



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR A  
ESTRÓGENOS BETA POR LA PROTEÍNA CINASA  
C EN CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**RUBÍ HERNÁNDEZ ROJAS**

**DIRECTORA DE TESIS**

**Dra. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Abreviaturas

AEBSF	4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato
AF	Función de activación
Akt	Proteína cinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Adenomatous Polyposis Coli
<i>AXIN2</i>	Gen de la proteína relacionada a axina
<i>CCND1</i>	Gen de la ciclina D1
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2
CDK7	Cinasa dependiente de ciclina 7
CK2	Caseína cinasa II
<i>CREBBP</i>	Gen de la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
<i>CTNNB1</i>	Gen de la $\beta$ -catenina-1
DAG	Diacilglicerol
DBD	Dominio de unión a ADN
<i>DDX3X</i>	Gen de la Helicasa 3 de ARN, ligada al cromosoma X.
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
Fzd	Receptores Frizzled
GSK-3 $\beta$	Glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$
Hsp	Proteínas de choque térmico
IRM	Imagen por resonancia magnética
<i>JUN</i>	Protooncogen JUN
kDa	Kilo Daltones
LBD	Dominio de unión a ligando
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LEF	Factor potenciador linfoide
LRP	Proteína asociada al receptor de lipoproteínas de baja densidad
mA	mili Amperes
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MNAR	Modulador de la actividad no genómica de los RE

<i>MYC</i>	Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar V-myc
PBS	Solución buffer de fosfatos
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKCa	Proteínas cinasas C atípicas
PKCc	Proteínas cinasas C clásicas
PKCn	Proteínas cinasas C nuevas
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PS	Fosfatidilserina
RE	Receptores a estrógenos
RP	Receptor a progesterona
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SHH	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
STK36	Serina/treonina cinasa 36
TBS	Solución amortiguadora Tris
TCF	Factor de células T
TP53	Proteína tumoral p53
TPA	2-O-tetradecanoil-13-acetato de forbol
WNT	Wingless
$\beta$ -TrCP	Proteína ubiquitina ligasa que contiene repeticiones de beta-transducina

## Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	4
3.1 Meduloblastoma	
3.1.1 Definición de meduloblastoma.....	4
3.1.2 Epidemiología.....	5
3.1.3 Clasificación.....	5
3.1.3.1 Clasificación histopatológica.....	5
3.1.3.2 Clasificación molecular.....	7
3.1.4 Diagnóstico y tratamiento.....	14
3.2. Receptores a estrógenos (RE)	
3.2.1 Función e isoformas de los RE.....	16
3.2.2 Estructura de los RE.....	17
3.2.3 Mecanismos de acción.....	19
3.2.3.1 Mecanismos ligando dependientes.....	19
3.2.3.1.1 Mecanismo clásico o genómico.....	19
3.2.3.1.2 Interacción con factores de transcripción.....	20
3.2.3.1.3 Mecanismos rápidos a través de la activación de MAPK.....	21
3.2.3.1.4 Mecanismos rápidos a través de la activación de PI3K/Akt.....	22
3.2.3.2 Mecanismo ligando independiente: fosforilación de los RE.....	23
3.2.4 Papel de los RE en cáncer.....	26
3.2.5 RE en meduloblastoma.....	28
3.3. Proteína cinasa C (PKC)	
3.3.1 Familia de las PKC.....	30
3.3.2 PKC en meduloblastomas.....	33
4. Planteamiento del problema.....	34
5. Hipótesis.....	34
6. Objetivos.....	34
7. Materiales y métodos.....	35
7.1 Cultivo celular.....	35
7.2 Obtención de proteínas.....	35
7.3 Inmunoprecipitación.....	36

7.4 Western blot.....	37
7.5 Análisis de datos.....	39
8. Resultados.....	40
8.1 Determinación de PKC $\alpha$ asociada al RE $\beta$ .....	40
8.2 Fosforilación del RE $\beta$ inducida por la activación de PKC $\alpha$ .....	41
8.3 Efecto de la activación de PKC sobre el contenido del RE $\beta$ .....	42
9. Discusión.....	43
10. Conclusiones.....	46
11. Perspectivas.....	46
12. Referencias.....	47

## 1. Resumen

Los meduloblastomas son los tumores más frecuentes y malignos en la población pediátrica con un pico de incidencia de los 3 a los 6 años. Diversos factores han sido asociados con el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas y, recientemente, se ha reportado que el receptor a estrógenos beta ( $RE\beta$ ) y la proteína cinasa C alfa ( $PKC\alpha$ ) están involucrados en los procesos tumorales de estas neoplasias.

Por medio de ensayos *in silico* hemos identificado al residuo Ser219 del  $RE\beta$  como posible sitio de fosforilación por  $PKC\alpha$ , por lo que en este trabajo se estudió el papel de  $PKC\alpha$  sobre la fosforilación del  $RE\beta$  en la línea celular DAOY derivada de meduloblastoma con la finalidad de sentar las bases para futuras investigaciones sobre la implicación de esta vía en el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas. Para lo anterior, células DAOY derivadas de un meduloblastoma humano fueron estimuladas con TPA, un éster de forbol activador de PKC clásicas y nuevas.

Haciendo uso de la técnica de coimmunoprecipitación, se precipitó al  $RE\beta$  y mediante Western blot, se identificó a  $PKC\alpha$  asociada a este receptor. Los resultados mostraron que existe una asociación basal  $RE\beta$ - $PKC\alpha$ . Se observó un aumento significativo en esta asociación 5 minutos después del tratamiento con TPA y este efecto regresó a sus niveles basales después de 30 minutos.

Para estudiar el efecto en la fosforilación del  $RE\beta$  inducida por la activación de  $PKC\alpha$ , el receptor fue inmunoprecipitado y, mediante Western blot y el uso del kit pIMAGO que detecta proteínas fosforiladas, se detectó al  $RE\beta$  fosforilado después del tratamiento con TPA. Se observó que el  $RE\beta$  se encuentra basalmente fosforilado y esta fosforilación aumenta a los 5 minutos de tratamiento con TPA; el efecto se mantuvo hasta los 30 minutos.

Finalmente, el efecto de la activación de  $PKC\alpha$  sobre el contenido del  $RE\beta$  se determinó estimulando los cultivos celulares con TPA durante 1, 3, 5, 10 y 20

horas; la expresión del RE $\beta$  se determinó mediante Western blot; no se encontraron diferencias significativas en el contenido del RE $\beta$ .

Se concluye que la activación de PKC $\alpha$  con TPA provoca un aumento significativo en la asociación RE $\beta$ -PKC $\alpha$  a los 5 minutos, y un aumento significativo en el contenido del RE $\beta$  fosforilado desde los 5 y hasta los 30 minutos en la línea celular DAOY.

## **2. Introducción**

Los meduloblastomas son neoplasias embrionarias clasificadas como tumores primitivos del neuroectodermo. Estos tumores son las neoplasias cerebrales más comunes y malignas en la población pediátrica, ya que representan aproximadamente el 20% de los tumores del sistema nervioso central en esta población; el pico de edad se presenta desde los 3 hasta los 6 años de edad. Aunque el pronóstico de los pacientes con meduloblastomas depende del grado de malignidad, localización y tamaño, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años no es mayor al 80%, además, cerca del 100% de ellos presentan secuelas incurables. Se han encontrado diversos factores asociados al desarrollo de los meduloblastomas, entre los que se encuentra el receptor a estrógenos beta (RE $\beta$ ).

Los receptores a estrógenos (RE) tienen roles importantes en el desarrollo y funcionamiento normal de tejidos reproductivos y no reproductivos, ya que regulan procesos celulares como proliferación y diferenciación celular. Los RE pertenecen a la superfamilia de receptores intracelulares que funcionan como factores de transcripción. Estos receptores presentan 2 isotipos: RE $\alpha$  y RE $\beta$ .

Estudios *in vitro* han demostrado que el mecanismo de activación del RE por su ligando regula el crecimiento y la migración de células de meduloblastoma, además, estudios *in vivo* demuestran el potencial terapéutico de los inhibidores del RE $\beta$  para inhibir el crecimiento de estos tumores.

Se han realizado diversos estudios que han determinado que la fosforilación de sitios específicos en estos receptores puede modificar su actividad transcripcional de forma dependiente o independiente de ligando.

En el ratón se han descrito 6 sitios de fosforilación para el RE $\beta$  y dos sitios de fosforilación en el humano. A través de los softwares KinasePhos 0.1, NetPhos 2.0 y GPS 2.1, hemos identificado al residuo Ser219 del RE $\beta$  como posible sitio de fosforilación por PKC $\alpha$ ; por lo anterior resulta de gran interés el estudio de la fosforilación del RE $\beta$  por PKC $\alpha$ , ya que podría regular la actividad transcripcional del receptor, y por lo tanto, podría participar en la regulación de la proliferación, migración, invasividad y apoptosis de células de meduloblastoma.

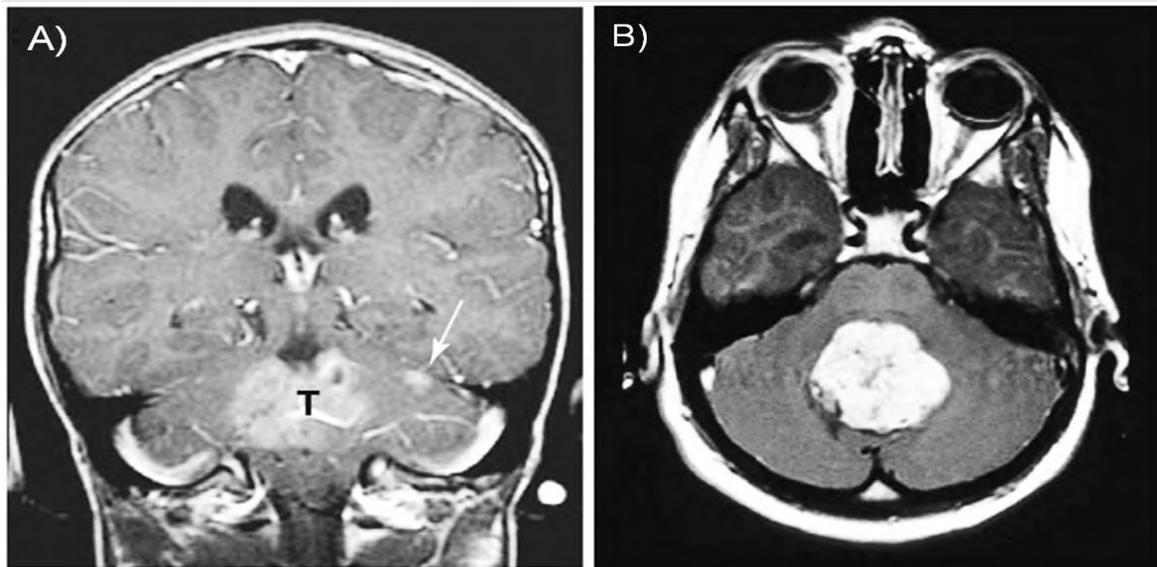
Un estudio mostró que en la línea celular DAOY derivada de un meduloblastoma, el tratamiento con TPA (12-O-tetradecanoil-13-acetato de forbol: activador de PKC) aumenta la proliferación celular, mientras que la inhibición farmacológica o el silenciamiento de PKC $\alpha$  causaron una disminución de la proliferación.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Meduloblastoma

##### 3.1.1 Definición

El meduloblastoma es el tumor cerebral más frecuente en la población pediátrica. Se trata de un tumor embrionario de origen neuroectodérmico, maligno e invasivo del cerebelo que presenta una tendencia inherente a la metástasis a través de la vía del líquido cefalorraquídeo (LCR), con evidencia de metástasis en más del 30% de los casos diagnosticados; la diseminación fuera del Sistema Nervioso Central (SNC) es muy rara al momento del diagnóstico. Los meduloblastomas surgen en la fosa posterior, usualmente en el vermis cerebeloso en el techo del cuarto ventrículo o en los hemisferios cerebelares (Fig. 1) (Brandes et al., 2009; Smoll y Drummond et al., 2012). Algunos trastornos genéticos (síndrome de Gorlin, síndrome de Turcot, entre otros), han sido asociados con el incremento del riesgo de padecer meduloblastoma, sin embargo, la etiología de la mayoría de los pacientes es desconocida (Smoll y Drummond, 2012).



**Fig. 1.** Imágenes de meduloblastoma obtenidas por resonancia magnética (IRM) T1 ponderadas con gadolinio. **A)** Corte coronal: el tumor mayor se etiqueta con una “T”; la metástasis se señala con una flecha blanca (Modificada de Hatten & Roussel, 2011). **B)** corte axial: meduloblastoma de localización típica en la fosa posterior en un niño de 8 años (Modificada de Brandes et al., 2009).

### *3.1.2 Epidemiología*

Los meduloblastomas representan aproximadamente el 20% de los tumores pediátricos del sistema nervioso central; cerca del 70% de todos los casos son diagnosticados en pacientes con edades menores a 15 años y solo el 25% son diagnosticados en pacientes entre 15 y 44 años. El pico de incidencia de los meduloblastomas se presenta en niños de entre 3 y 6 años de edad. Durante la infancia, los varones tienen aproximadamente 1.58 más probabilidades de ser diagnosticados con meduloblastomas que las mujeres (Smoll y Drummond, 2012; Belcher et al., 2009; De Braganca y Millard, 2015 Brandes et al., 2009; Ciucci et al., 2014).

Aunque el pronóstico de los pacientes con meduloblastomas depende del grado de malignidad, localización y tamaño, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años no sobrepasa el 80%, además, casi el 100% de ellos presentan secuelas incurables, entre las que destacan deterioros cognitivos y alteraciones en las funciones endócrinas, así como la aparición de neoplasias secundarias (Smoll y Drummond, 2012).

### *3.1.3 Clasificación*

#### *3.1.3.1 Clasificación histopatológica*

En la clasificación de los tumores del SNC realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2007, se clasifica a los meduloblastomas según su histología en 1) clásicos, 2) desmoplásicos/ nodulares, 3) anaplásicos, 4) de células grandes y 5) con nodularidad extensa (Louis et al., 2007).

### *Clásicos*

La variante clásica representa aproximadamente el 80% de los meduloblastomas en niños y el 70% en adultos. Las células de meduloblastoma clásico tienen un tamaño pequeño a medio, forma redonda a ovalada, núcleo hipercromático y escaso citoplasma, se asocian con alta actividad mitótica y pleomorfismo nuclear incrementado. El meduloblastoma clásico se caracteriza por alta celularidad e índices elevados de proliferación (Brandes et al., 2009; De Braganca y Millard, 2015).

### *Desmoplásicos/nodulares*

Los meduloblastomas desmoplásicos/nodulares se caracterizan por regiones internodulares desmoplásicas con células embionarias desdiferenciadas y ricas en fibras reticulares, contienen nódulos de células de diferenciación neurocítica que expresan proteínas neuronales y tienen una baja tasa de crecimiento. Esta variante representa el 15% en la población pediátrica y del 30 al 40% en adultos (Brandes et al., 2009; De Braganca y Millard, 2015; Giangaspero et al., 1999; Ellison, 2010).

### *Anaplásicos*

Los meduloblastomas anaplásicos representan del 10 al 20% de los casos diagnosticados. Hasta la fecha no existe información acerca de la proporción en adultos y niños. Se caracterizan histológicamente por un marcado pleomorfismo nuclear, embalaje célula-célula, abundantes cuerpos apoptóticos y alta actividad mitótica, usualmente con formas atípicas. Aunque los meduloblastomas presentan algún grado de atipia, estos cambios son particularmente pronunciados y generalizados en la variante anaplásica. (Brandes et al., 2009; Lous et al., 2007; Ellison, 2010).

### *De células grandes*

La variante de células grandes comprende células esféricas con núcleo grande, redondo y vesicular, cromatina de estructura abierta y nucleolo central prominente. Esta variante representa del 2-4% de los meduloblastomas (Brandes et al., 2009; De Braganca y Millard, 2015).

### *De nodularidad extensa*

Los meduloblastomas con nodularidad extensa están estrechamente relacionados con los meduloblastomas desmoplásicos/nodulares; se distinguen de esta variante debido a que exhiben una arquitectura lobular marcadamente expandida, debido al hecho de que las zonas libres de reticulina se vuelven inusualmente grandes y ricas en tejido tipo neurópilo (región comprendida entre varios cuerpos celulares o somas de neuronas de la sustancia gris del encéfalo y la médula espinal). Estas zonas contienen una población de células pequeñas (Louis et al., 2007). Esta variante representa aproximadamente el 3% de los casos diagnosticados (Brandes et al., 2009; Louis et al., 2007; Giangaspero et al., 1999). Las variantes clásica, desmoplásico/nodular y de nodularidad extensa están asociadas a un mejor pronóstico en niños menores de 5 años, mientras que los meduloblastomas anaplásicos y de células grandes tienen un peor pronóstico en pacientes de cualquier edad (De Braganca y Millard, 2015; Ellison, 2010).

### *3.1.3.2 Clasificación molecular*

El estudio del perfil transcripcional en los meduloblastomas ha permitido clasificarlos en distintos subgrupos moleculares con diferentes características citogenéticas, mutacionales y de expresión de genes, así como diferente demografía, histología y prognosis (Kool et al., 2012; Brandes et al., 2014; Perreault et al., 2014; De Braganca y Millard, 2015). Por consenso, se habla de cuatro subgrupos: WNT (Wingless), SHH (Sonic hedgehog), grupo 3 y grupo 4.

## WNT

El subgrupo WNT se caracteriza por un aumento en la activación de la vía canónica de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. La alteración genética más común en estos tumores es una mutación en el gen  $\beta$ -catenina-1 (CTNNB1), que permite un aumento en la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular (Kongkham et al., 2010).

En ausencia del ligando Wnt, las  $\beta$ -cateninas citoplasmáticas son degradadas por un complejo multiproteico que comprende: 1) la enzima glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) cuya función es marcar, mediante fosforilación, a las  $\beta$ -cateninas para su ubiquitinación y degradación mediante proteosomas; 2) una proteína llamada APC (por sus siglas en inglés Adenomatous Polyposis Coli), que incrementa la afinidad del complejo de degradación hacia las  $\beta$ -cateninas; 4) una proteína ubiquitina ligasa que contiene repeticiones de beta-transducina,  $\beta$ -TrCP (Fig. 2) encargada de reconocer los residuos fosforilados y 3) la proteína llamada axina, que mantiene unido al complejo de degradación (Ochoa et al., 2012).

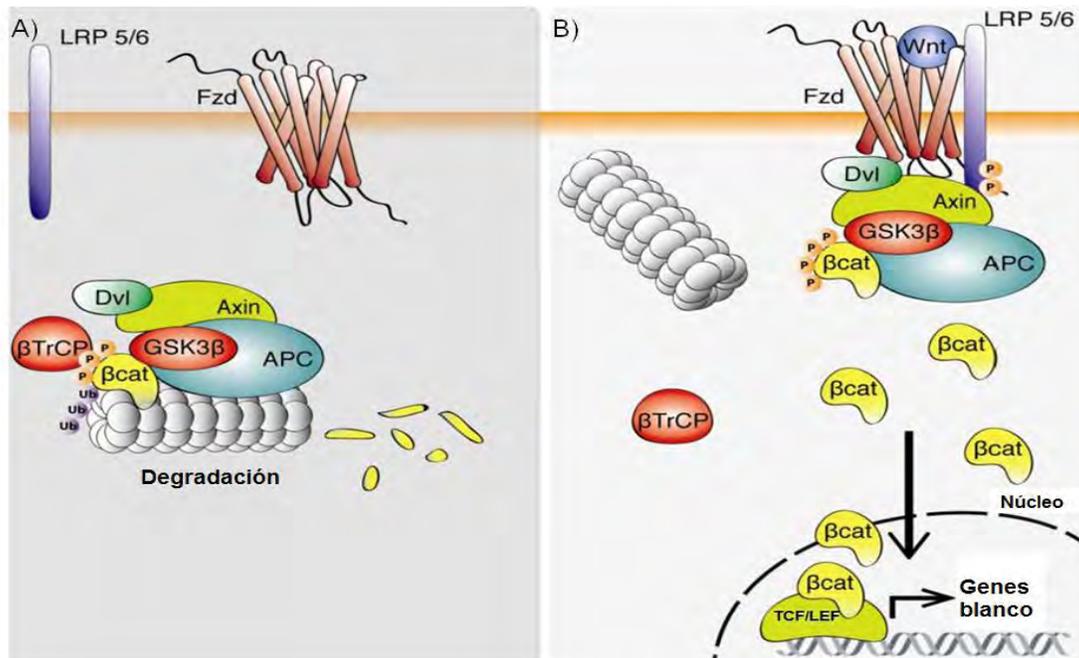
La llegada del ligando Wnt activa la vía al unirse al complejo receptor compuesto por el receptor de siete dominios transmembranales Frizzled (Fzd) y una proteína asociada al receptor de lipoproteínas de baja densidad LRP5 o LRP6. La unión del ligando conduce a la formación de un complejo trimolecular Wnt-Fzd-LRP 5/6. Este proceso conlleva a la fosforilación de la proteína denominada dishevelled (Dvl), que a su vez conlleva al reclutamiento de axina al tallo fosforilado del LRP, destruyendo el complejo multiproteico e inhibiendo la fosforilación de la  $\beta$ -catenina por la GSK-3 $\beta$ . La  $\beta$ -catenina estabilizada es translocada al núcleo, donde interactúa con factores de transcripción de células T (TCF) y con el factor potenciador linfocitario (LEF) para activar la transcripción de genes blanco como MYC (Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar V-myc), JUN (proto-oncogen JUN; subunidad del factor de transcripción AP-1 que interactúa directamente con el ADN para regular la expresión génica), AXIN2 (proteína relacionada a axina) y

CCND1 (Ciclina D1: regulador de las cinasas dependientes de ciclina) (Fig. 2) (Li et al., 2013; Inestrosa et al., 2013).

Otros genes que participan en la vía Wnt frecuentemente alterados en meduloblastoma son los DDX3X (Helicasa 3 DEAD box de ARN, ligada al cromosoma X; codifica una proteína con actividad de helicasa de ARN dependiente de ATP), AXIN1 (proteína relacionada a axina 1), CREBBP (Proteína de unión a CREB; gen involucrado en la coactivación transcripcional de diversos factores de transcripción; la proteína codificada posee actividad intrínseca de histona acetiltransferasa), TP53 (proteína tumoral p53; proteína supresora de tumor) y SMARCA4 (relacionada a SWI/SNF, matriz asociada, regulador dependiente de actina de la cromatina, subfamilia A, miembro 4; proteína con actividad de helicasa y ATPasa) (Gopalakrishnan et al., 2015). Además, es frecuente la pérdida total o parcial del cromosoma 6 (Kool et al., 2012; 12).

Este subgrupo posee características histológicas clásicas y de células grandes, su pronóstico es mejor en niños con tasas de supervivencia a los 5 años mayores a 95%, mientras que en adultos este valor es aproximadamente 80% (Brandes et al., 2014; Perreault et al., 2014; Ramaswamy et al., 2011). Menos del 10% de los casos se presentan con metástasis al momento del diagnóstico. El subgrupo WNT es el menos común y corresponde al 10% de los meduloblastomas en niños y 15% en adultos (Remke et al., 2011).

Se sabe que los pacientes con síndrome de Turcot tipo 2 o poliposis adenomatosa familiar, caracterizada por la presencia de centenares de pólipos adenomatosos en la mucosa del intestino grueso (Sáez, 2008) presentan mayor riesgo de padecer meduloblastoma que la población en general. Este síndrome se caracteriza por la pérdida de la funcionalidad del gen APC (Ellison et al., 2011).



**Fig. 2.** Representación esquemática de la vía canónica de la vía señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.

**A)** En ausencia de proteínas Wnt, la  $\beta$ -catenina se encuentra formando parte de un complejo compuesto por axina, la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) y la proteína APC (Adenomatous Polyposis Coli). La GSK-3 $\beta$  fosforila a la  $\beta$ -catenina; la  $\beta$ -catenina fosforilada es reconocida por la proteína ubiquitina ligasa  $\beta$ -TrCP, por lo que es consecuentemente ubiquitinada y degradada por el proteasoma. **B)** La vía de señalización Wnt se activa por la unión de las proteínas Wnt a los receptores Frizzled en presencia del correceptor LRP 5/6 resultando en la formación de un complejo trimolecular Wnt-Fzd-LRP 5/6. La formación del complejo conduce a la fosforilación de la proteína Dishevelled (Dvl), lo que conlleva al reclutamiento de axina al tallo fosforilado del LRP, inhibiendo la fosforilación de CTNNB1 por la GSK-3 $\beta$ . La  $\beta$ -catenina estabilizada es translocada al núcleo, donde interactúa con factores de transcripción de células T (TCF) y con el factor potenciador linfocitario (LEF) para activar la transcripción de genes blanco (Tomada de Inestrosa et al., 2013).

## SHH

Los meduloblastomas SHH están asociados a mutaciones somáticas en los genes de la vía Sonic hedgehog, como el gen Patched 1 (PTCH1: receptor para sonic hedgehog, funciona además como supresor tumoral) o el gen SUFU (supresor del homólogo fusionado: codifica un regulador negativo de la señalización hedgehog) (Li et al., 2013).

La vía clásica SHH contiene diferentes componentes, incluyendo las glicoproteínas Shh (Fig. 3). En ausencia de ligando Shh, el supresor SUFU regula

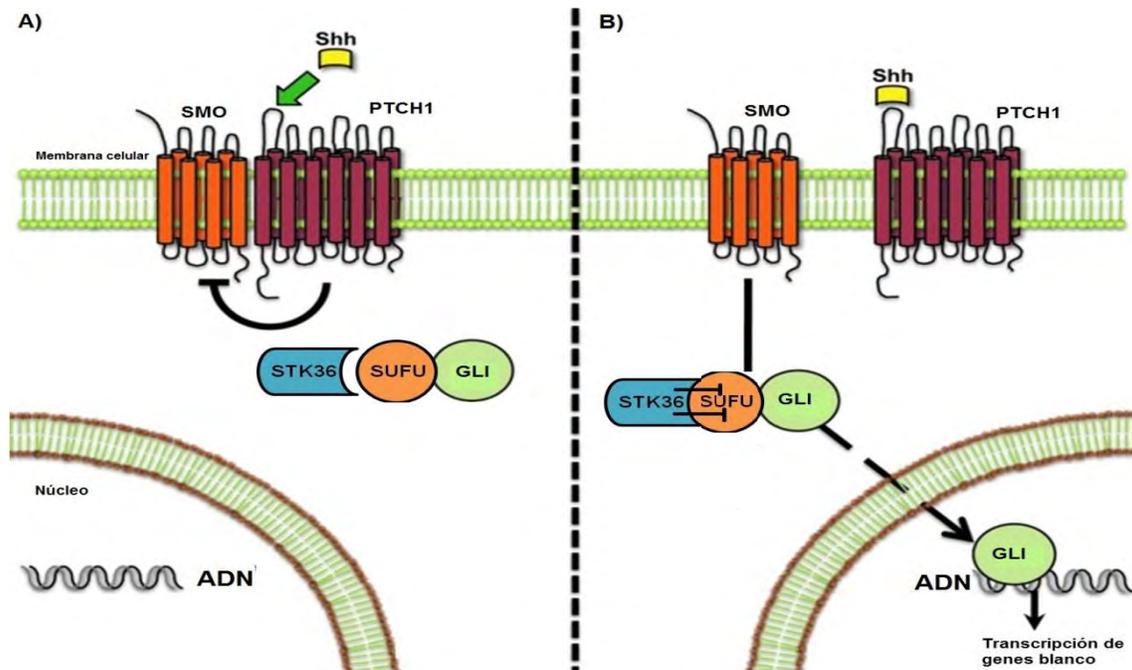
negativamente la vía por unión directa a los factores de transcripción asociados a glioma GLI, que son los efectores terminales de la vía de señalización, evitando su translocación al núcleo y favoreciendo su degradación. Las glicoproteínas Shh secretadas se unen e inhiben a la proteína de 12 dominios transmembranales Patched1, que normalmente inhibe a la proteína de 7 dominios transmembranales Smoothed (SMO), posteriormente, SMO activa a la serina/treonina cinasa 36, STK36, resultando en la fosforilación de SUFU y la estabilización de la familia de factores GLI (Dedos de zinc de la familia GLI; codifica para factores de transcripción perteneciente a la subclase de proteínas tipo C2H2 con dominios de zinc). Los factores de transcripción GLI estabilizados se translocan al núcleo y activan la transcripción de genes involucrados en la vía SHH (tales como GLI1 y PTCH1), en la proliferación celular (por ejemplo CDK1: cinasa 1 dependiente de ciclina, esencial para las transiciones de fase G1/S y G2/M del ciclo celular eucariótico), la angiogénesis (ANG 1/2: angiogenina 1 y 2), la transición epitelio-mesénquima (por ejemplo SNAIL: represor transcripcional 1 de la familia SNAIL) y la autorenovación de células madre (SOX2: región Y-box 2 determinante del sexo) (Rimkus et al., 2016).

Otros genes mutados frecuentemente son SMO, TP53, N-MYC (gen perteneciente a la familia de protooncogenes MYC, la proteína es capaz de unirse al ADN), LDB1 (dominio de unión a LIM 1: codifica a la proteína 1 de unión a dominio LIM) y GLI2 (Gopalakrishnan et al., 2015; Li et al., 2013). A nivel cromosomal, la pérdida del cromosoma 9q es la más frecuente, aunque también se presentan aberraciones en los cromosomas 3q, 9p y pérdida de los cromosomas 10q, 20p y 21p (Li et al., 2013).

En el subtipo SHH se encuentran casi exclusivamente los subgrupos desmoplásicos y nodulares, la metástasis es poco común y representa aproximadamente el 30% de los casos de meduloblastoma (Remke et al., 2011). Se presenta principalmente en adultos (60%) y en niños menores de 3 años; la tasa de supervivencia para estos pacientes a los 5 años es aproximadamente 70%

(Brandes et al., 2014). Este tipo de tumores presentan una mayor metástasis que los tumores Wnt, pero menor que los grupos 3 y 4. El síndrome de Gorlin, caracterizado por mutaciones germinales en PTCH1 y SUFU, ha sido asociado con el riesgo de padecer meduloblastomas, aunque en un bajo porcentaje (De Braganca y Millard, 2015).

En los subtipos WNT y SHH la incidencia en hombres y mujeres es 1:1.



**Fig. 3.** Representación esquemática de la vía canónica SHH. **A)** En ausencia de ligando (Shh), el supresor del homólogo fusionado (SUFU) regula negativamente la vía por unión directa a los factores de transcripción asociados a glioma GLI, evitando su translocación al núcleo y favoreciendo su degradación. **B)** La unión del ligando Shh al receptor PTCH1 inhibe a la proteína de 12 dominios transmembranales Patched1 (PTCH1), que normalmente inhibe a la proteína de 7 dominios transmembranales Smoothed (SMO). SMO activa a la serina/treonina cinasa STK36, resultando en la fosforilación de SUFU y la estabilización de la familia de factores GLI. Los factores de transcripción GLI estabilizados se translocan al núcleo y activan la transcripción de genes blanco (Modificada de Bohinc et al., 2013).

### Grupos 3 y 4

Los grupos 3 y 4 también han sido denominados No WNT/SHH, ya que las mutaciones genéticas en estos grupos aún no están bien caracterizadas. Se ha

observado que los grupos 3 y 4 presentan una mayor incidencia en hombres que en mujeres (De Braganca y Millard, 2015).

Las alteraciones más comunes encontradas en el grupo 3 son: expresión elevada de C-MYC y OTX2 (homeodominio ortodentico 2: miembro de la subfamilia de factores de transcripción que contienen un homeodominio) y fusión PVT1-MYC (oncogen PVT1: involucrado en la regulación de los niveles de MYC). A nivel cromosomal es frecuente la ganancia en los cromosomas 1q, 7 y 17q y deleciones de los cromosomas 10q, 11, 16q y 17p, indicando un alto nivel de inestabilidad genómica (Gopalakrishnan et al., 2015). El subtipo histológico más frecuentemente encontrado en este grupo es el clásico, aunque también se encuentran casos de meduloblastomas de células grandes y anaplásicos. El pico de incidencia de este grupo se encuentra en la infancia y niñez representando el 25 % de los casos; estos pacientes tienen el peor pronóstico, con tasas de supervivencia a los 5 años entre 40 y 50%. El grupo 3 presenta alta tendencia a la metástasis (45%) (Northcott et al., 2012).

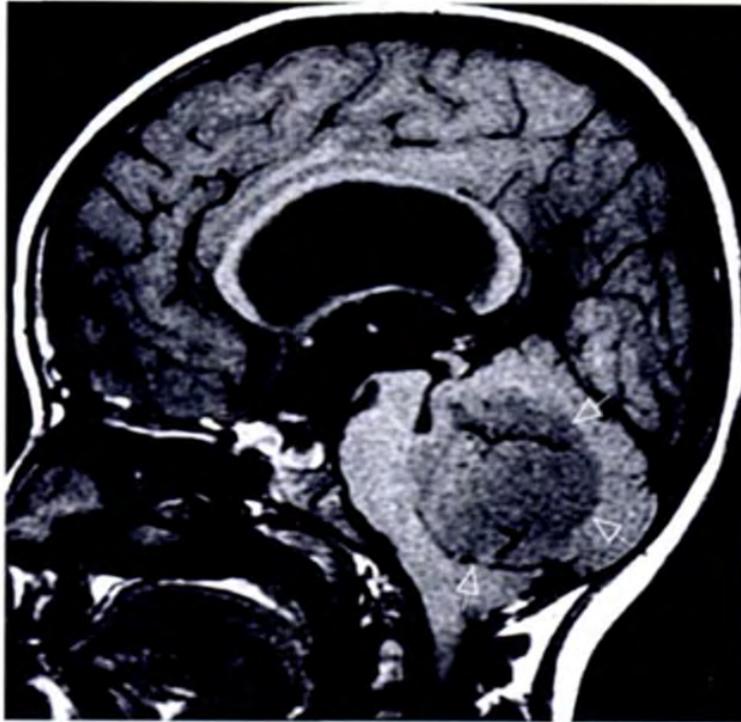
En el grupo 4 las alteraciones más frecuentes incluyen expresión elevada de OTX2, N-MYC, FST (folistatina: proteína gonadal que inhibe específicamente la liberación de hormonas en el folículo estimulante) y CDK6 (ciclina dependiente de cinasa 6) (Kool et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015). Además, se observan de manera frecuente isocromosomas 17q y deleciones de los cromosomas 17p (Gopalakrishnan et al., 2015). Este grupo representa aproximadamente el 35% de los pacientes con meduloblastoma, se presenta tanto en niños (35%) como en adultos (25%), con tasas de supervivencia a los 5 años del 75% (Northcott et al., 2012). Casi todos los casos tienen histología clásica o de células grandes y la metástasis se presenta en 30-40% de los casos (Gerber et al., 2013).

### 3.1.4 Diagnóstico y tratamiento

La mayoría de los signos y síntomas presentes en los pacientes con meduloblastoma se deben al bloqueo del flujo del LCR y resultan de la acumulación del mismo en el cerebro, lo que provoca hidrocefalia. Los niños con meduloblastoma usualmente son diagnosticados 2 a 3 meses después de que inician los síntomas; comúnmente se presenta dolor de cabeza, náuseas, vómito, letargo, ataxia, algún grado de nistagmo y/o papiledema. En niños más pequeños se puede presentar letargo no específico, retraso psicomotor y dificultades para alimentarse (Smoll y Drummond ,2012; De Braganca y Millard, 2015; Brandes et al., 2014; Gerber et al., 2013; NCI, 2016). El 20 % de los pacientes con meduloblastoma no presenta hidrocefalia al tiempo de diagnóstico y son más propensos a presentar inicialmente déficits cerebelares debido a la localización del tumor (NCI, 2016).

Al realizar una imagen por resonancia magnética (IRM) se observa un tumor cerebelar, usualmente con compresión del cuarto ventrículo y dilatación del ventrículo lateral y del tercer ventrículo debido a la obstrucción del flujo del LCR (Fig. 4). Para la detección de metástasis se realiza una IRM espinal y se evalúa la citología del LCR (Smoll y Drummond, 2012; De Braganca y Millard, 2015; Gerber et al., 2013).

La terapia para los pacientes con meduloblastoma incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia adyuvante. Se recomienda que todos los pacientes con meduloblastoma se sometan a una resección quirúrgica de máxima seguridad con el objetivo de remover total o casi totalmente la masa tumoral.



**Fig. 4.** Medulloblastoma típico con metástasis subaracnoidea. Imagen obtenida por Resonancia Magnética, sección sagital 560/16 que muestra hidrocefalia y una masa hipointensa (flechas blancas) obstruyendo el cuarto ventrículo (Tomada de Barkovich, 2005).

Todos los pacientes son tratados con quimioterapia postoperatoria, que incluye cisplatino, lomustina, vincristina, ciclofosfamida, entre otros (Brandes et al., 2014; Gerber et al., 2013; NCI, 2016). El cisplatino es un agente citotóxico alquilante bifuncional, por lo que se une al ADN o ARN formando enlaces intra e intercatenarios, inhibiendo enzimas importantes en la replicación y transcripción de ADN. La lomustina inhibe la síntesis de ADN y ARN a través de la carbamitación de proteínas clave de diversos procesos enzimáticos. Por su parte, la vincristina impide la formación de microtúbulos por unión a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, alterando la mitosis en la metafase. La ciclofosfamida es un profarmaco que, tras su activación, da lugar a agentes alquilantes del ADN (Rodríguez, 2005).

Con base en el volumen de tumor residual postoperatorio y la presencia o ausencia de diseminación, los pacientes con 3 años de edad o más son

clasificados en alto riesgo o riesgo promedio. Los niños con riesgo promedio presentan  $<1\text{cm}^2$  de masa tumoral después de la resección quirúrgica y no presentan diseminación. Los niños de alto riesgo se presentan con  $\geq 1.5\text{cm}^2$  de tumor residual postoperatorio y/o diseminación (De Braganca y Millard, 2015). En estos pacientes el tratamiento generalmente involucra radioterapia. La radioterapia incluye irradiación craneoespinal con un refuerzo a la fosa posterior para los niños con riesgo promedio y para los niños con alto riesgo refuerzo en los sitios de diseminación debido a la alta incidencia de recurrencia cuando solo se practica la cirugía (De Braganca y Millard, 2015; NCI, 2016).

Un tercer grupo de pacientes, que incluye niños menores a 3 años de edad, es tratado sin radioterapia inicial debido al alto riesgo de deterioro neurocognitivo severo (Rutkowsky et al., 2005).

En cuanto a los factores asociados al desarrollo de los meduloblastomas, se han encontrado diversos, entre los que se encuentra el RE $\beta$ .

## **3.2. Receptores a estrógenos (RE)**

### *3.2.1 Función e isoformas de los RE*

Los RE tienen roles importantes en el desarrollo y funcionamiento normal de tejidos reproductivos así como de tejidos no reproductivos, incluyendo los pulmones, colon, próstata, cerebro y sistema cardiovascular (Xu y Shanle, 2010). Estos receptores se encuentran en el núcleo, membrana citoplasmática, así como en el citosol y la mitocondria tanto en células neuronales como en las no neuronales (Mukherjee et al., 2010).

Hasta el momento, se conocen dos tipos de RE: el RE $\alpha$  y el RE $\beta$  (Fig. 5). El RE $\alpha$  fue el primer RE clonado y fue aislado de células MCF-7 de cáncer de mama a

finales de 1980 (Walter et al., 1985; Greene et al., 1986). Consiste en 595 aminoácidos con una masa molecular de 66 kDa y es codificado por el gen ESR1 localizado en el cromosoma 6q25.1 (Bothelo et al., 2015).

Por su parte, el RE $\beta$  fue clonado 10 años más tarde en células de próstata de rata (Kuiper et al., 1996). El RE $\beta$  humano considerado silvestre consta de 530 aminoácidos con un peso molecular de 55kDa y es codificado por el gen ESR2 localizado en el cromosoma 14q23.2 (Bothelo et al., 2015).

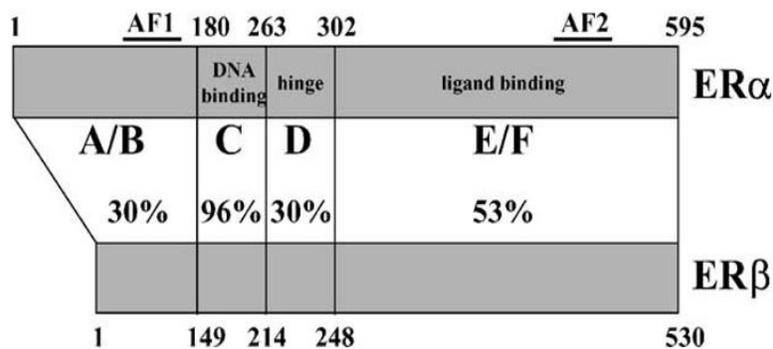
El RE $\alpha$  y el RE $\beta$  muestran distribuciones superpuestas y diferentes en tejidos sugiriendo que los receptores tienen distintos roles biológicos. Ambos receptores se expresan en varios órganos, como el ovario, el útero, la glándula mamaria, los testículos, la próstata, la vejiga, los pulmones, el corazón y el cerebro. El RE $\alpha$  se expresa de manera dominante en el útero, hepatocitos e hipocampo, mientras que el RE $\beta$  muestra patrones de expresión dominantes en la próstata, la vejiga y el cerebelo (Xu et al., 2010; Craig y Timm, 2004; Kuiper et al., 1997).

Debido a que los RE regulan de manera importante diferentes procesos celulares, tales como la proliferación y diferenciación, su señalización se encuentra asociada con procesos patológicos como el cáncer.

### *3.2.2 Estructura de los RE*

Los RE son miembros de la superfamilia de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción. Esta familia de receptores incluye, entre otros, al receptor a hormonas tiroideas, el receptor a vitamina D, el receptor de ácido retinoico y otros receptores de esteroides como el receptor a glucocorticoides, el receptor a andrógenos, el receptor a progesterona y el receptor a mineralocorticoides (Mukherjee et al., 2010).

Los RE  $\alpha$  y  $\beta$  presentan dominios estructurales comunes. En el extremo N-terminal de los RE se encuentra el dominio A/B, que contiene la función de activación 1 (AF1), una función de activación constitutiva que contribuye a la actividad transcripcional de los RE. Este es uno de los dominios menos conservados entre el RE $\alpha$  y el RE $\beta$ , exhibiendo solo un 30% de identidad (Fig. 5) (Craig y Timm, 2004). Basado en estudios de funcionalidad, se ha observado que el RE $\beta$  no posee actividad en el dominio AF1 (Hall y McDonnell, 1999). El dominio de unión al ADN (DBD) localizado en la región C, es el más conservado entre el RE $\alpha$  y el RE $\beta$  (96% de identidad); está constituido por dos motivos de zinc y permite a ambos receptores unirse a sitios similares (Matosiuk et al., 2013). El dominio D o región bisagra contiene una señal de localización nuclear. Finalmente, la región E/F abarca el dominio de unión a ligando (LBD), un dominio de unión a un corregulador de superficie (proteína de interacción con receptores nucleares 1 NRIP1) (Koide et al., 2006), el dominio de dimerización, una segunda señal de localización y una función de activación 2 (AF2). En contraste con AF1, AF2 es una función de activación dependiente de ligando que se encarga de reclutar proteínas coactivadoras (Fig. 1) (Xu y Shanle, 2010).



**Fig. 5.** Estructura y homología entre el RE $\alpha$  humano y la forma larga del RE $\beta$ . El receptor consta de 6 dominios nombrados de la A a la F. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan el inicio y término de cada dominio. Los % indican la identidad entre las 2 isoformas (Tomada de Craig y Timm, 2004).

### 3.2.3 Mecanismos de acción de los RE

#### 3.2.3.1 Mecanismos ligando dependientes

##### 3.2.3.1.1 Mecanismo clásico o genómico

Cuando un agonista se une al LBD de los RE, estos sufren un cambio conformacional que los activa, presumiblemente por disociación de las proteínas de choque térmico (Hsp 70/90) que mantienen inactivos a los RE (Fig. 6) (Mukherjee et al., 2010).

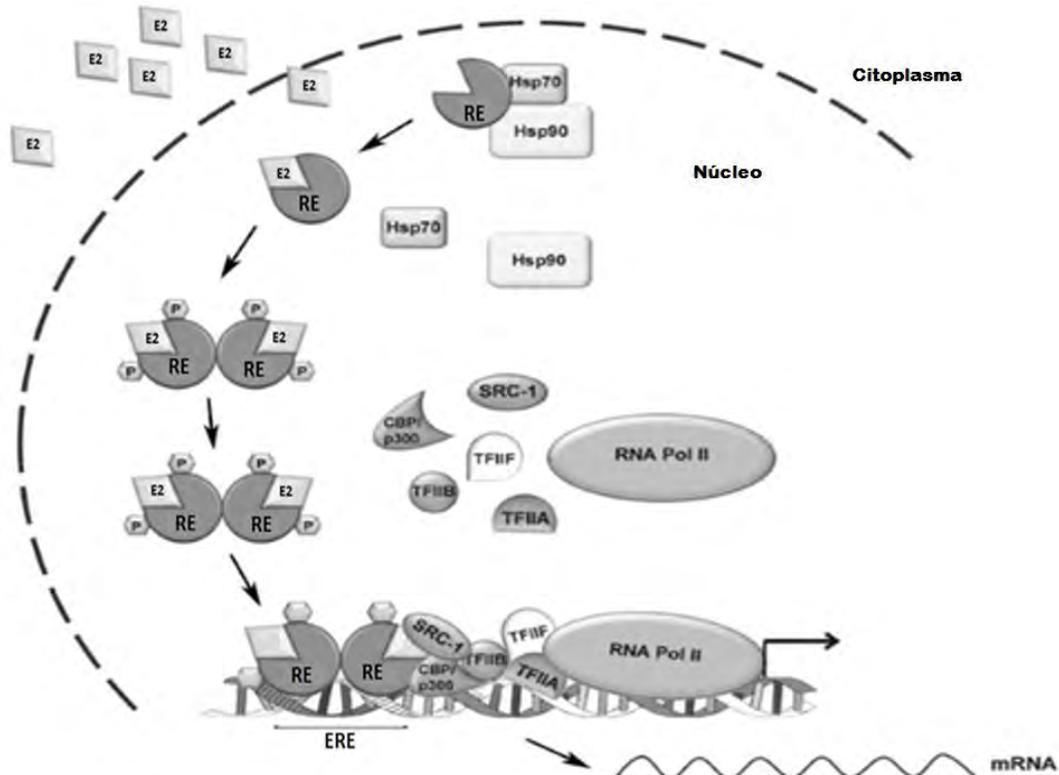
La unión del ligando a los RE permite también la exposición de las secuencias de localización nuclear, lo que permite que el complejo RE-ligando se transloque al núcleo después de su dimerización y fosforilación (Mukherjee et al., 2010; Klinge, 2000; Ogawa et al., 1998).

Una vez en el núcleo, el complejo RE-ligando se puede unir a secuencias específicas de ADN en los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) del promotor de los genes blanco (Fig. 6) (Mukherjee et al., 2010). La secuencia consenso de los ERE es un repetido palindrómico invertido (IR) de 13 pares de bases: GGTCAnnnTGACC (Xu y Shanle, 2010).

El complejo RE-ligando puede interactuar con diferentes clases de reguladores transcripcionales, tales como factores de transcripción, coactivadores (CRC-1, SRC-2, SRC-3), correpresores (NCoR, SMRT), cointegradores (CBP), histona acetiltransferasas e histonas deacetilasas (Fig. 6) (Craig y Timm, 2004; Matosiuk et al., 2013; Klinge, 2000; McKenna et al., 1999).

Como resultado de la unión a ADN, el complejo RE-ligando facilita el ensamblaje y estabilización de la maquinaria transcripcional de la ARN polimerasa II en los

promotores de los genes blanco y, subsecuentemente, puede activar o inhibir la transcripción de estos genes (Fig. 6) (Hansberg-Pastor et al., 2014).



**Figura 6.** Mecanismo clásico o genómico de los RE. La unión de estradiol (E2) a los RE permite la disociación de las proteínas de choque térmico (Hsp70/90) de los mismos, así como su dimerización y fosforilación (P). Los RE activos se unen a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en el promotor de los genes blanco y facilitan el ensamblaje de coactivadores (SCR-1 y CBP/p300) la maquinaria transcripcional (ARN pol II, TFIIA/B/F), regulando de esta forma la transcripción de los genes blanco (Modificada de Hansberg-Pastor et al., 2014).

### 3.2.3.1.2 Interacción con factores de transcripción

Los RE pueden activar la transcripción de genes, cuyos promotores no albergan ERE, a través de la interrelación con factores de transcripción que median la interacción no directa de los RE con el ADN (Shupnik, 2004).

La proteína estimuladora 1 (Sp1) media de manera predominante esta regulación indirecta al unirse a la región reguladora de ADN sensible a estrógenos; la interacción de los RE con Sp1 incrementa la unión de esta última al ADN y además, contribuye al reclutamiento de coactivadores (Ascenzi et al., 2006; Kushner et al., 2000).

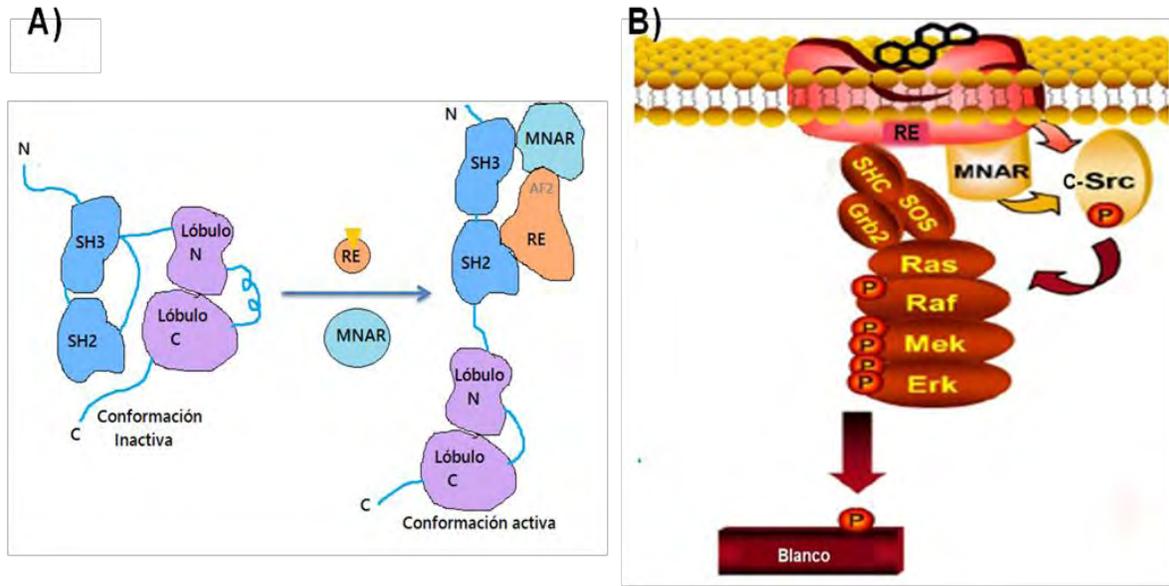
Otro factor intermediario a través del cual los RE pueden regular la transcripción de genes es AP-1. Los RE  $\alpha$  y  $\beta$  pueden interactuar con el complejo Jun/Fos en los sitios AP-1 para regular la transcripción de genes (Paech et al., 1997; Kushner et al., 2000).

La regulación transcripcional a través de esta vía puede requerir regiones diferentes de los RE para establecer contactos proteína-proteína, pero en general lleva al mismo resultado que la unión directa de los RE al ADN (Shupnik et al., 2004).

### *3.2.3.1.3 Mecanismos rápidos a través de la activación de MAPK*

Además de los efectos transcripcionales de los agonistas de los RE, especialmente E2, existen efectos rápidos que ocurren en segundos o minutos después de la adición de este ligando, como la activación de diversas cinasas y fosfatasas y un incremento en el flujo de iones a través de la membrana que sugieren la interacción del E2 con receptores de superficie celular (Migliaccio et al., 1999).

Se han propuesto diversos mecanismos a través de los cuales el E2 interactúa con los RE para activar de manera rápida la vía de señalización de MAPK, cuya activación desencadena efectos genómicos y no genómicos. Migliaccio y colaboradores propusieron inicialmente un mecanismo en donde el complejo RE-E2 activaba a la vía tirosina cinasa/p21<sup>ras</sup>/MAPK a través de la activación directa del receptor a tirosina cinasa con la enzima c-Src (Migliaccio et al., 1999). Posteriormente, Barletta y Wong demostraron que la interacción coordinada entre el dominio SH3 y SH2 de la tirosina cinasa c-Src y los RE, estabilizada por la interacción RE-MNAR (Modulador no genómico de la actividad de RE) conlleva a la activación de c-Src (Fig. 7A). A su vez, la activación de c-Src conlleva a la activación de la vía MAPK, que pueden activar al RE $\alpha$  a través de la fosforilación, resultando en la estimulación de su actividad inducida por ligando (Fig. 7B) (Barletta et al., 2004).



**Fig. 7.** Representación esquemática de la activación de c-Src por el receptor a estrógenos (RE) y el adaptador de proteínas MNAR. **A)** El RE, en presencia de estrógenos (amarillo), interactúa con MNAR y c-Src para formar un complejo ternario estable a través de la interacción específica inducida por estrógenos entre el dominio AF-2 del RE y MNAR. La interacción de los RE con el dominio SH2 y SH3 de c-Src provee estabilización adicional y facilita una conformación activa de c-Src (Modificada de Edwards y Boonyaratanakornkit, 2003). **B)** Cascada de señalización que involucra la interacción del RE con el adaptador de proteínas MNAR para estimular a la cinasa c-Src, que a su vez activa a Ras y activa la vía ERK/MAPK (Modificada de Belcher, 2008).

#### 3.2.3.1.4 Mecanismos rápidos a través de la activación de PI3K/Akt

Se ha demostrado que el RE $\alpha$  y p58, la subunidad reguladora de la fosoinositol 3-cinasa (PI3K), interactúan en células MCF-7 en respuesta a E2 (Castoria et al., 2001). Por medio de análisis de inmunoprecipitación, Cheskis y colaboradores demostraron que, en células MCF-7, el adaptador de proteínas MNAR es parte de un complejo inducido por E2 formado por el RE $\alpha$ , c-Src y p58. La sobreexpresión de MNAR incrementa la activación de PI3K; en contraste, la depleción de MNAR con ARNs de silenciamiento específicos resulta en una disminución en la activación de PI3K inducida por E2. En esta línea celular, el uso de un inhibidor de PI3K, LY294002, así como un antagonista de los RE, ICI 182 780, bloqueó la activación de PI3K inducida por E2. Estos resultados indican que la interacción entre MNAR, RE $\alpha$  y p58 conducen a la activación de PI3K (Cheskis et al., 2008). La asociación p58-PI3K dependiente de E2 también ha sido demostrada en la

línea celular U-373 MG derivada de un astrocitoma humano. En esta línea celular el E2 provoca un aumento en la fosforilación de Akt (proteína cinasa específica de serina y treonina; es uno de los principales sustratos de PI3K *in vivo*) (González-Arenas et al., 2006).

### 3.2.3.2 Mecanismo ligando independiente: fosforilación de los RE

La fosforilación de los RE, usualmente en residuos de serina, puede modular su actividad transcripcional. Las consecuencias funcionales de la fosforilación de diferentes residuos no han sido definidas, sin embargo, algunos están bien caracterizados.

Hasta el momento, se conocen seis sitios de fosforilación del RE $\alpha$  en humanos: Ser104, Ser106, Ser118, Ser167, Ser236 y Tyr537 (Fig. 8) (Craig y Timm, 2004).

La fosforilación de las serinas 104 y 106 se lleva a cabo por el complejo ciclina A-CDK2 en células de osteosarcoma humano U-2 OS (Rogatsky et al., 1999).

Utilizando un sistema de transfección transitoria en células COS-1, Ali y colaboradores demostraron que el tratamiento con E2 y 4-hidroxitamoxifen (modulador selectivo de los receptores a estrógenos) induce la fosforilación del RE $\alpha$  en el residuo Ser118 (Ali et al., 1993). Además, existe evidencia que indica que el residuo Ser118 es el principal sitio de fosforilación por E2 y ésteres de forbol en células COS-1, y que este residuo es requerido para la activación MAPK a través del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Joel et al., 1995). Sin embargo, existen controversias sobre la cinasa que fosforila al residuo Ser118 y la posibilidad de que múltiples cinasas lleven a cabo esta fosforilación. Chen y colaboradores sugirieron que MAPK fosforila al residuo Ser118 de manera independiente de ligando, mientras que CDK7 lo fosforila en respuesta a E2 en células COS-1 (Chen et al., 2002). Otros reportes sugieren que MAPK no fosforila

al residuo Ser118 en células MCF-7 en respuesta a E2, pero el tratamiento con EGF y TPA resulta en la fosforilación del residuo vía MAPK (Joel et al., 1995).

El residuo Ser167 es el principal sitio de fosforilación en respuesta a E2 en el RE $\alpha$  recombinante expresado en células Sf9 y en células MCF-7. Este residuo es fosforilado por la caseína cinasa II (CK2) (Arnold et al., 1994). En células COS-1 y MCF-7 tratadas con EGF o TPA, el residuo Ser167 es fosforilado por pp90<sup>rsk</sup>, que es fosforilado por MAPK (Joel et al., 1999). Por otro lado, en células HEK293 y MCF-7, el RE está constitutivamente asociado con p58 (subunidad de PI3K/Akt en células endoteliales), lo que conlleva a la fosforilación del residuo Ser167 por Akt (Sun et al., 2001).

El residuo Ser236 del RE $\alpha$ , que se localiza en el dominio de unión a ADN y es fosforilado en células COS-1 por la proteína cinasa A (PKA) (Chen et al., 1999). Esta fosforilación regula la dimerización del receptor (Vasudevan y Pfaff, 2008).

La fosforilación en el residuo Tyr537 del RE $\beta$  en células MCF-7 es mediada por p60<sup>c-Src</sup> y p56<sup>lck</sup> (Arnold et al., 1995). El residuo Tyr537 no se fosforila por el tratamiento con E2, indicando que se trata de un sitio de fosforilación basal (Craig y Timm, 2004).

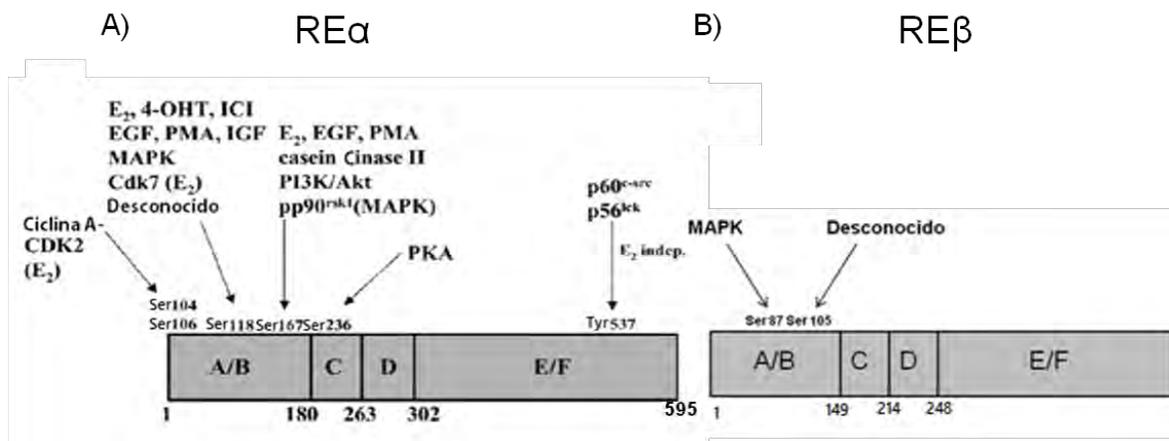
Hasta ahora se han descrito dos sitios de fosforilación en el RE $\beta$  en el humano: Ser87 y Ser105. Se sabe que Ser87 es fosforilado por MAPK, sin embargo, aún no se ha establecido la cinasa que fosforila el segundo residuo. Además, se sabe que la fosforilación de los sitios específicos Ser 106 y 124 del receptor murino conlleva al reclutamiento de coactivadores transcripcionales, que incrementa la actividad del receptor (Sánchez et al., 2010).

A través de los softwares KinasePhos 0.1 (Huang et al., 2005), NetPhos 2.0 (Bloom et al., 1999) y GPS 2.1 (Xu et al., 2011) hemos identificado al residuo Ser219 del RE $\beta$  como posible sitio de fosforilación por PKC $\alpha$ .

Esta modificación postraduccional podría regular la actividad transcripcional del receptor, y por lo tanto, podría participar en la regulación de la expresión de diversos genes involucrados en procesos celulares como proliferación, diferenciación y migración.

Por otro lado diversos estudios han demostrado que los RE son ubiquitinados y posteriormente degradados por el proteasoma 26S no solo como consecuencia de la unión al ligando, sino también como consecuencia de la fosforilación de los mismos en residuos que se encuentran en la función de activación AF-1 (Picard et al., 2008).

Se ha reportado que en células HEK 293 derivadas de riñón embrionario humano transfectadas con RE $\alpha$ , la fosforilación del residuo Ser118 inducida por EGF provoca un cambio conformacional en el RE, lo cual modula su ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S. En cuanto al RE $\beta$ , se ha visto que la fosforilación por MAPK en los residuos Ser106 y Ser124 conducen al mismo mecanismo en la línea celular HEK 293 transfectada con RE $\beta$  (Picard et al., 2008).



**Fig. 8.** Cinasas y ligandos que inducen fosforilación en los RE humanos en sitios específicos. **A)** La fosforilación del RE $\alpha$  ocurre en los sitios Ser104/Ser106, Ser118 y Ser167 por una variedad de ligandos y cinasas que se indican en la figura. El residuo Ser236 es fosforilado por PKA y el residuo Tyr537 es fosforilado por la familia de cinasas Src (Modificado de Craig y Timm, 2003). **B)** El RE $\beta$  se fosforila en los residuos Ser87 y Ser105. Se sabe que Ser87 es fosforilado por MAPK, sin embargo, aun no se ha establecido la cinasas que fosforila al residuo Ser105. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan el inicio y término de cada dominio.

### 3.2.4 Papel de los receptores a estrógenos en cáncer

Debido a que los RE regulan de manera importante diferentes procesos celulares, tales como la proliferación y diferenciación en tejidos normales, es claro que la señalización de estos receptores es importante en procesos cancerígenos (Craig y Timm, 2003; Xu & Shanle, 2010).

En cáncer de mama, se ha encontrado en el 70% de los casos que la expresión del RE $\alpha$  y su presencia está asociada al desarrollo, progresión e invasividad del tumor (Skloris et al., 2010), por lo que ha sido un efectivo blanco terapéutico. En cuanto al RE $\beta$ , se ha observado que se expresa en aproximadamente el 50% de los casos y su expresión se va perdiendo con la progresión del cáncer; existen evidencias que sugieren que el RE $\beta$  regula negativamente la proliferación mediada por el RE $\alpha$  y promueve la diferenciación celular. Aunque en la mayoría de los estudios se reporta que la presencia del RE $\beta$  es un indicador de buen pronóstico, aún existe controversia debido a que en algunos estudios se reporta lo contrario (Craig y Timm, 2003).

El RE $\beta$  se expresa en altos niveles en la próstata, y se ha visto que se expresa tanto en tejido normal como en cáncer. Aunque el papel del RE $\beta$  en cáncer de próstata aún no es claro, diversos estudios reportan que posee un rol antiproliferativo (Craig y Timm, 2003). En un estudio realizado por Cheng se demostró que la sobreexpresión del RE $\beta$  en líneas celulares de cáncer de próstata desencadenaba en una menor proliferación e invasividad (Cheng et al., 2004). Adicionalmente, los ligandos selectivos de RE $\beta$  han demostrado tener efectos antiproliferativos en el epitelio de la próstata. Por el contrario, se ha observado que el RE $\alpha$  puede promover la carcinogénesis en presencia de estrógenos (Xu y Shanle, 2010).

En cáncer de colon, algunos estudios han revelado que existe una baja expresión del RE $\alpha$  en líneas celulares humanas, por lo que se piensa que el RE $\beta$  es el

principal RE expresado en estos tumores (Craig y Timm, 2003). En experimentos *in vitro* se ha demostrado que el raloxifeno (modulador selectivo de los RE) puede inhibir la proliferación en células que expresan RE $\beta$ , sin embargo, en células que no lo expresan no se observan cambios (Picariello et al., 2003). Adicionalmente, se ha visto que la expresión del RE $\beta$  se va perdiendo con la progresión del tumor (Xu y Shanle, 2010).

En lo que respecta al cáncer de ovario, dos tercios de los tumores expresan RE; el RE $\alpha$  se expresa de manera predominante en tumores de origen epitelial, mientras que el RE $\beta$  se expresa en mayor medida en tumores que se originan de células granulosas (Deroo y Korach, 2006). En la mayoría de los estudios se propone que el RE $\alpha$  contribuye a la proliferación y el RE $\beta$  parece tener un rol protector, sin embargo se requieren más estudios para determinar la contribución de estos receptores en el desarrollo y crecimiento del cáncer de ovario. (Craig y Timm, 2003; Xu y Shanle, 2010).

En células derivadas de astrocitomas, algunos estudios revelan que tanto el RE $\alpha$  como el RE $\beta$  se expresan en biopsias de bajo grado de malignidad y su expresión se pierde conforme aumenta el grado de evolución (Carroll et al., 1995). Sin embargo, los efectos de los estrógenos mediados por sus receptores son controversiales, ya que estudios *in vivo* muestran efectos neuroprotectores de los estrógenos (Barone et al., 2009) y estudios en líneas celulares demuestran que el E2 promueve la proliferación celular, mientras que el antagonista de RE, ICI 182,780, bloquea el efecto de la hormona (González-Arenas et al., 2012). Pese a que existen controversias en cuanto al papel que juegan estos receptores en el desarrollo de los astrocitomas, no se puede descartar su participación en el crecimiento de estos tumores (Hansberg-Pastor et al., 2014).

### 3.2.5 RE en meduloblastoma

El papel de los RE en el desarrollo de los meduloblastomas ha sido muy poco estudiado, sin embargo, se ha reportado que en líneas celulares de meduloblastoma Daoy y D283-Med, existe expresión detectable de RE $\beta$ , mientras que diversos estudios señalan que el RE $\alpha$  no se expresa en estas líneas celulares o se expresa en cantidades muy bajas (Ciucci et al., 2014; Belcher et al., 2009). Así mismo, un estudio realizado por Zannoni y colaboradores demostró que el RE $\beta$  está sobreexpresado en muestras clínicas de meduloblastomas, en pacientes hombres y mujeres con edades de 1 a 54 años de edad, con respecto a las muestras clínicas de humanos sanos, hombres y mujeres, de 39 a 78 años de edad (Zannoni et al., 2016).

En cuanto al papel del RE $\beta$  en la proliferación y crecimiento de los meduloblastomas, existen controversias, ya que dos reconocidos grupos de investigación han propuesto roles opuestos del RE $\beta$  (Belcher et al., 2009; Ciucci et al., 2014).

El grupo de Gallo y colaboradores encontró que los xenoinjertos de células derivadas de meduloblastoma humano (D283-Med) realizados en ratones presentaron diferente contenido de RE $\beta$  en hembras y machos; los tumores en hembras presentaban una expresión significativamente mayor del RE $\beta$  (Ciucci et al., 2014). Este grupo de investigación reportó que la expresión elevada del RE $\beta$  se encontraba directamente relacionada con una menor proliferación celular, mayor apoptosis y mayor diferenciación celular, por lo que propusieron que la señalización del RE $\beta$  podría tener funciones pro-diferenciación y supresoras de tumor (Ciucci et al., 2014). Estas funciones asociadas al RE $\beta$  fueron encontradas también en un modelo *in vivo* generado en ratones mutados para el gen de un receptor de Sonic hedgehog, PTCH1 (Mancuso et al., 2010).

De igual manera, Urbanska y colaboradores reportaron que los meduloblastomas humanos desmoplásicos presentan niveles más elevados de RE $\beta$  comparados con meduloblastomas pobremente diferenciados (Urbanska et al., 2009), lo que posiciona al RE $\beta$  como un posible marcador de buen pronóstico.

Contrario a esto, Belcher y colaboradores reportaron que en las líneas celulares D283-Med y Daoy, así como en xenoinjertos de células D283-Med realizados en ratones, la estimulación con E2 regula la invasión y el crecimiento celular, mientras que los anti-estrógenos bloquean esta respuesta (Belcher et al., 2009).

En lo referente a muestras clínicas, un estudio realizado por Zannoni y colaboradores mostró que la expresión de las variantes RE $\beta$ 1, RE $\beta$ 2 y RE $\beta$ 5 era similar en hombres y en mujeres, sin embargo, las muestras clínicas de mujeres presentaron una mayor relación apoptosis/proliferación respecto a las muestras de hombres, por lo que sugieren que los mecanismos de control celular operan más eficazmente en mujeres que en hombres (Zannoni et al., 2016).

Es importante mencionar que en muestras clínicas de meduloblastoma el contenido de receptores a andrógenos (RA) es muy baja (Zannoni et al., 2016), mientras que en las líneas celulares D283-Med, DAOY y UW228 de meduloblastoma, el contenido de estos receptores es significativamente menor a la cantidad encontrada del RE $\beta$  (Ciucci et al., 2014). En cuanto al RP, al día de hoy no existen estudios detallados acerca de la expresión de este receptor en los meduloblastomas en ensayos *in vivo* ni *in vitro*.

A pesar de que el RE $\beta$  parece tener un papel relevante en el desarrollo de los meduloblastomas, se requieren más estudios para establecer con claridad de qué manera participa en los procesos tumorales.

### 3.3 Proteína cinasa C (PKC)

#### 3.3.1 Familia de las PKC

Las proteínas cinasas C (PKC) comprenden a una familia multigénica de serina/treonina cinasas relacionadas que han sido involucradas en diferentes vías de transducción de señales y están implicadas en un amplio rango de respuestas de receptores acoplados a proteínas G u otras respuestas celulares dependientes de factores de crecimiento (Steinberg, 2008). Estas proteínas cinasas regulan numerosos procesos celulares incluyendo supervivencia, proliferación, diferenciación, apoptosis y migración (Arora y Scholar, 2005; Do Carmo et al., 2013; Tarafdar y Michie, 2014).

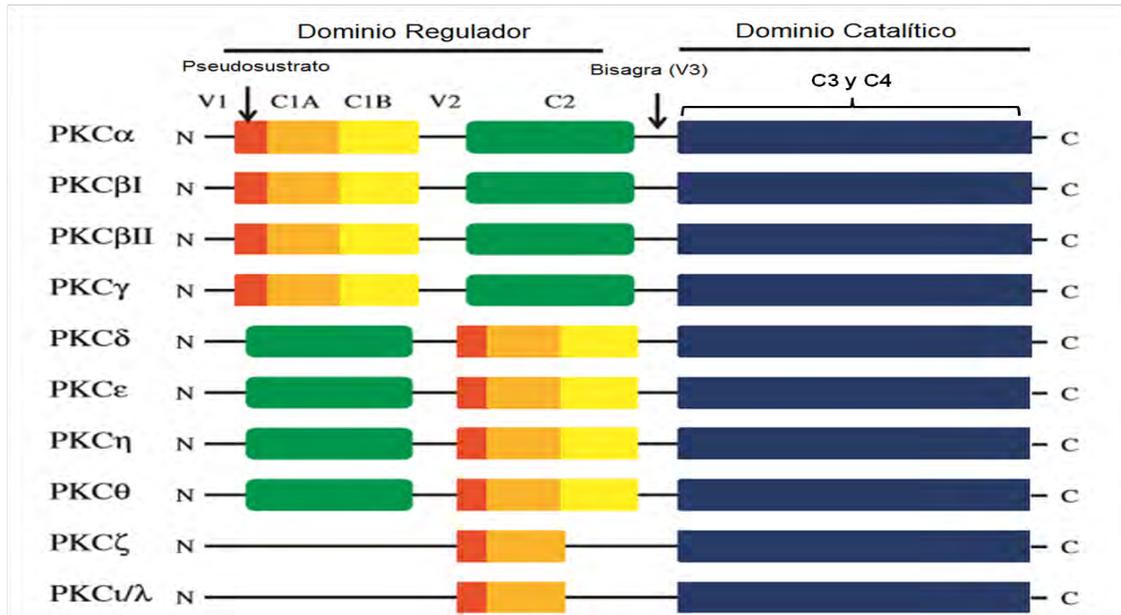
Con base en sus características estructurales y funcionales las PKC han sido clasificadas en tres grupos: las PKC clásicas o convencionales (PKCc) incluyen las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ; las nuevas (PKCn) incluyen las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , y  $\mu$ ; y las PKC atípicas (PKCa) abarcan las isoformas  $\iota/\lambda$  y  $\zeta$  ( $\lambda$  en roedores) (Do Carmo et al., 2013; Tarafdar y Michie 2014).

Las PKCc contienen dominios de unión a DAG (C1A y C1B) y un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (C2) en la región reguladora y requieren DAG y  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación (Tarafdar y Michie, 2014). Las PKCn requieren DAG y fosfatidilserina (PS) para su activación pero contienen una variante en el dominio C2 que incapaz de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que las hace independientes a este. Las isoformas atípicas son  $\text{Ca}^{2+}$  independientes y no requieren DAG para su activación debido a que contienen una variante del dominio C1 capaz de unirse a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) o a ceramidas (Steinberg, 2010).

La estructura de todas las PKC consiste en un dominio regulador y un dominio catalítico separados por una región bisagra (V3). Las regiones funcionales (C1-C4) están separados por regiones variables (V1-V5). La región reguladora de las PKC

contiene un dominio autoinhibidor (pseudosustrato) y dos dominios membrana-blanco (C1 y C2). El dominio C1 se une a DAG, aunque no en el caso de las PKC atípicas. El dominio C2 contiene aminoácidos ácidos que permiten la unión a  $Ca^{2+}$ , pero el dominio C2 de las PKCn no posee estos aminoácidos. El dominio C3 contiene un motivo de unión a ATP y el dominio 4 se une al sustrato; juntos conforman la región catalítica (Fig. 9) (Griner y Kazanietz, 2007; Kang et al., 2012).

Las PKC pueden además ser activadas farmacológicamente utilizando ésteres de forbol como el 12-O-tetradecanoil-13-acetato de forbol (TPA), que posee una estructura análoga al DAG (Weiss et al., 1984).



**Figura 9.** Estructura de las isoformas de PKC. Todas las PKC contienen un dominio regulador y un dominio catalítico (representado en color azul). El dominio regulador contiene un dominio C1 (representado en color anaranjado y amarillo) con un motivo pseudosustrato (representado en color rojo) y un dominio C2 (representado en color verde) en las PKC clásicas (PKCc) y PKC nuevas (PKCn); las PKC atípicas (PKCa) no contienen dominio C2 (Modificada de Kang et al., 2012).

La localización subcelular de las isoformas de las PKC difiere con el estado de activación: cuando se encuentran inactivas se localizan en el citoplasma, y una vez activadas son capaces de translocarse a la membrana plasmática, a organelos citoplasmáticos o al núcleo (Do Carmo et al., 2013). Se sabe que la

translocación de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  a la membrana plasmática, mitocondria, aparato de golgi, núcleo o regiones perinucleares resultan en la regulación de la mitosis, vías de supervivencia celular, apoptosis, adhesión célula-célula y migración (Steinberg, 2010).

PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\lambda$  se expresan ampliamente en diferentes tejidos (Breitkreutz et al., 2007), mientras que otras isoformas tiene una expresión tejido específica. Por ejemplo, PKC $\gamma$  solo se expresan en el SNC (Barnett et al., 2007), PKC $\eta$  se expresa en epitelio o epitelio escamoso (piel y pulmones) (Hara et al., 2011), y PKC $\theta$  se encuentra predominantemente en músculo esquelético (Kang et al., 2012).

El descubrimiento de que los tumores inducidos por ésteres de forbol estaban asociados con la activación de las PKC dio pauta para asociarlas con la tumorigénesis. Actualmente se sabe que las isoformas de las PKC pueden regular vías de señalización involucradas con proliferación celular, supervivencia y migración. Diversos estudios señalan que algunas isoformas pueden actuar como supresoras de tumor debido a que activan vías pro-apoptóticas (Martin y Fabbro, 2007).

En lo que respecta a la PKC $\alpha$ , se ha establecido que contribuye a la progresión tumoral en tumores de próstata, endometrio, gliomas y tumores blandos urinarios de alto grado. En tumores intestinales y pancreáticos se le han asociado efectos antiproliferativos (Hu et al., 2010), mientras que en cáncer de mama se ha encontrado evidencia de que PKC $\alpha$  juega un papel tanto promotor como supresor tumoral (Do Carmo et al., 2013). En astrocitomas se ha visto que PKC $\alpha$  fosforila al receptor a progesterona (RP), evento clave para su activación, lo que conlleva a un aumento en la proliferación celular (González-Arenas et al., 2015).

### 3.3.2 PKC en meduloblastomas

Hasta ahora, se posee muy poca información sobre la expresión e implicaciones de las isoformas de PKC en los meduloblastomas, sin embargo, se sabe que en líneas celulares derivadas de estos tumores la expresión de las isoformas de PKC es muy heterogénea.

Un estudio realizado por Adesina y colaboradores mostró que en tres líneas celulares de meduloblastoma (DAOY, D283-Med y D341-Med) se expresa la isoforma  $\zeta$  de las PKC, y solo en la línea celular DAOY se expresa PKC $\alpha$ . En este estudio se observó que el tratamiento con TPA aumentaba la proliferación de la línea celular DAOY, mientras que la inhibición farmacológica o el silenciamiento de PKC $\alpha$  causaron una disminución en este proceso. En las líneas celulares D283 Med y D341 Med el tratamiento con un ester de forbol (PMA), así como la inhibición farmacológica o el silenciamiento de PKC $\alpha$  no provocaron cambios en la proliferación. Estos resultados sugieren que PKC $\alpha$  podría estar implicada en la proliferación celular y posiblemente en el crecimiento tumoral de los meduloblastomas (Adesina et al., 1998).

#### **4. Planteamiento del problema**

Actualmente se sabe que la señalización del RE $\beta$  juega un papel importante en el desarrollo y crecimiento de meduloblastomas, sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos sobre los mecanismos que hacen posible que el RE $\beta$  tenga un papel crucial en estos tumores. A pesar de que se sabe que el RE $\beta$  tiene residuos que pueden ser fosforilados, no se conocen los mecanismos que desencadenan el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas.

En este trabajo estudiaremos el papel de PKC $\alpha$  sobre la fosforilación y regulación del contenido del RE $\beta$  en células derivadas de meduloblastoma humano con la finalidad de sentar las bases para futuras investigaciones sobre la implicación de esta vía en el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas.

#### **5. Hipótesis**

Si PKC $\alpha$  fosforila al RE $\beta$ , entonces se observará un aumento en la fosforilación del receptor cuando se active a PKC $\alpha$  con un ester de forbol en la línea celular DAOY.

Si PKC $\alpha$  fosforila al RE $\beta$  entonces se observará una disminución en el contenido del receptor en la línea celular DAOY.

#### **6. Objetivos**

1. Estudiar la interacción del RE beta con PKC alfa.
2. Estudiar el efecto de la activación de PKC $\alpha$  sobre la fosforilación de células DAOY derivadas de meduloblastoma.
3. Evaluar el efecto de la activación de PKC $\alpha$  sobre la degradación del RE beta en células DAOY.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Cultivo celular

La línea celular DAOY derivada de un meduloblastoma (ATCC, VA, E.U.A.) se cultivó en placas de 10 cm, con Medio 199 (Biowest, Francia) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Francia) y 1 % de antibiótico. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% aire. 24 horas antes de cada experimento el medio de cultivo se cambió por Medio Mínimo Esencial Eagle (In vitro, S. A. México), sin rojo fenol y sin SFB.

Para la determinación de la fosforilación del RE $\beta$ , así como la asociación PKC $\alpha$ -RE $\beta$ , los cultivos celulares fueron estimulados con TPA 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich) a 5, 10, 15, 30 y 60 minutos; la degradación del RE $\beta$  se determinó estimulando los cultivos celulares a 1, 3, 5, 10 y 20 horas con TPA 1  $\mu$ M. Cada determinación de se realizó 4 veces.

El control positivo para la degradación del receptor consistió en E2-Dextrina (10nM) a un tiempo de 1h, mientras que el tratamiento con vehículo consistió en DMSO al 10%. Este experimento se realizó por triplicado.

### 7.2 Obtención de proteínas

Transcurrido el tiempo de incubación de los diferentes tratamientos, las placas de cultivo fueron lavadas con buffer de fosfatos (PBS) (NaCl 137 mM (Baker), KCl 2.7 mM (Reasol), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM (Sigma-Aldrich), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM (Sigma-Aldrich), pH 7.4) 2 veces. Posteriormente, se colocó 1 mL de buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM (Baker), Tritón 1% (Sigma-Aldrich), SDS 0.1% (Sigma-Aldrich), EDTA 5 mM (Sigma-Aldrich), ortovanadato de sodio 1% (Sigma-Aldrich), fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 574  $\mu$ M (Sigma.Aldrich), inhibidores

de proteasas (SigmaFAST<sup>®</sup>: AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatina 130  $\mu$ M, E-64 14  $\mu$ M, Leupeptina 1  $\mu$ M, Aprotinina 0.3  $\mu$ M (Sigma-Aldrich), pH 7.4) y se mantuvieron en hielo durante 1 hora; finalmente, las células se trataron por raspado de placa y se lisaron al pasar la muestra obtenida 3 veces por una jeringa con aguja 21G x 32 mm y una vez por una jeringa con aguja 27G x 13 mm. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm/ 15 min, se separó el sobrenadante y se cuantificó la proteína obtenida utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000. Se utilizaron 100 microgramos de este sobrenadante para los experimento de Western blot.

Para la determinación del RE $\beta$  fosforilado, el buffer RIPA utilizado para la obtención de proteínas contenía además p-serina 200  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich), p-treonina 200  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich), p-tirosina 200  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich) para disminuir la acción de las fosfatasas sobre el receptor.

### *7.3 Inmunoprecipitación*

En tubos eppendorf se colocaron 50  $\mu$ L de proteína A-agarosa (sc-2001 Santa Cruz Biotechnology), 2  $\mu$ g de anticuerpo anti-RE $\beta$  (sc-53494, Santa Cruz Biotechnology) y 1 mg de proteínas previamente cuantificadas; las mezclas fueron incubadas toda la noche a 4°C en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 8 000 rpm/ 5 min a 4°C; el pellet fue reconstituido en 60  $\mu$ l de buffer Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%). Finalmente, las muestras se desnaturalizaron con calor durante 10 min y se centrifugaron a 15 000 rpm/ 15 min. Se separó el sobrenadante para realizar el Western Blot.

Este procedimiento fue necesario para la determinación de la fosforilación del RE $\beta$  y la visualización de la interacción RE $\beta$ -PKC $\alpha$ .

#### 7.4 Western blot

Los lisados provenientes de la inmunoprecipitación para la visualización de la interacción RE $\beta$ -PKC $\alpha$ , y aquellos obtenidos según el apartado 7.2 *Obtención de proteínas* para la determinación de la degradación del RE $\beta$ , fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia (BioRad) a 60 mA/ membrana durante 2 horas.

Las membranas fueron bloqueadas toda la noche a 4°C con una solución de leche descremada 5% y albúmina 2% (In vitro, S. A. México) en TBS-Tween 0.1% (Tris-Base 50 mM (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM (Baker), pH 7.4 + 0.1% Tween (Sigma-Aldrich)). Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti RE $\beta$  en una concentración de 0.8  $\mu$ g/mL (sc-53494, Santa Cruz Biotechnology) o anti PKC $\alpha$  0.666  $\mu$ g/mL (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology), y se dejaron incubando 24 horas a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween 0.1% durante 5 minutos. Se colocó el anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) durante 45 min a temperatura ambiente en una concentración de 0.04  $\mu$ g/mL. Finalmente, se realizaron 3 lavados con TBS durante 5 minutos.

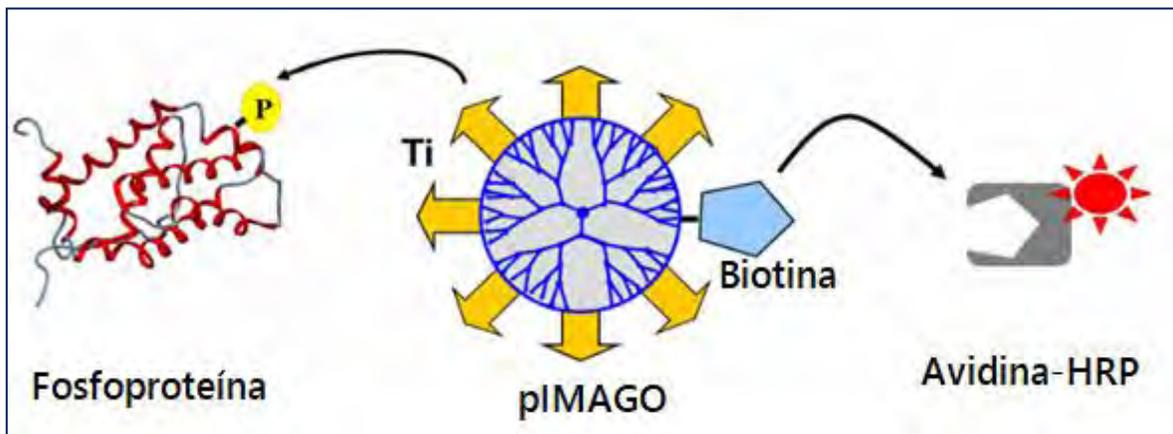
Para la determinación de la degradación del RE $\beta$ , la cantidad de proteína detectada fue normalizada mediante la detección de  $\alpha$ -tubulina. Para lo anterior, las membranas fueron tratadas con glicina ácida (glicina 0.1M (Sigma-Aldrich), 10% SDS (Sigma-Aldrich), pH 2.5) toda la noche a 4°C. Posteriormente las membranas fueron lavadas con TBS 3 veces durante 5 minutos. Se colocó el anticuerpo primario anti  $\alpha$  tubulina en una concentración de 0.4  $\mu$ g/mL (sc-398103, Santa Cruz Biotechnology) y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% durante 5 minutos y se colocó el

anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente en una concentración de 0.04 µg/mL.

En el caso de la determinación de PKCα asociada a REβ, la cantidad de proteína cargada fue normalizada mediante la detección de la cadena ligera de las IgG al inmunoprecipitar REβ.

Para la determinación de la fosforilación del REβ, se utilizó el kit pIMAGO (Tymora Analytical), que permite detectar proteínas fosforiladas. El kit pIMAGO está basado en nanopolímeros globulares solubles en agua asociados a iones de Ti (IV) para el reconocimiento específico de grupos fosfato, y con biotina, que funciona como grupo reportero para facilitar su detección (Tymora Analytical). La biotina es reconocida por el complejo avidina-HRP (Fig. 11).

El control de carga del pREβ consistió en una proteína de 25 kDa detectada mediante la tinción de las membranas con colorante rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich), cuyo contenido no se modificó después del tratamiento con TPA.



**Fig. 10.** Representación esquemática de la detección basada en pIMAGO de fosfoproteínas (Tomada de <http://tymora-analytical.com/products/pimago>).

Las proteínas fueron visualizadas utilizando un kit de detección basada en quimioluminiscencia (ECL kit; Amersham Corp.).

### *7.5 Análisis de datos*

Las placas obtenidas fueron sometidas a un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ para semicuantificar la intensidad de las bandas de las proteínas.

Los datos fueron analizados por ANOVA seguido de un test de comparaciones múltiples Dunnett utilizando el programa GraphPad Prism 5. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos.

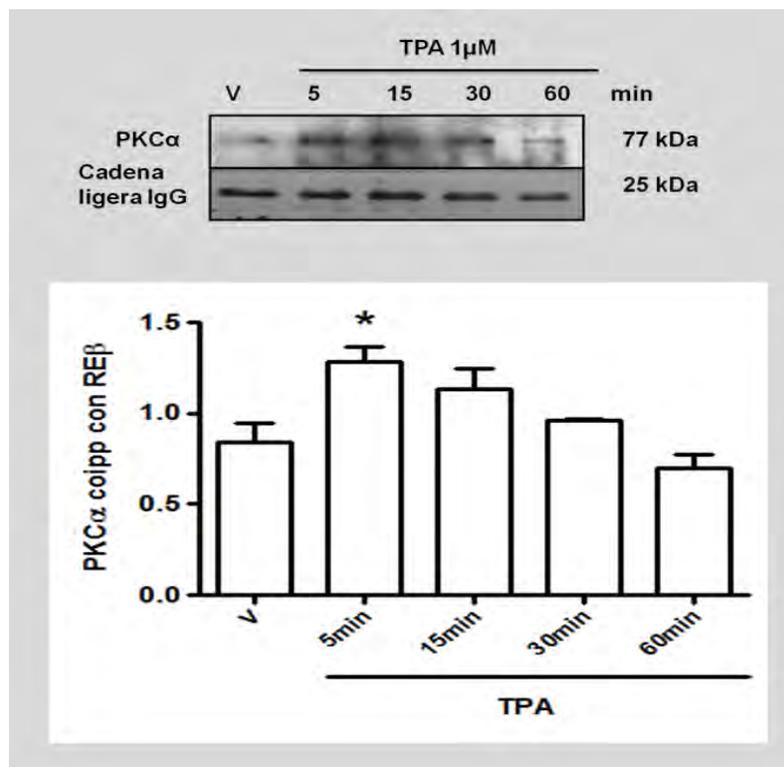
Los datos para la obtención del tratamiento control para la degradación del RE $\beta$  fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney.

## 8. Resultados

### 8.1 Determinación de PKC $\alpha$ asociada al RE $\beta$

Para determinar si existía alguna interacción entre PKC $\alpha$  y el RE $\beta$ , los cultivos celulares de la línea DAOY fueron estimulados con TPA 1 $\mu$ M, compuesto activador de PKC clásicas y nuevas, a diferentes tiempos (5, 15, 30 y 60 min). Se realizó la inmunoprecipitación del RE $\beta$  y, mediante la técnica de Western blot, se identificó el contenido de PKC $\alpha$  asociado al RE $\beta$ .

Como se muestra en la figura 11, se observó un aumento significativo en la asociación de PKC $\alpha$  con el RE $\beta$  a los 5 minutos respecto a la asociación observada en el tratamiento con vehículo (DMSO 10%). De igual forma, se observó que la asociación PKC $\alpha$ -RE $\beta$  volvió a las condiciones basales a 30 y 60 minutos.

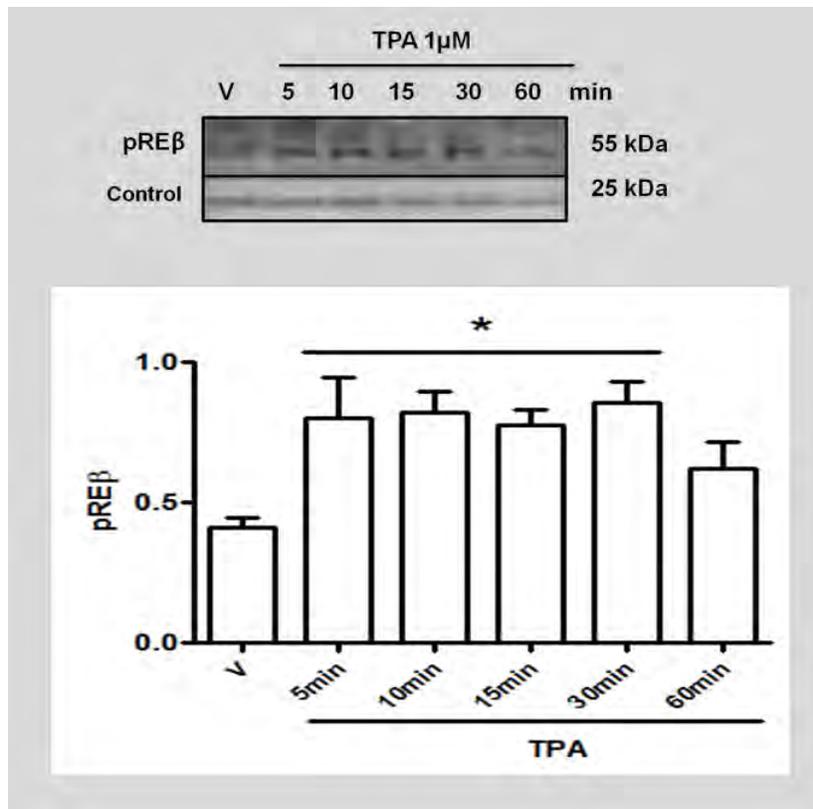


**Fig. 11.** Determinación de PKC $\alpha$  asociada al RE $\beta$ . Se muestra un blot representativo de 4 experimentos independientes. V: DMSO 10%; TPA: éster de forbol 1  $\mu$ M. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de las densitometrías realizadas a las placas. \*P<0.05 v.s. vehículo, n=4.

## 8.2 Fosforilación del RE $\beta$ inducida por la activación de PKC $\alpha$

Con la finalidad de determinar si la asociación de PKC $\alpha$  con el RE $\beta$  conllevaba a la fosforilación del receptor, los cultivos celulares de la línea DAOY fueron estimulados con TPA 1 $\mu$ M a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min), posteriormente se realizó la inmunoprecipitación del RE $\beta$  y, mediante la técnica de Western blot y el uso del kit pIMAGO, se identificó al RE $\beta$  fosforilado (pRE $\beta$ ).

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos. Se observó un aumento significativo en el contenido de pRE $\beta$  a los 5 minutos, mismo que se mantuvo hasta los 30 minutos respecto al contenido observado en el tratamiento con vehículo (DMSO 10%). El incremento en la fosforilación regresó a su nivel basal a los 60 minutos.

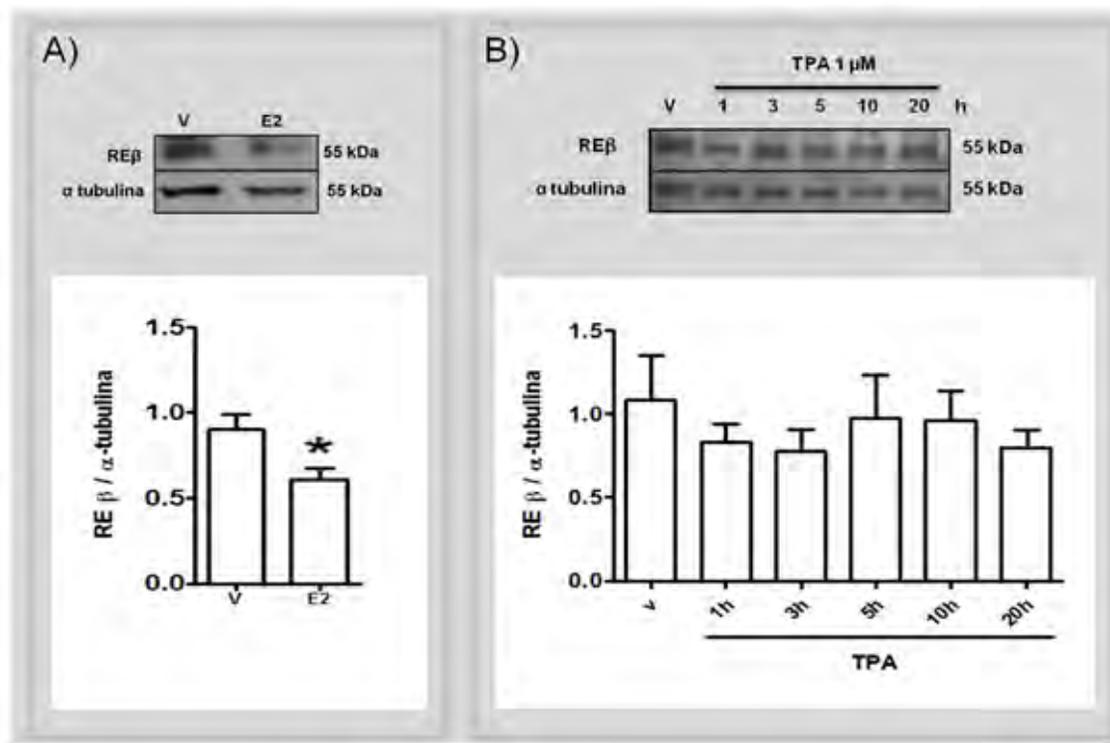


**Fig. 12.** Fosforilación del RE $\beta$  inducida por la activación de PKC $\alpha$ . Se muestra un blot representativo de 4 experimentos independientes. V: DMSO 10%; TPA: éster de forbol 1  $\mu$ M. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de las densitometrías realizadas a las placas. \*P<0.05 v.s. vehículo, n=4.

### 8.3 Efecto de la activación de PKC sobre el contenido del RE $\beta$

Se sabe que la fosforilación de los RE en residuos específicos puede servir como marca para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S (Picard et al., 2008), por lo que se decidió evaluar si la fosforilación del RE $\beta$  por PKC $\alpha$  afectaba el contenido del receptor. Para esto, los cultivos celulares fueron tratados con TPA 1 $\mu$ M a 1, 3, 5, 10 y 20 horas. El tratamiento control consistió en la estimulación con E2 10 nM por 1 hora. Mediante Western blot se identificó el contenido del RE $\beta$  de las diferentes muestras.

En la figura 13 se puede observar que el tratamiento con E2 provoca una disminución significativa en el contenido del RE $\beta$ . En los tratamientos con TPA no se encontraron diferencias significativas.



**Fig. 13.** Efecto de la activación de PKC sobre el contenido del RE $\beta$ . **A)** Disminución del contenido del RE $\beta$  estimulada por E2. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes. V: DMSO 10%; E2: estradiol 10 nM. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de las densitometrías realizadas a las placas. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney. \* $P < 0.0286$  vs vehículo. **B)** Evaluación del contenido del RE $\beta$  tras la activación de PKC con TPA. Se muestra un blot representativo de 4 experimentos independientes. V: DMSO 10%; TPA: éster de forbol 1  $\mu$ M. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de las densitometrías realizadas a las placas,  $n=4$ .

## 9. Discusión

Se sabe que existen múltiples factores que contribuyen al desarrollo del cáncer, muchos de los cuales han sido ampliamente estudiados, sin embargo, y debido a que las células tumorales presentan comportamientos complejos y heterogéneos, muchos mecanismos se encuentran poco caracterizados. En los meduloblastomas se ha reportado una elevada expresión del RE $\beta$  y se sabe que la señalización de este receptor es importante en el desarrollo tumoral, sin embargo, se desconocen muchos aspectos sobre los mecanismos que hacen posible que el RE $\beta$  tenga un papel crucial en estos tumores.

Por medio de estudios *in silico*, identificamos al residuo Ser219 del RE $\beta$  como posible sitio de fosforilación por PKC $\alpha$ , por lo que en este trabajo se estudió el efecto de la activación de PKC $\alpha$  sobre la fosforilación y regulación del contenido del RE $\beta$  en la línea celular DAOY derivada de meduloblastoma.

Al realizar la determinación de la asociación RE $\beta$ -PKC $\alpha$  (Fig. 11) se encontró que existe una asociación basal entre estas dos proteínas. En las muestras tratadas con TPA se observó un aumento significativo en la asociación RE $\beta$ -PKC $\alpha$  a los 5 minutos respecto al tratamiento con vehículo y este efecto regresó a sus niveles basales después de los 30 minutos. Estos resultados indican que el RE $\beta$  y PKC $\alpha$  aumentan su asociación después de la activación de la enzima.

En la figura 12 se puede observar que el RE $\beta$  se encuentra fosforilado de manera basal. Al evaluar el efecto de la activación de PKC $\alpha$  con TPA en la fosforilación del RE $\beta$ , se encontró un aumento significativo a los 5 minutos, mismo que se mantuvo hasta los 30 minutos. De igual manera, se observó que a los 60 minutos la fosforilación regresa a las condiciones basales.

Aunado a los resultados de fosforilación, la asociación basal encontrada entre RE $\beta$ -PKC $\alpha$ , que aumenta después de la activación de la enzima, sugiere que PKC $\alpha$  podría participar en la fosforilación del RE $\beta$ , sin embargo, existe la

posibilidad de que diferentes PKC participen en la fosforilación. Se ha documentado que la línea celular DOAY expresa PKC $\zeta$  además de PKC $\alpha$ , sin embargo, al tratarse de una isoforma atípica, no se activa con el éster de forbol utilizado, ya que éste únicamente activa a las isoformas clásicas y nuevas. Lo anterior sugiere que el aumento en la fosforilación del RE $\beta$  después del tratamiento con TPA podría deberse a PKC $\alpha$ , sin embargo, para confirmar que el aumento observado en la fosforilación del receptor a los 5 minutos se debe a la activación de PKC $\alpha$ , se podría inhibir a esta isoforma mediante el uso de inhibidores farmacológicos o siRNAs.

El comportamiento observado en el aumento del contenido del pRE $\beta$  coincide con el tiempo de máxima asociación del mismo con PKC $\alpha$ , lo que permite sugerir que PKC $\alpha$  participa en la fosforilación del RE $\beta$ .

Una de las formas a través de las cuales los RE son activados es la fosforilación, por lo que la participación del PKC $\alpha$  en la fosforilación del RE $\beta$  sugiere una participación en la regulación transcripcional del mismo, sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo.

Además de modular su actividad transcripcional, se sabe que la fosforilación de los RE en residuos específicos puede servir como marca para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S (Picard et al., 2008), por lo que evaluamos si la fosforilación del RE $\beta$  por PKC $\alpha$  afecta el contenido del receptor.

En la figura 13 se puede observar que a 1 hora de tratamiento con E2, hay una disminución significativa en el contenido del RE $\beta$  respecto al tratamiento con vehículo, tal como se ha reportado previamente. En las muestras tratadas con TPA, no se encontraron diferencias significativas respecto al tratamiento con vehículo, lo que indica que la fosforilación en el RE $\beta$  por PKC $\alpha$  no conduce al mecanismo propuestos para los residuos Ser104 y Ser106 del RE $\beta$  murino, en

donde la fosforilación sirve como marca para la ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S (Picard et al., 2008).

Los residuos de fosforilación del RE $\beta$  previamente reportados que conducen a la degradación por el proteasoma 26S (Ser104 y Ser106) se encuentran ubicados dentro del dominio de unión al ligando, que abarca los aminoácidos 1 a 149, mientras que el residuo Ser219 se localiza en la región bisagra del receptor, que se localiza en los aminoácidos 214 a 248. Los resultados obtenidos sugieren que la fosforilación en la región bisagra del RE $\beta$  no conduce a la degradación por el proteasoma 26S.

Es importante mencionar que en el RE $\alpha$ , que ha sido ampliamente estudiado, se han reportado algunos residuos de serina cuya fosforilación no conduce a la degradación del receptor; ejemplo de esto es el residuo Ser236, que se localiza en el dominio de unión a ADN y es fosforilado en células COS-1 por PKA, involucrado en la regulación de la dimerización del receptor (Chen et al., 1999; Vasudevan y Pfaff, 2008). De igual manera, en el RP se han identificado sitios que pueden ser fosforilados y que no conducen a la degradación del receptor, por ejemplo, la fosforilación del residuo Ser400 por CDK2 es requerida para la rápida localización nuclear y para regular la actividad independiente del ligando (Pierson y Lange., 2004).

Al igual que en los casos anteriores, es posible que la fosforilación del RE $\beta$  por PKC $\alpha$  pueda estar implicada en la regulación de los mecanismos necesarios para la activación del receptor, tales como reclutamiento de coactivadores o regulación de la dimerización del receptor.

El estudio de la participación de PKC $\alpha$  en la fosforilación del RE $\beta$  contribuye a la comprensión de los mecanismos que permiten que este receptor juegue un rol tan importante en el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas, con lo que se

pretende contribuir a la investigación para futuros blancos terapéuticos en este tipo de tumores.

## **10. Conclusiones**

PKC $\alpha$  se encuentra basalmente asociada al RE $\beta$ . La activación de PKC $\alpha$  con TPA provoca un aumento significativo en la asociación RE $\beta$ -PKC $\alpha$  a los 5 minutos en la línea celular DAOY.

El RE $\beta$  se encuentra fosforilado de manera basal. La activación de PKC $\alpha$  provoca un aumento significativo en el contenido del RE $\beta$  fosforilado desde los 5 y hasta los 30 minutos en células DAOY.

## **11. Perspectivas**

Inhibir PKC $\alpha$  con Gö 6976 para evaluar si hay una disminución en la fosforilación del RE $\beta$ .

Realizar estudios que permitan confirmar que PKC $\alpha$  fosforila al RE $\beta$  en el residuo Ser219.

Evaluar el efecto de la fosforilación del RE $\beta$  en la proliferación, migración e invasividad de la línea celular DAOY.

Determinar los genes blanco del RE $\beta$  fosforilado y evaluar la regulación transcripcional mediada por el receptor.

Realizar los ensayos mencionados anteriormente en otras líneas celulares derivadas de meduloblastoma.

## 12. Referencias

Adesina A., Dooley N., Yong V., et al. (1998) Differential role for protein kinase C-mediated signaling in the proliferation of medulloblastoma cell lines. *International Journal of Oncology* 12: 759-768

Aeder S., Martin P., Soh JW, et al. (2004). PKC- $\eta$  mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* 23: 9062-9069

Ali S., Metzger D., Bornert JM., et al. (1993) Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *The EMBO Journal* 12(3): 1153-1160

Arnold S., Obourn J., Jaffe H., et al., (1994) Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Molecular Endocrinology* 18: 1208–14.

Arnold S., Obourn J., Jaffe H., et al., (1995) Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Molecular Endocrinology* 9: 24–33.

Arora A. y Scholar E. (2005) Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315:971-979

Ascenzi P., Bocedi A., Marino M. (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 299-402

Barkovich, A.J. (2005) *Pediatric Neuroimaging*. Lippincott Williams and Wilkins.

Barletta F., Wong C., McNally C., et al. (2004) Characterization of the Interactions of Estrogen Receptor and MNAR in the Activation of cSrc. *Molecular Endocrinology* 18(5): 1096-1108

Barnett M., Madgwick D., Takemoto D. (2007). Protein Kinase C as stress sensor. *Cell signaling* 19: 1829-1829

Barone T., Gorski J., Greenberg S., et al. (2009) Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology* 95(1): 37-48

Basu A. y Sivaprasad U. (2007) Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal* 19: 1633-1642

Belcher S. (2009) Rapid Signaling Mechanisms of Estrogens in the Developing Cerebellum. *Brain Research Reviews* 57(2): 481–492

Belcher, S., Ma X., y Le H. (2009) Blockade of Estrogen Receptor Signaling Inhibits Growth and Migration of Medulloblastoma. *Endocrinology* 150(3): 1112–1121

Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* 294:1351–1362.

Bohinc B., Michelotti G. y Mae A. (2013) Hedgehog Signaling in Human Medullary Thyroid Carcinoma: A Novel Signaling Pathway. *Thyroid* 23(9): 1119-1126

Bononi A., Agnoletto C., De Marchi E., et al. (2011) Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Research* 2011: 1-26

Bothelo M., Alves H., Barros A., et al. (2015) The Role of estrogens and estrogen receptor signaling pathways in cancer and infertility: the case of schistosomes. *CellPress* 31(6): 246-251

Brandes A., Bartolotti M., Marucci G., et al. (2014) New perspectives in the treatment of adult medulloblastoma in the era of molecular *oncology*. *Oncology Hematology* 94: 348-359

Brandes A., Franceschi E., Tosoni A. (2009) Adult neuroectodermal tumors of posterior fossa (medulloblastoma) and of supratentorial sites (stPNET). *Oncology Hematology* 71: 165-179

Breitkreutz D., Braiman-Wilksman L., Daum N., et al. (2007) Protein Kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* 133: 793-808

Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., et al., (1995) Steroid Hormone Receptors in Astrocytic Neoplasms. *Neurosurgery* 37(3): 496-504

Castoria G., Migliaccio A., Bilancio A., et al. (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *The EMBO Journal* 20(21): 6050-6059

Chen D., Pace P., Coombes R., et al., (1999) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular Cell Biology* 19: 1002–15.

Chen D., Washbrook E., Sarwar N., et al. (2002) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* 21:4921–4931.

Cheng J., Lee E., Madison L., et al. (2004) Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Letters* 566: 169–172

Cheskis B., Greger J., Cooch N., et al. (2008) MNAR plays an important role in ERa activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids* 73: 901-905

Ciucci A., Meco D., De Stefano I., et al. (2014) Gender effects in experimental models of human medulloblastoma: Does Estrogen Receptor  $\beta$  Signalling Play a Role? *Plos One* 9(7): 1-12

Craig J. y Timm S. (2003) The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50: 3-22

De Braganca C y Millard N. (2015) Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology*, disponible en: <http://jcn.sagepub.com/content/early/2015/09/01/0883073815600866.long>

Deroo B., y Korach K. (2006) Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation*: 116-561

Do Carmo A., Balca-Silva J., Matias D., et al. (2013) PKC signalling in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy* 14(4): 287-294

Edwards D. y Boonyaratanakornkit V. (2003) Rapid Extranuclear Signaling by the Estrogen Receptor (ER): MNAR Couples ER and Src to the MAP Kinase Signaling Pathway. *Molecular Intervention* 3(1): 12-15

Ellison D. (2010) Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neurophatologica* 120: 305-316

Ellison D., Dalton J., Kocak M., et al. (2011) Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/ WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathoogical* 121:381–96

Fima E, Shtutman M, Libros P, et al. (2004). PKC eta enhances cell cycle progression, the expression of G1 cyclins and p21 in MCF-7 cells. *Oncogene* 20: 6794-6804,

Gerber N., Mynarek M., von Hoff K., et al. (2013) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treatment Review* 40: 356-365

Giangaspero F., Perilongo G., Fondelli M., et al. (1999) Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *Journal of Neurosurgery* 91 (6): 971-7

González-Arenas A., Hansberg-Pastor, Hernández- Hernández O., et al. (2012) Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER $\alpha$  activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochimica et biophysica acta* 1823(2): 379-386

González-Arenas A., Peña-Ortiz M., Hansberg-Pastor V., et al. (2015) PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  Activation Regulates Transcriptional Activity and Degradation of Progesterone Receptor in Human Astrocytoma Cells. *Endocrinology* 156(3): 1010-1023

Gopalakrishnan V., Tao R., Dobson T., et al. (2015) Medulloblastoma development: tumor biology informs treatment, Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *CNS oncology* 4(2): 79-89

Greene G., Gilna P., Waterfield M., et al. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231:1150–1154.

Hall J. y McDonnell D. (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ER beta) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566–78

Hansberg-Pastor V., González-Arenas A. y Camacho-Arroyo I. (2014) Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos. *Mensaje Bioquímico, Vol. XLI*. pp.127-144

Hara T., Mizayaki M., Hakuno F. (2011). PKC $\eta$  promotes a proliferation to differentiation switch in keratinocytes via upregulation of p27<sup>kip1</sup> mRNA through suppression of JNK/c-Jun signaling under stress condition. *Cell Death & Disease* 2:e157

Hatten M y Roussel F. (2011) Development and cancer of the cerebellum. *Cell Press* 34(3): 134-142

Heldring N., Pike A., Andersson S., et al. (2007) Estrogen receptors: How Do They Signal And What Are Their Targets. *Physiological Reviews* 87: 905-931

Hu J., Wang X., Zhou J., et al. (2010) Activation of PKC- $\alpha$  is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 70:239-245

Huang H., Lee T., Tzeng S., Horng J. (2005) KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research* 33: 226–229.

Inestrosa N. y Varela L., (2013) Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision. DOI: 10.5772/3445

Joel P., Smith J., Sturgill T., et al., (1998) pp90<sup>rsk1</sup> regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular Cell Biology* 18: 1978–84.

Joel P., Traish A., Lannigan D., et al. (1995) Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor. *Molecular Endocrinology* 9: 1041–52.

Kang J., Toita R., Kin C., et al. (2012) Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnology Advances* 30: 1662-1672

Kikuchi K., Soundararajan A., Zarzabal L., et al. (2012) Protein kinase C iota as a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 46:1-12

Klinge C. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65:227-251

Koide A., Zhao C., Naganuma M., et al. (2006) Identification of Regions within the F Domain of the Human Estrogen Receptor  $\alpha$  that Are Important for Modulating Transactivation and Protein-Protein Interactions. *Molecular Endocrinology* 21(4): 829-842

Kongkham P., Northcott P., Croul S., et al. (2010) The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene* 29:3017–3024

Kool M., Korshunov A., Remke M., et al. (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, group 3, and group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathologica* 123: 473-484

Kuiper G., Enmark E., Peltö-Huikko M., et al. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS* 93: 5925–3590.

Kuiper G., Carlsson B., Grandien K., et al. (1997) Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138 (3): 863:870

Kushner P., Agard D., Greene G., et al. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74: 311-317

Leung Y., Mak P., Hassan Z., et al. (2006) Estrogen Receptor (ER)-  $\beta$  isoforms: A key to understanding ER- $\beta$  signaling. *PNAS* 103 (35): 13162-13167

Lewandowsky S., Kalita K. & Kackmarek L. (2002) Estrogen receptor  $\beta$ ; potential function significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS letter* 524: 1-5

Li K., Lau K. y Ng H. (2013) Signaling pathway and molecular subgroups of medulloblastoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6(7): 1211-1222

Lin A., Li R., Ho E., et al. (2013) Differential ligand binding affinities on Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Isoforms. *PlosOne* 8(4): e63199

Louis D., Ohgaki H., Wiestler O., et al. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114 (2): 97-109

Mancuso M., Leonardi S., Ceccarelli M. et al., (2010) Protective role of 17  $\beta$ -estradiol on medulloblastoma development in Patched 1 heterozygous mice. *International Journal of cancer* 127: 2749-2757

Martiny G., Fabbro D. (2007) Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacological Research* 55: 477-86

Matosiuk D., Skrzypczak M., Kapka-Skrzypczak L., et al. (2013) Nuclear Estrogen Receptors Co-activation Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry* 20: 3317-3338

McKenna N., Lanz R. y O'Malley BW. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrinology Reviews* 20:321–44

McKiernan E., O'Brien K., Grebenchtchikov N., et al. (2008) Protein kinase Cdelta expression in breast cancer as measured by real-time PCR, western blotting and ELISA. *Br J Cancer* 99 (10):1644-50

Migliaccio A., Domenico M., Catoria G., et al. (1999) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO Journal* 15(6): 1292-1300

Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, et al. (1993). Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *Journal of Biological Chemistry* 268: 6090-6096

Mukherjee T., Kumar S., Lata K., et al. (2010) Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800: 1127-1135

Murphy L., Peng B., Leygue E., et al. (2003) Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *Journal of Molecular Endocrinology* 30: 13-29

Nakagawa M., Oliva J., Kothapalli D., et al. (2005) Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase Cdelta-dependent induction of p21. *Journal of Biological Chemistry* 280: 33926-34

National Cancer Institute. (2016) *Childhood Central Nervous System Embryonal Tumors Treatments (PDQ®)*, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65981/>

Nazarenko I, Jenny M, Keil J, et al. (2010). Atypical protein kinase C zeta exhibits a proapoptotic function in ovarian cancer. *Molecular Cancer Research* 8: 919-34

Northcott P., Jones D., Kool M., et al. (2012) Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nature Reviews Cancer* 12:818–34

- Ochoa A., Juárez C., Rosales M., et al. (2012) La vía de señalización B-catenina y su relación con el cáncer. *Cirugía y Cirujanos* 2012 80(4): 389-398
- Ogawa S., Inoue S., Watanabe T., et al. (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243: 122–126
- Paech K., Webb P., Kuiper G., et al. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  at AP-1 sites. *Science* 277: 1508-1510
- Perreault S., Ramaswamy V., Achrol A., et al. (2014) MRI surrogates for molecular subgroups of medulloblastoma. *American Journal of Neuroradiology* 35:1263-1269
- Picard N., Charbonneau C., Sánchez M., et al. (2008) Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Molecular Endocrinology* 22(2): 317-330
- Picariello L., Fiorelli G., Martinetti V., et al. (2003) Growth response of colon cancer cell lines to selective estrogen receptor modulators. *Anticancer Research* 23: 2419–2424
- Pierson L. y Lange C. (2004) Phosphorylation of Progesterone Receptor Serine 400 Mediates Ligand-Independent Transcriptional Activity in Response to Activation of Cyclin-dependent Protein Kinase 2. *Molecular and Cellular Biology* 24(24): 10542-10557
- Ramaswamy V., Northcott P. & Taylor M. (2011) FISH and chips: the recipe for improved prognostication and outcomes for children with medulloblastoma. *Cancer Genetics* 204: 577–588
- Regala R., Weems C., Jamieson L., et al. (2005) Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 65: 8905-8911
- Remke M., Hielscher T., Northcott P., et al. (2011) Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *Journal of Clinical Oncology* 29: 2717–2723

Rimkus T., Carpenter R., Qasem S., et al. (2016) Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancer* 8(22): doi:10.3390

Rodríguez R., (2005) *Vademécum Académico de Medicamentos, 4ª edición*. McGraw Hill Interamericana.

Rogatsky I., Trowbridge J., y Garabedian M. (1999) Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22296–302.

Rutkowsky S., Bobe U., Deinlein F., et al. (2005) Treatment of Early Childhood Medulloblastoma by Postoperative Chemotherapy Alone. *The New England Journal of Medicine*: 978-986.

Sáez L. (2008). *Tratamiento de las enfermedades digestivas*. España: Editorial Médica Panamericana. pág. 186

Sánchez M., Picard N., Sauvé C., et al. (2010) Challenging estrogen receptor  $\beta$  with Phosphorylation. *Trends Endocrinology Metabolism* 21(2): 104-110

Saville B., Wormke M., Wang F., et al. (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5379–87

Shupnik M. (2004) Crosstalk between steroid receptor and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Ocogen* 23: 7979-7989

Singh M., Sétáló G., Guan X., et al. (2000) Estrogen-Induced Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in the Cerebral Cortex of Estrogen Receptor- $\alpha$  Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 20(5): 1694-1700

Skliris G., Leygue E., Watson P., et al. (2008) Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: Estrogen receptor beta as a therapeutic target. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109: 1–10

Smoll N., Drummond K. (2012) The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. *Journal of Clinical Neuroscience* 19: 1541-1544

Steinberg S. (2008) Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews* 88(4): 1341-1378

Sun M., Paciga J., Feldman R., et al. (2001) Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Research* 61: 5985–91.

Tarafdar A. y Michie A. (2014). Protein kinase C in cellular transformation: a valid target for therapy? *Biochemical Society Transactions* 42(6): 1556-1562

Urbanska K., Pannizzo P., Lassak A., et al. (2009) Estrogen receptor beta-mediated nuclear interaction between IRS-1 and Rad51 inhibits homologous recombination directed DNA repair in medulloblastoma. *Journal of Cellular Physiology* 219: 392–401

Vasudevan N. y Pfaff D. (2008) Non-genomic action of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29: 238-257

Walter P., Green S., Greene G., et al. (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *PNAS* 82:7889–93.

Weiss A., Wiskocil L. y Stobo J. (1984) The role of t3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *The Journal of Immunology* 133(1): 123-128

Xu W. y Shanle E. (2010) Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(13): 1265-1276

Xu Y., Liu Z., Cao J., et al. (2011) GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *PEDS* 24(3): 255-260

Zannoni GF., Ciucci A., Marucci G., et al. (2016) Sexual dimorphism in medulloblastoma features. *Histopathology* 68: 541–548