boonyaratanakornkit et al., 2008; Misiti et al., 1998).

Se ha sugerido que uno de los genes regulados por la P4 es el PIBF, el cual se encuentra sobre-expresado en líneas celulares de leucemia, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de médula ósea y cáncer de útero (Lachmann et al., 2004).

Estudios en nuestro laboratorio, han sugerido que la P4 podría ejercer sus efectos en la expresión del PIBF mediante el mecanismo clásico, ya que el promotor del PIBF cuenta con dos medios elementos de respuesta a P4. Se sabe que los $\frac{1}{2}$ ERP son abundantes en promotores regulados por P4 y que la transcripción puede ser estimulada por esta hormona mediante la presencia de dos o tres $\frac{1}{2}$ ERP (Jacobsen et al., 2009).

En el presente trabajo se determinó el efecto del PIBF en la proliferación de células U373 mediante la técnica de tinción por exclusión.

En la figura 13 podemos observar que al día 4 el PIBF y el tratamiento conjunto (P4+PIBF) incrementan la proliferación de las células U373 y que muestran una diferencia respecto al vehículo. Por otra parte a pesar de que en el tratamiento conjunto se empleó P4+PIBF, no se observó un efecto sinérgico sobre el incremento en el número celular, lo que sugiere que el PIBF y la P4 podrían ejercer sus efectos sobre el incremento en el número celular a través de vías de activación en común.

De acuerdo a los antecedentes descritos, se ha sugerido que la vía de señalización de STAT6 podría ser uno de los mecanismos por los que el PIBF lleve a cabo sus funciones, se sabe que la proteína STAT6 es activada principalmente por dos citocinas, la interleucina 4 y la interleucina 13 (IL-4 e IL-13), una vez que las citocinas se unen a sus receptores inicia la cascada de activación de las proteínas STAT6. En la figura 15 se observa la asociación del PIBF con el receptor a IL-4 (RIL-4), lo que nos indica que la inducción de las proteínas STAT6 por el PIBF en esta línea celular podría darse a través de la activación del RIL-4. Con respecto al mecanismo de acción, se sabe que una vez que las respectivas citocinas se unen a sus receptores, las cinasas asociadas Janus (JAK) son activadas y fosforilan residuos conservados en el receptor. Las proteínas STAT6 citoplasmáticas se unen al receptor fosforilado vía su dominio SH2 permitiendo que JAK fosforile la tirosina 641 en STAT6. Una vez fosforilada, STAT6 forma homodímeros y se transloca al núcleo donde se une a la secuencia de

DNA TTCNNN(N)GAA presente en la región promotora de los genes de respuesta al IL-4 y es capaz de regular la transcripción (Fenghao et al., 1995; Wurster et al., 2000).

Estudios en nuestro laboratorio han encontrado que el PIBF y la P4 pueden ejercer sus efectos en las células U373 a través de la activación de STAT6, también estudios en otros laboratorios (Kozma et al., 2006) han observado que el PIBF regula positivamente la fosforilación de STAT6 en linfocitos humanos. Para determinar el efecto del PIBF en la fosforilación de la proteína JAK, se trataron las células U373 con PIBF (200ng/mL) durante 20 minutos. En la figura 14 podemos observar que el PIBF aumentó significativamente la fosforilación de la proteína JAK. Se sabe que la activación de JAK es requerida para posteriormente fosforilar la tirosina 641 en STAT6, lo que induce su activación y que le permitirá actuar como factor de transcripción de genes relacionados con la proliferación celular (Wurster et al., 2000). Se sabe que en otras líneas celulares de astrocitomas grados III y IV (U-1242MG y U-87MG) STAT6 se encuentra sobre-expresada en comparación con astrocitos normales y esto coincide con un aumento en la invasividad y el crecimiento de las células tumorales (Merk et al., 2011).

De manera interesante, observamos que el tratamiento de P4 no modifica la expresión de JAK total ni su fosforilación. De acuerdo a estos resultados podemos proponer que el aumento de la fosforilación de JAK por el PIBF, la asociación de éste con el RIL-4, así como lo reportado anteriormente en nuestro laboratorio donde se ha observado el aumento de la fosforilación de STAT6, se puede correlacionar con el aumento en la proliferación celular de la línea U373.

10. CONCLUSIONES

El PIBF aumenta el número de células de la línea U373 derivada de un astrocitoma humano grado III.

El PIBF se asocia al receptor de IL-4 (RIL-4).

El PIBF induce la fosforilación de JAK en las células U373 lo cual puede estar relacionado con los efectos del PIBF en las células.

11. REFERENCIAS

- Alcantara Llaguno, S.R., Chen, J., and Parada, L.F. (2009). Signaling in malignant astrocytomas: role of neural stem cells and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 15, 7124–7129.
- Badash M. (2009). *Astrocitoma*, New York University Medical Center DoN, pp 1-4: EBSCO publishing.
- Baulieu, E.E. (1999). Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr Suppl* 88, 78–80.
- Bigner, S.H., Mark, J., and Bigner, D.D. (1990). Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 47, 141–154.
- Boonyaratankornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., and Edwards, D.P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73, 922–928.
- Bramley, T. (2003). Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125, 3–15.
- Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O.T., and Camacho-Arroyo, I. (2012). Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem* 11, 1663–1667.
- Cabrera-Muñoz E, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo I. (2011) Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem* 11(13):1663-7.
- Cabrera-Muñoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., and Camacho-Arroyo, I. (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113, 80–84.
- Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Perez-Palacios, G., and Cerbón, M.A. (1995). [Progesterone and its metabolites in central nervous system function]. *Rev Invest Clin* 47, 329–340.

Camacho-Arroyo, I., González-Agüero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M.A., and Ondarza, R. (2000a). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* 49, 1–7.

Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Domínguez, R., Mendoza-Rodríguez, C.A., Cruz, M.E., and Cerbón, M.A. (2000b). c-Fos gene expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats. *Brain Res.* 867, 100–106.

Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González-Aguero, G., Guerra-Araiza, C., and 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., and Rodríguez-Dorantes, M. (2006). Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In *Molecular Endocrinology* (India: Research signpost), pp. 25-38.

Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., and González-Moran, G. (2007). Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 644–652.

Carroll, R.S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., and Black, P.M. (1995). Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37, 494–496.

Check, J.H., Dix, E., and Sansoucie, L. (2009). Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein. *Med Hypotheses* 72, 87–90.

Chen, Y.-H., and Gutmann, D.H. (2013). The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene* 1–8.

Clemm, D.L., Macy, B.L., Santiso-Mere, D., and McDonnell, D.P. (1995). Definition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 487–495.

Conneely, O.M., and Lydon, J.P. (2000). Progesterone receptors in reproduction functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 65, 571-577.

Daumas-Duport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J., and Kelly, P. (1988). Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62, 2152–2165.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.

Faust, Z., Laskarin, G., Rukavina, D., and Szekeres-Bartho, J. (1999). Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 42, 71–75.

Fenghao, X., Saxon, A., Nguyen, A., Ke, Z., Diaz-Sanchez, D., and Nel, A. (1995). Interleukin 4 activates a signal transducer and activator of transcription (Stat) protein which interacts with an interferon-gamma activation site-like sequence upstream of the I epsilon exon in a human B cell line. Evidence for the involvement of Janus k. *J Clin Invest* 96, 907–914.

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, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683–2710.

Ganong W (2006). Las gónadas: desarrollo y función del sistema reproductor. In: *Fisiología médica*, edn. México: El Manual Moderno. pp 387-425.

Giangrande, P.H., and 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.

Giannoni, E., Guignard, L., Knaup Reymond, M., Perreau, M., Roth-Kleiner, M., Calandra, T., and Roger, T. (2011). Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infect Immun* 79, 2690–2698.

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

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

González-Arenas, A., Villamar-Cruz, O., Guerra-Araiza, C., and 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.

Graham, J.D., and Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502–519.

Guerra-Araiza, C., Cerbon, M.A., Morimoto, S., and Camacho-Arroyo, I. (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 66, 1743–1752.

Hadjipanayis, C.G., and Van Meir, E.G. (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* 15, 519–530.

Hansberg P.V. (2011). Papel de la metilación en la regulación de la expresión de las isoformas A y B del receptor a progesterona en líneas celulares de astrocitomas humanos. TESIS para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas). UNAM.

Henley D, Lindzey J, Korach K (2005). Steroid Hormones. In: Melmed S, Conn P. *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*, 2 edn. New Jersey: Humana Press. pp 49-65.

Hernández-Hernández, O.T., Gonzalez-Garcia, T.K., and 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.

Hernández-Hernández OT. and Camachp-Arroyo I. (2013). Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF, *Mini Rev Med Chem* 13(5): 635-42.

Ichimura, K., Ohgaki, H., Kleihues, P., and Collins, V.P. (2004). Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* 70, 137–160.

Jacobsen, B.M., and Horwitz, K.B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357, 18–29.

Jacobsen, B.M., Jambal, P., Schittone, S.A., and Horwitz, K.B. (2009). ALU repeats in promoters are position-dependent co-response elements (coRE) that enhance or repress transcription by dimeric and monomeric progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 23, 989–1000.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and 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.

Khalid, H., Shibata, S., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Iseki, M., and Hiura, T. (1997). Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 80, 2133–2140.

Kim, T.S., Halliday, A.L., Hedley-Whyte, E.T., and Convery, K. (1991). Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J Neurosurg* 74, 27–37.

Kiu Hiu, Nicholson SE (2012) Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways, *Growth Factors* 30 (2):88-106.

Klein, T.E., Chang, J.T., Cho, M.K., Easton, K.L., Fergerson, R., Hewett, M., Lin, Z., Liu, Y., Liu, S., Oliver, D.E., et al. (2001). Integrating genotype and phenotype information: an overview of the PharmGKB project. *Pharmacogenetics Research Network and Knowledge Base. Pharmacogenomics J* 1, 167–170.

Kozma, N., Halasz, M., Polgar, B., Poehlmann, T.G., Markert, U.R., Palkovics, T., Keszei, M., Par, G., Kiss, K., Szeberenyi, J., et al. (2006). Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J Immunol* 176, 819–826.

Kraus, W.L., Montano, M.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7, 1603–1616.

Lachmann, M., Gelbmann, D., Kalman, E., Polgar, B., Buschle, M., Von Gabain, A., Szekeres-Bartho, J., and Nagy, E. (2004). PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer* 112, 51–60.

Lahiri, S., Seidel, R., Engelhard, M., and Becker, C.F.W. (2010). Photocontrol of STAT6 dimerization and translocation. *Mol. Biosyst.* 6, 2423–2429.

Laskarin, G., Tokmadzic, V.S., Strbo, N., Bogovic, T., Szekeres-Bartho, J., Randic, L., Podack, E.R., and Rukavina, D. (2002). Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* 48, 201–209.

Liu, T., and Ogle, T.F. (2002). Signal transducer and activator of transcription 3 is expressed in the decidualized mesometrium of pregnancy and associates with the progesterone receptor through protein-protein interactions. *Biol Reprod* 67, 114–118.

Loosfelt, H., Atger, M., Misrahi, M., Guiochon-Mantel, A., Merial, C., Logeat, F., Benarous, R., and Milgrom, E. (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9045–9049.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97-109.

Makhseed, M., Raghupathy, R., El-Shazly, S., Azizieh, F., Al-Harmi, J.A., and Al-Azemi, M.M. (2003). Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 49, 308–318.

Merk, B.C., Owens, J.L., Lopes, M.-B.S., Silva, C.M., and Hussaini, I.M. (2011). STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth. *BMC Cancer* 11, 184.

Miller, H.M., Foxcroft, G.R., Squires, J., and Aherne, F.X. (1999). The effects of feed intake and body fatness on progesterone metabolism in ovariectomized gilts. *J Anim Sci* 77, 3253–3261.

Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P.M., and Chin, W.W. (1998). Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139, 2493–2500.

Misrahi, M., Venencie, P.Y., Saugier-veber, P., Sar, S., Dessen, P., and Milgrom, E. (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1216, 289–292.

Polgar, B., Barakonyi, A., Xynos, I., and Szekeres-Bartho, J. (1999). The role of gamma/delta T cell receptor positive cells in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 41, 239–244.

Polgar, B., Kispal, G., Lachmann, M., Paar, C., Nagy, E., Csere, P., Miko, E., Szereday, L., Varga, P., and Szekeres-Bartho, J. (2003). Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J Immunol* 171, 5956–5963.

Polgar, B., Nagy, E., Miko, E., Varga, P., and Szekeres-Bartho, J. (2004). Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod* 71, 1699–1705.

Ramaswamy, R., Ashton, K., Lea, R., Roberts, P., Davis, C.H., Golash, A., and Dawson, T. (2012). Study of effectiveness of mifepristone for glioma cell line growth suppression. *Br J Neurosurg* 26, 336–339.

Rousseau-Merck, M.F., Misrahi, M., Loosfelt, H., Milgrom, E., and Berger, R. (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet* 77, 280–282.

Rozenblum, E., Vahteristo, P., Sandberg, T., Bergthorsson, J.T., Syrjakoski, K., Weaver, D., Haraldsson, K., Johannsdottir, H.K., Vehmanen, P., Nigam, S., et al. (2002). A genomic map of a 6-Mb region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. *Hum Genet* 110, 111–121.

Sarkar, C., Jain, A., and Suri, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46, 108–119.

Sartorius, C.A., Melville, M.Y., Hovland, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1994). A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8, 1347–1360.

Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J.P., Mattern, C., and Ghoumari, A.M. (2012). Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 6, 10.

Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D., and Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pr. Neurol* 2, 494–503; quiz 1 p following 516.

Srivastava, M.D., Thomas, A., Srivastava, B.I., and Check, J.H. (2007). Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk Lymphoma* 48, 1610–1617.

Szekeres-Bartho, J., and Polgar, B. (2010). PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. *Am J Reprod Immunol* 64, 77–86.

Szekeres-Bartho, J., Kilar, F., Falkay, G., Csernus, V., Torok, A., and Pacsa, A.S. (1985). The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 9, 15–18.

Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., and Chaouat, G. (1990). The effect of a progesterone-induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am J Reprod Immunol* 24, 105–107.

Szekeres-Bartho, J., Faust, Z., Varga, P., Szereday, L., and Kelemen, K. (1996). The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol* 35, 348–351.

Szekeres-Bartho, J., Par, G., Dombay, G., Smart, Y.C., and Volgyi, Z. (1997a). The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol* 177, 194–199.

Szekeres-Bartho, J., Par, G., Szereday, L., Smart, C.Y., and Achatz, I. (1997b). Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 38, 176–182.

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

Tetel MJ, Lange CA (2009). Molecular Genomics of Progestin Actions. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (ed)(eds). *Hormones, Brain and Behavior*, edn. USA: Academic Press. pp 1439-1465.

Theveny, B., Bailly, A., Rauch, C., Rauch, M., Delain, E., and Milgrom, E. (1987). Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature* 329, 79–81.

Tihan, T., and Bloomer, M.M. (2010). Astrocytic neoplasms of the central nervous systems and orbit: a morphologic perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology* 27, 114-121.

Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451–486.

Tung, L., Mohamed, M.K., Hoeffler, J.P., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1993). Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol* 7, 1256–1265.

Valadez, C.P., (2013). Papel de la progesterona en la expresión del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) y en la fosforilación del factor transcripcional STAT6 en células derivadas de astrocitomas humanos. TESIS para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM.

Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., and McDonnell, D.P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7, 1244–1255.

Westphal, U., and Harding, G.B. (1973). Steroid-protein interactions. XXVII. Progesterone binding to polymers of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 310, 518–527.

Xie, Z. (2009). Brain tumor stem cells. *Neurochem Res* 34, 2055–2066.

Zamorano, J., Rivas, M.D., Garcia-Trinidad, A., Qu, C.K., and Keegan, A.D. (2003). Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity is necessary for the activation of STAT6. *J Immunol* 171, 4203–4209.

