



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LA PROTEÍNA CINASA C EN LA
FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR A
PROGESTERONA EN ASTROCITOMAS
HUMANOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

MIGUEL ÁNGEL PEÑA ORTIZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Elena Zambrano González

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

1er. SUPLENTE: Dr. Samuel Canizales Quinteros

2° SUPLENTE: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 107 Edificio F, Facultad de Química, Av. Universidad no. 3000,
Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Distrito Federal, 04510.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SUSTENTANTE: Miguel Ángel Peña Ortiz

Agradecimientos:

Quisiera hacer un agradecimiento muy particular a CONACYT por el apoyo para el desarrollo del proyecto (Número 132037), al Colegio de Profesores de la Facultad de Química por la cátedra Angelina Quintero (Abril – Septiembre, 2010). A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, y finalmente al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por recibirme en su laboratorio y por todo el apoyo que brindó a lo largo de este año.

Dedicatoria:

A mis papás, Chío y Mike, por darme todo su apoyo durante estos años de estudio y durante toda mi vida. En verdad no hay forma de agradecerles todo lo que han hecho por mí, ni hay forma de decirles cuánto los amo y admiro. Son el mejor modelo a seguir que cualquier persona podría desear. Espero esto los haga sentir tan orgullosos de mi como yo lo estoy de ustedes y algún día poder devolverles aunque sea algo de la felicidad que me han dado. Gracias por todo, sin ustedes no estaría aquí, pero tampoco podría haber llegado tan lejos. Han sido los mejores maestros que he tenido, me han enseñado todo, en especial a ser feliz, a ser la mejor persona que pueda ser, a disfrutar la vida y a apreciar las cosas que en verdad importan. ¡Gracias, gorditos!

A mi hermana, que me ha aguantado durante toda la carrera y durante toda su joven vida, que se ha dejado molestar y querer desde bebé hasta ahora.

A Lau, que desde los primeros días en esta Facultad ha estado apoyándome, y dándome aliento para seguir adelante. Gracias por ser tan linda conmigo siempre, por hacerme tan feliz y llenar mi vida de tanta alegría. Gracias por acompañarme en todo momento, por preocuparte, por cuidarme. Gracias por hacer que siempre de lo mejor de mí. Eres lo mejor que pudo pasarme, una parte de mi. ¡Te amo tantísimo bastante!

A todos mis amigos por su apoyo y cariño, pero en especial a Carlos y Daniel, que aún después de tantos años son los mejores amigos que podría pedir.

Al laboratorio 107, Aliesha, Nacho, Edith, Tania, Alejandro, Graciela, Vale, Petite, Gaby, Liliana y Brenda, por enseñarme tanto en este tiempo, por ser tan buenos compañeros y ayudarme y apoyarme en todo.

Y finalmente pero no menos importante, a toda mi pequeña familia, por todo el apoyo y cariño desde el primer día del kínder, hasta hoy y espero que siempre. ¡Gracias a todos! Bencho, Bola, Fredy, Tere, Eric, Helen, Yadi, Paco, Leti, Nacho, Polito, Lucy, Alex, Maribel, Piti, Rafael, Chata, Pepe, Lauris, George, Marix, Rafa, Geli, Lupita, Carlo, Chivis, Olaf, Nachito, Anita, Yaya, Chino, Eli, Elenita, Andrés, David, Rubén, Gina, Beto, Érica, Cocol, Eric, Sandy, Indira, Arturo, Chivis, Tesi, Alex, Bego, Rafita, Caro, Ian, Teti, Metz, Moni, Mota, Sofi, Georgio, Andrea, Artur, Fredo, Bolita, Ili, Sebas, Iñaki, Regina, Coco, Rorro.

Abreviaturas

aPKC	PKC atípica	mM	mili Molar
CD-1	Ciclina D1	nPKC	PKC nuevas
CdC2	Cinasa dependiente de ciclina 2	P4	Progesterona
CKII	Caseincinasa 2	PKC	Proteíncinasas C
cPKC	PKC clásicas	PLC	Fosfolipasa C
DAG	Diacil glycerol	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DMEM	Medio Eagle Modificado Dulbecco	PS	Fosfaditilserina
DMSO	Dimetilsulfóxido	RP	Receptor a progesterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	SDS	Dodecilsulfato sódico
E2	Estradiol	Ser	Serina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	SNC	Sistema nervioso central
ES	Error Estándar		
FSH	Hormona estimulante de los folículos	St	Estaurosporina
GABA	Ácidos gamma-aminobutírico	TBS	Solución buffer Tris
hRP	Receptor a Progesterona humano	Thr	Treonina
KDa	Kilo Daltons	TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
LH	Hormona lunetinizante	UBA	Activadora de ubiquitina
mA	mili Ampers	UBC	Conjugadora de ubiquitina
MAPK	Proteincinasas activadas por mitógenos	UBL	Ligasa de ubiquitina

Índice	
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
III. Antecedentes	
3.1 Estructura y función de la progesterona.....	4
3.1.1 Mecanismos de acción.....	7
3.2 Características del Receptor a Progesterona (RP).....	9
3.2.1 Isoformas del RP.....	10
3.2.2 Regulación de la expresión del RP	
3.2.3.1 Fosforilación del RP.....	10
3.2.3 RP y Tumores cerebrales.....	15
3.3 Proteína Cinasa C.....	17
IV. Justificación.....	19
V. Hipótesis.....	20
VI. Objetivos	
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Particulares.....	20
VII. Materiales y métodos	
7.1 Reactivos.....	21
7.2 Cultivo celular.....	22
7.3 Caracterización de la degradación de las isoformas del RP dependiente de ligando.....	22
7.4 Determinación de la participación de PKC sobre la degradación del RP inducida por su ligando (P4).....	22
7.5 Caracterización del efecto de activación de PKCs sobre el contenido de las isoformas del RP.....	23
7.6 Extracción de proteínas totales.....	23
7.7 Western blot.....	23
7.8 Análisis de resultados.....	24
VIII. Resultados	
8.1 Caracterización de la degradación de las isoformas del RP dependiente de ligando.....	25
8.2 Determinar la participación de la cinasa PKC en la degradación de las isoformas del RP inducida por su ligando (P4)	27
8.3 Caracterización del efecto de activación de PKCs sobre el contenido de las isoformas del RP.....	29
IX. Discusión.....	31
X. Conclusión.....	34
XI. Perspectivas.....	34
XII. Referencias.....	35

I. Resumen

La progesterona (P4) y sus receptores desempeñan una función importante en la ovulación, la conducta sexual, el embarazo, la excitabilidad neuronal, la diferenciación celular, la plasticidad cerebral, la protección al daño neuronal y la proliferación de los tumores cerebrales denominados astrocitomas. Esta hormona lleva a cabo sus acciones a través de su receptor (RP) que es una proteína intracelular, la cual al interactuar con su ligando se activa para unirse al ADN e inducir la transcripción de diversos genes. El RP ha sido caracterizado en astrocitomas humanos, tanto en biopsias como en líneas celulares derivadas de este tipo de tumores; además, en trabajos previos realizados en el laboratorio se ha encontrado que la P4, mediante el RP, modifica el número celular de las líneas celulares D54 y U373. El RP al activarse puede ser fosforilado por diversas cinasas e inducir la degradación del mismo. Hasta el momento, se ha encontrado que el RP puede ser fosforilado por la caseína cinasa II, la cinasa 2 dependiente de ciclina y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). La proteína cinasa C (PKC) es una familia de cinasas que tiene una gran variedad de sustratos, proteínas estructurales, del ciclo celular, etc. En modelos de gliomas y otros tipos de cáncer, se ha encontrado que estas cinasas participan en procesos de malignidad como invasividad y migración. Se desconoce el papel de PKC en la fosforilación del RP.

Para conocer el papel de PKC en la degradación del RP se trataron cultivos celulares derivados de astrocitomas humanos grado III (U373) con estradiol (E2) + P4 para determinar el tiempo en el que ocurre la degradación del RP por su ligando; con E2 + los inhibidores de PKC (Estaurosporina, St) y/o MAPK (UO126) + P4 para determinar si PKC participa en la degradación del RP y comparar este comportamiento con el observado al inhibir MAPK, que ya fue reportado anteriormente; o con E2 + TPA (12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato, activador de PKC) para evaluar el papel de la activación directa de PKC en la degradación del RP. Se realizó Western Blot sobre las proteínas totales para determinar la presencia de las dos isoformas del RP (RP-A y RP-B), además se utilizó la misma

técnica para determinar la cantidad de α -tubulina, como control de carga. Se observó que la degradación de las isoformas de RP por su ligando en estas líneas ocurrió a los 300 min posteriores al tratamiento con P4. Al tratar a las células con ambos inhibidores (St y UO126), tanto por separado como en conjunto, no se observó degradación del RP a los 300 min del tratamiento con P4, lo que indica que PKC participa en la degradación de una manera similar a MAPK. Finalmente, se observó una disminución significativa para ambas isoformas desde los 15 y hasta los 60 min posteriores al tratamiento con TPA, después de este tiempo se observó un aumento en el contenido del RP.

Los resultados anteriores indican que PKC es una cinasa que participa en la regulación por degradación del RP.

II. Introducción

Los tumores cerebrales son patologías numerosas de múltiples características que producen diversos síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y capacidad invasiva. Estos tumores constituyen del 10 al 15% del total de las neoplasias que se presentan en el ser humano y pueden ser primarios, si se originan dentro del SNC, y secundarios si se originan fuera del SNC y migran a éste. Los más comunes son los de tipo primario y de éstos, los astrocitomas son los más frecuentes (69%). Los astrocitomas son tumores derivados de células gliales de un alto potencial de malignidad que se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, y que se presentan con mayor frecuencia en adultos entre los 40 y los 60 años de edad. Los astrocitomas se clasifican de acuerdo a sus características histológicas en 4 grados (I-IV) siendo el grado IV el de máxima evolución, la sobrevivencia de los pacientes es inversamente proporcional al grado de evolución tumoral. Los tratamientos existentes son quimioterapia y radioterapia, pero la sobrevivencia de los pacientes de grado III y IV sigue siendo muy baja.

Se ha observado que la progesterona (P4) desempeña un papel importante en procesos patológicos como el cáncer, particularmente participa en el crecimiento de algunos tumores cerebrales, como los astrocitomas. Por otro lado, la P4 también participa en la regulación de múltiples procesos fisiológicos en los mamíferos, entre los que se encuentran la ovulación, la conducta sexual, el embarazo y la excitabilidad neuronal.

La P4 actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales: uno genómico, llamado también clásico, y otro no genómico, o membranar. El primero involucra la interacción de la P4 con receptores intracelulares específicos (Receptores a Progesterona o RP), mientras que el segundo requiere la interacción de la hormona con receptores membranales propios o de manera alostérica, así como la activación de diversas cascadas de señalización.

El mecanismo genómico de acción de la P4 se produce cuando esta hormona ingresa a la célula por difusión simple gracias a su naturaleza esteroide y ya en el núcleo se une al RP provocando un cambio conformacional en éste que lleva a la separación de las proteínas de choque térmico que estaban unidas al receptor inactivado, seguidas de la fosforilación del RP y su dimerización. La fosforilación del receptor induce su degradación a través del proteosoma 26S.

Dentro de las acciones no genómicas de la P4 se encuentra la activación de diversas vías de señalización que involucran cinasas tales como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o las proteínas cinasas C (PKCs). Las PKCs poseen una amplia variedad de sustratos, por ello las rutas de transducción de señales juegan un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la sobrevivencia, la migración o la angiogénesis. Diferentes isoformas de PKC se han asociado a diferentes tipos de cáncer como el de colon, pulmón, mama, próstata y cerebro. En gliomas las PKCs α , δ y ϵ se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos y al aumento en la expresión de oncogenes. En células U373 (derivadas de astrocitomas humanos grado III) se han detectado las

isoformas α , δ y ε de la PKC.

A pesar de que ya se ha estudiado el efecto proliferativo de la P4 en líneas celulares de astrocitomas humanos y se han detectado las dos isoformas del RP tanto en astrocitomas humanos como en líneas derivadas de éstos y se han encontrado, también en estas líneas celulares, isoformas de PKC relacionadas con diversos procesos proliferativos de gliomas, hasta el momento se desconoce el papel de PKCs en la fosforilación del RP y su participación en la proliferación celular de los astrocitomas humanos.

III. Antecedentes

3.1 Estructura y función de la progesterona

La progesterona (P4) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol que se sintetiza en las células del cuerpo lúteo, la corteza adrenal, la placenta y en neuronas y células gliales en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Graham y Clarke, 1997; Zwain y Yen, 1999). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona estimulante de los folículos (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham y Clarke, 1997).

La síntesis de P₄ se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona mediante la pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 y posteriormente la transformación de la pregnenolona a P₄ tras la oxidación del grupo alcohol en el C-3 y la migración del doble enlace del anillo B al anillo A (Fig. 1). Estos procesos se llevan a cabo por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

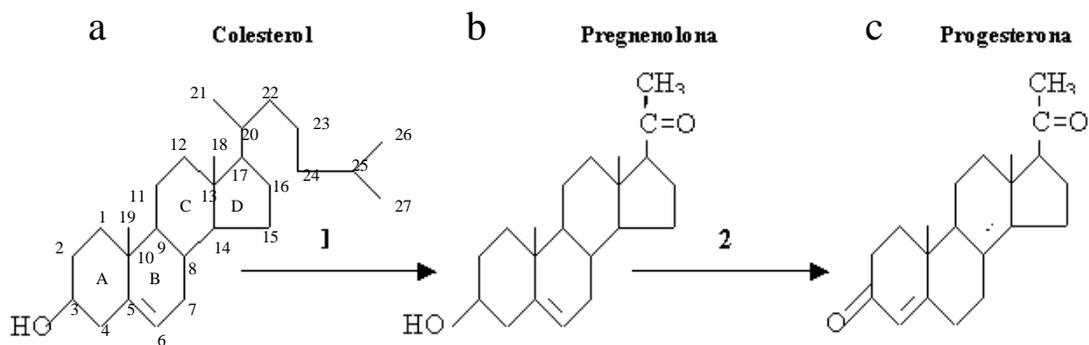


Figura 1. Biosíntesis de la P₄. La biotransformación de colesterol a P₄ implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Estructura del colesterol. b) estructura del la pregnenolona. c) Estructura de la progesterona. 1) 20,22 esteroide liasa; 2) 3β-OH-esteroide deshidrogenasa (Basada en Gore-Langton et al., 1988).

Una vez que la P₄ y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas:

La reducción en el carbono 20 da lugar a la formación de 20α y 20β dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de progesterona); posteriormente se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandiolos o pregnantrioles.

La P₄ participa en la regulación de múltiples procesos fisiológicos en los mamíferos entre los que se encuentran la ovulación, la conducta sexual, el embarazo, la excitabilidad neuronal, la ventilación pulmonar, el crecimiento, la diferenciación celular, la plasticidad cerebral y la protección al daño neuronal. (Camacho-Arroyo et al., 1995; Genazzani et al., 2000; Gonzalez-Arenas et al., 2003).

Se ha descrito que la P₄ modula la actividad de diferentes neurotransmisores como la del ácido gamma-aminobutírico (GABA), del glutamato, de la acetilcolina, de la dopamina, de la noradrenalina y de la serotonina (Rumpprecht, 2003; Melcangi et al., 2001; Engel y Grant, 2001; Arbogast y Voogt, 2002; Etgen y Quesada, 2001). En general se ha observado que la P₄ disminuye la excitabilidad neuronal aumentando la actividad de GABA o

modulando la del glutamato (Melcangi et al., 2001; Engel y Grant, 2001). De hecho, P4 realiza efectos anestésicos en diferentes especies y posee actividad anticonvulsiva en modelos experimentales y en humanos (Backstrom et al., 1984; Beyenburg et al., 2001). También se ha visto el papel de la P4 en la analgesia observada en el embarazo, se ha encontrado que esta hormona incrementa el contenido de dinorfina en la médula espinal en la rata (Medina et al., 1993).

Además, la P4 regula otras funciones en el sistema nervioso, como el sueño. La P4 participa en la regulación del sueño durante el embarazo y su administración en hombres adultos ejerce efectos hipnóticos (Gomez et al., 2002). Por otro lado, se ha relacionado la ansiedad del síndrome premenstrual al final de la fase lútea con la disminución de P4 (Backstrom et al., 2003); adicionalmente se ha reportado que esta hormona y sus metabolitos poseen propiedades ansiolíticas (Freeman, 2002).

Otro de los aspectos de la P4 en el sistema nervioso es su papel en la promoción de la neuroprotección y neuroregeneración. En diversos modelos de daño cerebral realizados en ratones, gatos y ratas se ha observado que la P4 posee efectos neuroprotectores contra diferentes agentes y procedimientos traumáticos, como el ácido okadáico y la isquemia, respectivamente (Callier, 2001; Cervantes, 2002; Nilsen, 2002). A pesar de que la P4 reduce la peroxidación de lípidos después de daño traumático cerebral en rata, el mecanismo de neuroprotección de la P4 no está completamente dilucidado.

La P4 también desempeña un papel importante en procesos patológicos como el cáncer. Estudios realizados en la línea celular T47-D de cáncer de mama humano se ha observado que la P4 induce la progresión del ciclo celular a través de la inducción de la expresión de genes asociados con la regulación de dicho ciclo como las ciclinas (CD-1) (Sutherland et al., 1998), factores de crecimiento (EGF, TGF- α , TGF- β) (Murphy et al., 1986; Musgrove y Sutherland, 1993) y protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos) (Musgrove et al., 1991). Los efectos antes mencionados pueden ser bloqueados por el compuesto RU486 que es antagonista de la P4.

Se ha observado que la P4 participa en el crecimiento de algunos tumores cerebrales. Los astrocitomas son tumores cerebrales que producen diversos síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y capacidad invasiva. Se sabe que la P4 y sus receptores influyen en la proliferación de estos tumores. Se profundizará en el papel de la P4 sobre los astrocitomas más adelante.

3.1.1 Mecanismos de acción

La P4 actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales denominados genómico (clásico) y no genómico (membranal). El primero involucra la interacción de la P4 con receptores intracelulares específicos (RP), mientras que el segundo requiere la interacción de la hormona con receptores membranales, sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores y canales iónicos (Fig. 2) (Camacho-Arroyo et al., 2003; Camacho-Arroyo et al., 1995; Schumacher et al., 1999)

La mayoría de los efectos de la P4 sobre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular están mediados por sus receptores intracelulares (RP) (Camacho-Arroyo et al., 2003), los efectos ocurren de la siguiente manera: la P4 ingresa a la célula por difusión simple; ya en el núcleo se une al RP que previamente se encontraba unido a proteínas chaperonas, como proteínas de choque térmico. La unión de la P4 al RP provoca un cambio conformacional en éste que lo separa de las proteínas chaperonas permitiendo su dimerización y fosforilación, resultando en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas en el DNA llamadas elementos de respuesta hormonal que en el caso del RP se denominan elementos de respuesta a P4. Posteriormente el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por la P4, favoreciendo así la transcripción (Liu et al., 2001).

Dentro de las acciones no genómicas de la P4 se encuentran la activación de receptores de membrana específicos, la interacción en sitios alostéricos en

receptores como el receptor a GABA y diversas vías de señalización que involucran cinasas tales como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o las proteínas cinasas C (PKCs) (Camacho-Arroyo et al., 2003). Las MAPKs que se activan en presencia de P4 son capaces de fosforilar al RP, inducir su degradación a través del proteosoma 26S y aumentar su actividad transcripcional (Camacho-Arroyo et al., 2002; Lange et al., 2000; Turgeon y Waring, 2000).

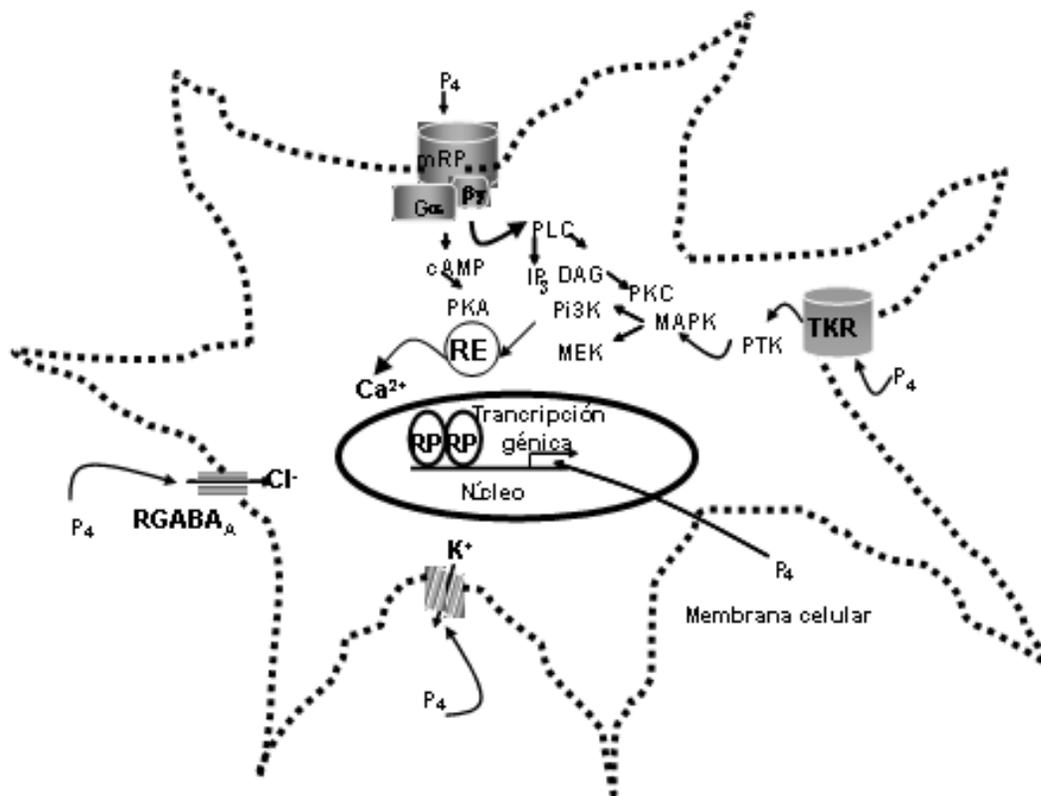


Figura 2. Mecanismos de acción de la P4. La P4 actúa mediante dos mecanismos, el clásico cuando la P4 atraviesa la membrana, se une a su receptor induciendo su dimerización, fosforilación y activación como factor de transcripción; y el no clásico cuando interactúa con receptores de membrana y canales desencadenando señales intracelulares. G: Proteína G, αβγ: subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RGABA_A: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP₃: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de tirosina cinasa, TKR: Receptor tipo tirosina cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, MEK: Cinasa de MAPK, Cl⁻: Cloro, Ca²⁺: Calcio, K⁺: Potasio. (Tomada de González-Arenas y Hernández-Hernández, 2011)

3.2 Características del receptor a progesterona

El RP pertenece a una familia de factores de transcripción activados por ligando, las isoformas de este receptor están compuestas por cuatro dominios (Tsai y o'Malley, 1994; Tata, 2002). 1) El dominio amino terminal (A/B) participa en la regulación de la transcripción de genes blanco, este es el dominio que varía para cada isoforma. 2) Dominio de unión al DNA (C), participa en el proceso de dimerización y en la unión al DNA, en este dominio se encuentran los dedos de zinc que permiten esta unión. 3) Dominio bisagra (D) participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas del choque térmico y en la localización nuclear ya que contiene el péptido señal de localización nuclear. 4) Dominio de unión al ligando (E) Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de transcripción (Figura 3).

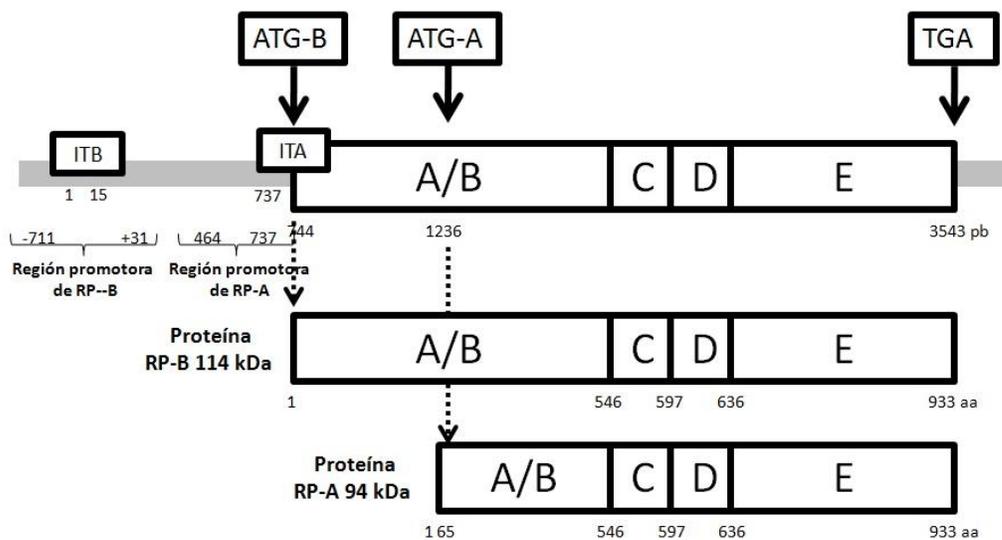


Figura 3. Esquema representativo del gen y la proteína de las isoformas del RP. Se indican los sitios de inicio de la transcripción del RP-A y RP-B (ITA e ITB, respectivamente). Los codones de inicio de la transcripción del RP-A y RP-B (ATG-A y ATG-B); el codón de paro de la transcripción del RP (TGA); y los dominios funcionales del RP (A-E) (Basada en Fujimoto, 1997 y Kastner, 1990)

3.2.1 Isoformas del RP

En diversas especies de vertebrados, incluido el ser humano se han caracterizado dos isoformas del RP denominadas RP-A (86-90 kDa) y RP-B (116-120 kDa). La diferencia entre ellas es de 164 aminoácidos presentes en el extremo amino de RP-B (Conneely y Jericevic, 2002; Giangrande y McDonnell, 1999). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son generadas a partir de sitios alternativos de inicio de la transcripción o de la traducción (Conneely et al., 1987) (Fig. 3).

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

3.2.2 Regulación de la expresión del RP

3.2.2.1 Fosforilación del RP

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan et al., 1989; Zhang et al., 1997). Existe evidencia de que la regulación de distintas vías de señalización celular alteran la actividad y la fosforilación del RP (Beck et al., 1992; Takimoto et al., 1996), así como de otros receptores a hormonas esteroideas (Ignar-Trowbirdge et al., 1992; Rogatsky et al., 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas (Rowan et al., 2000).

La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P_4 . El RP de humano (hRP) contiene 14 sitios de fosforilación (Fig. 4), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo* (Ser²⁰, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁶, Ser⁴⁰⁰, Ser⁶⁷⁶) y cuatro únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser²⁵, Ser¹³⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴) (Zhang et al., 1994 y 1997; Lange et al., 2000; Knotts et al., 2001). Hasta ahora se sabe que la P_4 induce la fosforilación del RP en tres residuos que son la Ser¹⁰², Ser²⁹⁴ y Ser³⁴⁵ y que los residuos Ser⁸¹, Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰ y Ser⁴⁰⁰ son sitios ya fosforilados en condiciones basales que incrementan su fosforilación después del tratamiento con la hormona (Zhang et al., 1994 y 1995). Hasta el momento se conoce que los residuos Ser¹⁶² y Ser²⁹⁴ son fosforilados por las proteínas cinasas activadas por mitógenos 44 y 42 (MAPK-44 y 42) (Lange et al., 2000).

Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma B del hRP en los residuos Ser²⁰, Ser²⁵, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹³⁰ y Ser¹⁶² y ocho sitios de fosforilación que son comunes para ambas isoformas en los residuos Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁵, Ser⁴⁰⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴ y Ser⁶⁷⁶ (Knotts et al., 2001).

La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo localización nuclear en respuesta a la activación de MAPK, sinergismo transcripcional en presencia de P_4 y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Kazmi et al., 1993; Lange, 2004).

Estudios realizados en células HeLa mutando el RP en el residuo Ser²¹¹ por Ala, muestran que en estas células sólo hay un 25% de la actividad transcripcional respecto a las normales; cuando se mutó la Ser⁵³⁰ se observó un menor plegamiento del RP, lo que sugiere que la fosforilación mantiene al receptor en estado activo (Weigel, 1996). En células T47D se ha observado que la fosforilación del RP aumenta su actividad transcripcional después del tratamiento con R5020, un agonista de la P_4 (Shen et al., 2001).

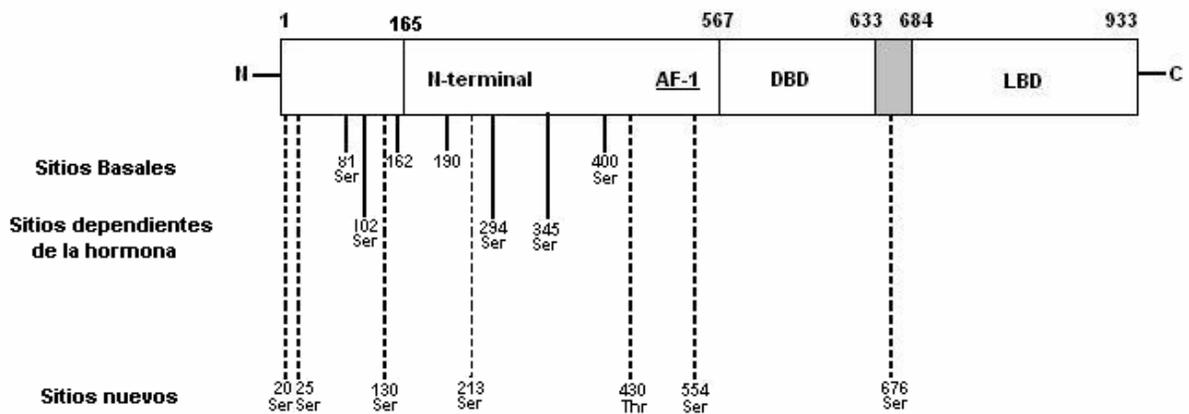


Figura 4. Sitios de fosforilación en el RP humano. Residuos de fosforilación en el RP identificados hasta la fecha. Se esquematizan los dominios de transactivación (AF-1), de unión al ADN (DBD) y de unión a ligando (LBD). (Tomada de Knotts et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, la P_4 induce la fosforilación del RP, lo que ocasiona un aumento en la actividad transcripcional así como la inducción de la degradación del receptor por el proteosoma 26S (Lange, 2004). El residuo Ser²⁹⁴ fosforilado de manera dependiente de ligando es la señal para que el RP sea degradado por la vía Ubiquitina-Proteosoma 26S. Por otro lado se ha sugerido que la Ser⁴⁰⁰ puede estar implicada tanto en el recambio como en la actividad transcripcional del RP, ya que cuando se intercambia una alanina por la serina en esta posición tanto la actividad transcripcional como el contenido del RP se incrementan (Pierson-Mullany et al., 2004).

Se tienen datos que indican que en células CV1 (células de riñón de mono) tratadas con ácido okadaico (inhibidor de fosfatasa PP1 y PP2A), se incrementa la fosforilación del RP así como su actividad transcripcional (Denner et al., 1990). Se ha encontrado que en células T47-D al ser tratadas con este inhibidor de fosfatasa, aumenta la actividad transcripcional del RP inducida por R5020 (agonista del RP) (Beck et al., 1992).

Existe evidencia de que la regulación de distintas vías de señalización alteran la actividad y la fosforilación del RP (Beck et al., 1992; Takimoto et al., 1996), así como de otros receptores a hormonas esteroideas, como el estradiol (Ignar-Trowbridge et al., 1992; Rogatsky et al., 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas a diferentes vías de señalización que regulan la actividad y la fosforilación del RP (Rowan et al., 2000).

La ubiquitinación del RP implica la participación consecutiva de tres enzimas, la enzima activadora de ubiquitina (UBA), el complejo de enzimas conjugadoras de ubiquitina (UBC) y ligasas de ubiquitina (UBL). El RP una vez poliubiquitinado está listo para ser degradado por el proteosoma 26S, localizado en núcleo y en el citoplasma (Yang et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado que tanto en el hipotálamo como en el área preóptica y el hipocampo de la rata la degradación del RP disminuye tras la inhibición del Proteosoma 26S (Villamar-Cruz et al., 2006).

La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo la localización nuclear en respuesta a la activación de MAPK, sinergismo transcripcional en presencia de P4 y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Kazmi et al., 1993; Lange, 2004).

Hasta el momento se conoce que tres diferentes cinasas son capaces de fosforilar al RP: la caseína cinasa II (CKII) (Zhang et al., 1994), la cinasa 2 dependiente de ciclina (Cdc2) (Knotts et al., 2001; Zhang et al., 1997), y por las MAPK-44 y MAPK-42 (Lange et al., 2000) (Fig. 4). Sin embargo, aún existen sitios de fosforilación cuyas cinasas se desconocen. A este respecto, con el programa KinasePhos se han identificado 2 posibles residuos (Ser⁴⁰⁰ y Thr⁴³⁰) que podrían ser fosforilados por PKC.

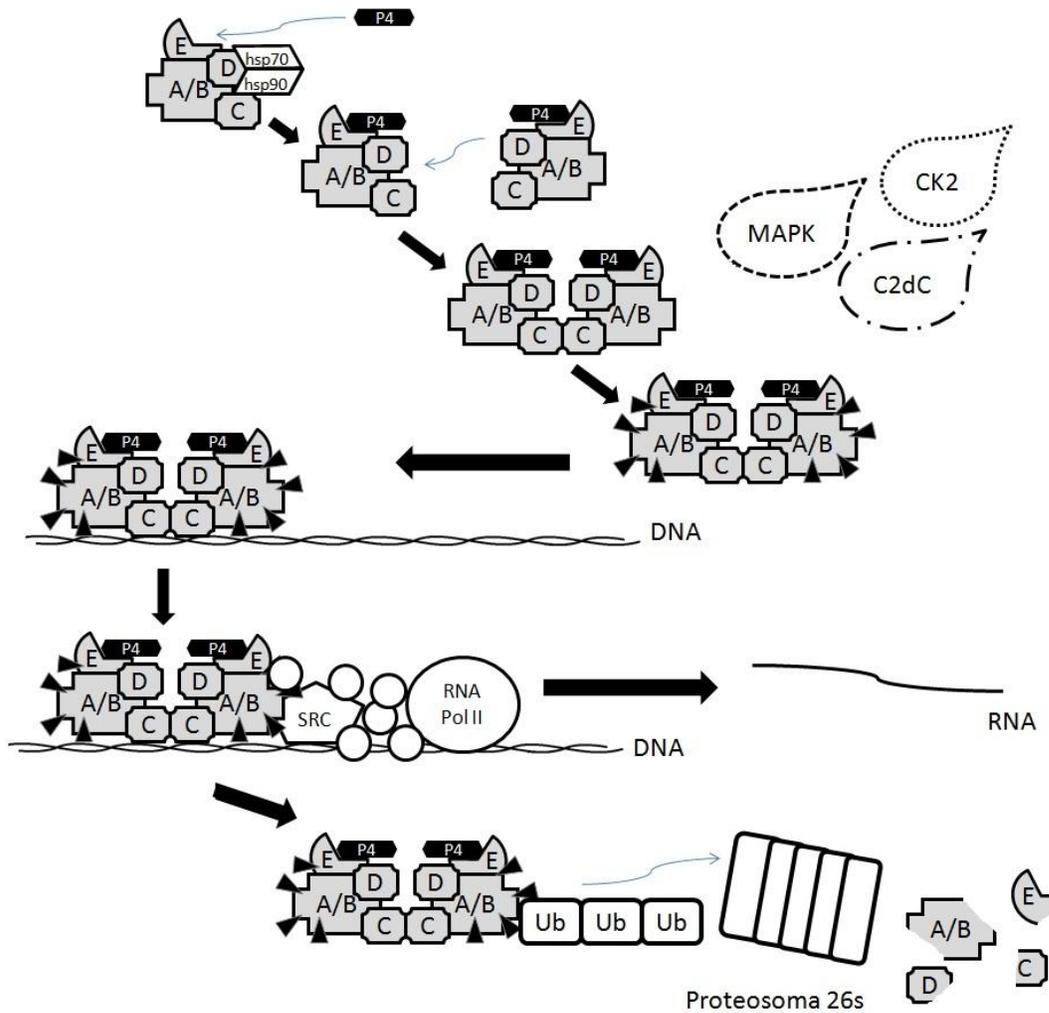


Figura 5. Esquema de la activación y fosforilación del RP. El RP inactivo se une a proteínas de choque térmico (hsp90 y hsp70), al unirse la P4 al RP éste se separa de las proteínas chaperonas para unirse a otro RP y formar un dímero. El dímero es fosforilado por cinasas como CK2, Cdc2 y MAPK , ya fosforilado el RP tiene actividad transcripcional y es degradado por le proteasoma 26S. A/B, C, D, E: Subunidades del RP, P4: Progesterona, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, CK2: Caseín Cinasa 2, C2dC: Cinasa 2 Dependiente de Ciclina, DNA: Ácido Desoxirribonucleico, SRC: Coactivador de Receptores Esteroides, RNA Pol II: RNapolimerasa, RNA: Ácido Ribonucleico, Ub: Ubiquitina.

3.2.3 RP y tumores cerebrales

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

Los astrocitomas son tumores compuestos de astrocitos neoplásicos, se localizan en cualquier parte del encéfalo especialmente en la corteza cerebral, microscópicamente tiene una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa. (Nguyen et al., 1984)

La OMS ha clasificado los astrocitomas en cuatro grados siguiendo criterios morfológicos, histológicos, capacidad de invasión y progresión de la siguiente forma:

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

Tabla 1. Grados de astrocitomas humanos. La tabla muestra las características de los diferentes astrocitomas dependiendo del grado del mismo (I - IV).

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

Los astrocitomas de grado III son multicelulares, células no uniformes, invaden los tejidos vecinos, presentan un notable pleomorfismo y anaplasia, con células multinucleadas y mitosis atípicas abundantes sin presentar extensas necrosis.

Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas pueden estar compuestos por diferentes tipos celulares como astrocitos, oligodendrocitos, presentan una rápida evolución, son malignos y están localizados preferentemente en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo. Llegan a medir 5 centímetros, presentan áreas hemorrágicas con células redondas pequeñas, ovoides hasta agregados celulares grandes. Existe secreción de factores estimulantes de proliferación de vasos sanguíneos (factores angiogénicos) y presentan además células con grandes cantidades de filamentos, desprovistas de desmosomas y nucléolos prominentes. Las personas que desarrollan este grado de tumor tienen pocas esperanzas de vida con una tasa de sobrevivencia menor a 1 año (Hullerman et al., 2005).

En un estudio realizado en pacientes que tenían astrocitoma grado IV el 100% de los tumores expresó al RP, mientras que solo el 83% de los tumores grado III lo expresó (Gonzalez-Aguero et al., 2001); lo anterior concuerda con otros informes en la literatura que señalan que la expresión del RP se relaciona directamente con la evolución de los astrocitomas, lo que sugiere que los tumores que expresan el RP presentan un alto índice de proliferación celular (Khalid et al., 1997). Se ha demostrado que las isoformas A y B del RP se expresan diferencialmente en astrocitomas humanos, siendo RP-B la isoforma predominante en astrocitomas grados III y IV, sin embargo, en células con la

isoforma RP-A sobre-expresada y tratadas con P4, no se observó el incremento en el número celular inducido por esta hormona en células silvestres. Esto sugiere que la función de la P4 sobre la proliferación celular de astrocitomas de grado III depende de la expresión de las isoformas del RP (Gonzalez-Agüero, 2001; Cabrera-Muñoz, 2009).

3.3 Proteína cinasa C

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

Las PKCs están formadas por: 1) Un dominio catalítico altamente conservado y 2) Un dominio regulador en el extremo amino-terminal con una región de pseudosustrato autoinhibidora que mantiene la enzima en una conformación inactiva, y dos módulos de unión a membrana llamados C1 y C2. (Steinberg, 2008; Rosse et al., 2010)

(Fig. 6).

Las PKC pueden ser clasificadas en 3 grupos dependiendo de sus regiones reguladoras: clásicas, nuevas y atípicas. Las PKCs clásicas (cPKC), PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ , son activadas por diacilglicerol (DAG), calcio, fosfatidilserina (PS) y compuestos sintéticos como los ésteres de forbol (el más utilizado es el TPA o PMA, 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato). Las PKC nuevas (nPKC), PKC σ , PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ , no requieren de calcio para activarse pero son reguladas por DAG y PS. Las PKC atípicas (aPKC), PKC ξ y PKC λ , son independientes de calcio y no requieren DAG para su activación, sin embargo, pueden ser activadas por ceramida, pero principalmente por interacciones proteína-proteína y por fosforilaciones (Fig. 6) (Mackay y Twelves, 2007; Steinberg, 2008).

Isoformas de PKC: Estructura de Dominios

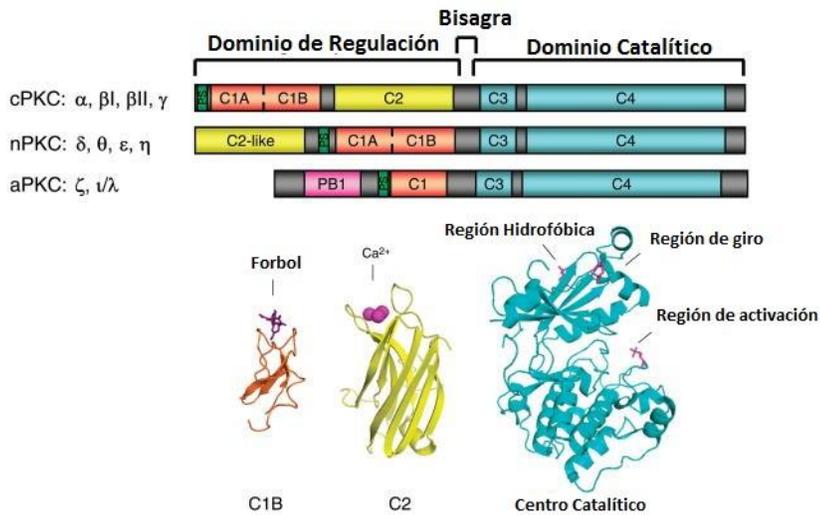


Figura 6. Estructura y familias de PKC. La parte superior de la figura muestra los dominios de las diferentes familias de PKC. Las PKCs clásicas (cPKCs) poseen una región de unión a DAG o TPA (C1A y C1B) y una región dependiente de calcio (C2), por otro lado, la región C2 de las PKCs nuevas (nPKCs) no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

Luego de su activación, las PKCs translocan a la membrana celular, de hecho en estudios preliminares se había considerado a ésta como una medida de activación en células. Las PKCs clásicas migran a la membrana de manera rápida mediante un mecanismo que involucra acumulación de DAG (debida a la fosfolipasa C, PLC), posteriormente, dependiendo de la célula y de la isoenzima, pueden ser liberadas de la membrana en un mecanismo dependiente de la actividad catalítica propia de la enzima (Steinberg, 2008).

La regulación de PKC no sólo depende de su translocación, también pueden ser controladas por fosforilaciones en residuos de serina/treonina muy

conservados de la región carboxilo terminal y en el caso participación de PKC δ en residuos de tirosina (Li, 1995; Soltoff, 1995; Denning, 1996), que afecten diversos aspectos de PKC como interacciones proteína-proteína, actividad o estabilidad (Newton, 1997); las PKCs también pueden ser sustratos de caspasas que generen un fragmento catalítico libre y un fragmento de autorregulación libre que afecte la actividad de otras PKC completas e incluso otras enzimas; finalmente, las PKC pueden ser activadas por cofactores lipídicos menos tradicionales como ceramida o ácido araquidónico (Steinberg, 2008).

Las PKCs poseen una amplia variedad de sustratos, por ello las rutas de transducción de señales juegan un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la sobrevivencia, la migración o la angiogénesis. Diferentes isoformas de PKC se han asociado a diferentes tipos de cáncer como el de colon, pulmón, mama, próstata y cerebro (Konopatskaya y Poole, 2009; Techasen et al., 2009). En gliomas las PKCs α , δ y ϵ se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos y al aumento en la expresión de oncogenes (Sarkar y Yong, 2009; Sharif y Sharif, 1999; Tomiyama et al., 2009). En células U373 (derivadas de astrocitomas humanos grado III) se han detectado las isoformas α , δ y ϵ de las PKC (Gonzalez-Arenas et al., 2006). La participación de esta familia de enzimas en la fosforilación y posterior degradación del RP no se ha estudiado.

IV. Justificación

A pesar de que ya se ha estudiado el efecto proliferativo de la P4 en líneas celulares de astrocitomas humanos y se han detectado las dos isoformas del RP tanto en astrocitomas humanos como en líneas derivadas de éstos y se ha relacionado la actividad de PKCs con diversos procesos proliferativos de gliomas, hasta el momento se desconoce el papel de las PKCs en la fosforilación y regulación del RP en los astrocitomas humanos.

V. Hipótesis

Si las isoformas del RP son fosforiladas por PKC, la activación de estas cinasas inducirá una disminución de las isoformas del RP.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Estudiar el papel de las PKCs sobre el contenido de las isoformas del receptor a progesterona (RP-A y RP-B) en la línea celular U373 derivada de astrocitoma humano grado III.

6.2 Particulares

- Caracterizar la degradación de las isoformas del RP por su ligando.
- Determinar la participación de la cinasa PKC en la degradación de las isoformas del RP inducida por su ligando.
- Caracterizar el efecto de activación de las PKC sobre el contenido de las isoformas de RP

VII. Materiales y métodos

7.1 Reactivos

Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM, In Vitro S. A.) con rojo fenol complementado con suero fetal bovino 10% (PAA), piruvato 1 mM (Gibco) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Gibco)

Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM, In Vitro S. A.) sin rojo fenol complementado con suero fetal bovino sin hormonas 10% (PAA), piruvato 1 mM (Gibco) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Gibco)

Estradiol soluble en agua acoplado a ciclodextrina (E2, Sigma) 10 nM

Progesterona soluble en agua acoplada a ciclodextrina (P4, Sigma) 10 nM

Estaurosporina (St, Sigma) 100 nM en DMSO (Dimetilsulfóxido) 10%

Ciclodextrina (Vehículo, Sigma) 30 nM

UO126 (Calbiochem) 100nM en DMSO 10%

TPA (12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato, Sigma) 1 μ M en DMSO 10%

Amortiguador RIPA: Tris- HCl (Baker) 50 mM, NaCl (Baker) 150 mM, SDS (dodecilsulfato de sodio, BioRad) 0.1 %, tritón x-100 (Sigma) 1 %, aprotinina (Sigma) 22 μ g/ml, PMSF (Fluoruro de fenilmetil sulfonilo, Sigma) 1 mM

Amortiguador de carga: Tris base (Baker) 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, Azul de bromofenol (Sigma), Glicerol (Sigma) 10%, 2- mercaptoetanol (BioRad) 5%

Amortiguador Tris (TBS): Tris base 0.05M, NaCl 0.15 M.

Anticuerpos: Anti-RP AB-13 (inducido en conejo, Thermo Scientific), Anti-RP AB-52 (inducido en ratón, Santa-Cruz), Anti- α -tubulina (inducido en ratón,

Neomarkers), Anti- Inmunoglobulinas de ratón y Anti – Inmunoglobulinas de conejo (Santa-Cruz).

7.2 Cultivo celular

La línea celular U373 se cultivó en medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM), con rojo fenol complementado con suero fetal bovino al 10%, piruvato 1 mM y aminoácidos no esenciales 0.1 mM en cajas de Petri hasta que alcanzaron el 80% de confluencia a 37°C y CO₂ al 5%. El medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin rojo fenol y con suero fetal bovino libre de hormonas 24 h antes de cada experimento.

7.3 Caracterización de la degradación de las isoformas del RP dependiente de ligando.

Las células cultivadas en las condiciones antes mencionadas se trataron con ciclodextrina (Vehículo, V) o estradiol 10 nM (E2) para inducir la expresión del RP durante 48 horas. Posteriormente las células se trataron con P4 10 nM y las células se colectaron a los siguientes tiempos: 0, 5, 15, 30, 60, 180 y 300 min.

7.4 Determinación de la participación de PKC sobre la degradación del RP inducida por su ligando.

A las células cultivadas en las condiciones mencionadas en el apartado 7.1 se añadió ciclodextrina (Vehículo, V) o estradiol 10 nM (E2) para inducir la expresión del RP durante 48 horas. Posteriormente las células se trataron con el inhibidor general de PKCs estaurosporina (St, 100 nM en DMSO 10%), con el inhibidor de MAPKs UO126 (100 nM en DMSO 10%), o bien con ambos inhibidores durante 30 min. Posteriormente se cambió el medio por DMEM fresco y se trataron con P4 10 nM. Las células se recolectaron a las 5 horas, tiempo en el que la degradación del RP por P4 se observó en el experimento I.

7.5 Caracterización del efecto de activación de PKCs sobre el contenido de las isoformas del RP.

A las células cultivadas en las condiciones mencionadas en el apartado 7.1 se añadió ciclodextrina (Vehículo, V) o estradiol 10 nM (E2) para inducir la expresión del RP durante 48 horas. Posteriormente las células se trataron con el activador general de PKCs TPA (12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato, 1 μ M en DMSO 10%) durante 5 min. Transcurrido el tiempo se lavaron las células y se colocaron en medio fresco hasta la recolección a los 0, 15, 30, 60, 180 y 300 min después de la activación de PKC por TPA.

Además, se utilizó un tratamiento con estaurosporina como control. Las células se trataron con estaurosporina (100 nM en DMSO 10%) durante 30 min. Después de lavar se colocó medio fresco y se trataron con TPA durante 5 min, después el medio se retiró y se reemplazó con medio fresco. Las células se colectaron 30 min después del tratamiento con TPA.

7.6 Extracción de proteínas totales

Después de los tratamientos las células se lisaron con amortiguador RIPA (Tris- HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1 %, tritón x-100 1 %, aprotinina 22 μ g/ml, PMSF 1 mM). Las proteínas totales se separaron por centrifugación (Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor Eppendorf F45-30-11) a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min y se cuantificaron por el método de Bradford.

7.7 Western blot

Se separaron 70 μ g de proteínas totales en amortiguador de carga (Tris 0.5M pH 6.8, SDS 10%, Azul de bromofenol, Glicerol 10%, 2- mercaptoetanol 5%) en un gel de poliacrilamida con SDS 7.5% a 20 mA. Se utilizaron para determinar el tamaño de las bandas marcadores de peso molecular preteñidos. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semihúmeda durante 5

horas a 40 mA por gel. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0.1% durante toda la noche.

Las membranas se incubaron con una mezcla de anticuerpos que reconocen a ambas isoformas del RP (anti RP inducido en conejo, 3.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y anti RP inducido en ratón, 0.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se colocaron con los anticuerpos secundarios contra conejo y ratón conjugados a peroxidasa durante una hora. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min con TBS – Tween 0.1%.

Se utilizó la proteína α -tubulina como control de carga ya que no se altera por los tratamientos. Las membranas se trataron con glicina ácida para quitar el anticuerpo anti-RP, posteriormente se lavaron con TBS durante 20 min antes de ser bloqueadas de la manera antes mencionada. Posteriormente se incubaron con anticuerpo policlonal de ratón contra α -tubulina durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa durante una hora. Posteriormente se realizaron los lavados de la manera antes mencionada.

La identificación de las proteínas se realizó por autoradiografía y se reveló por quimioluminiscencia.

7.8 Análisis de resultados

Los resultados son expresados como media \pm ES, la n de cada experimento se indica en la figura correspondiente.

Finalmente se realizó el análisis estadístico utilizando una ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni von $p < 0.05$.

VIII. Resultados

8.1 Caracterización de la degradación de las isoformas del RP dependiente de ligando.

Se realizó un control para observar a qué tiempo la P4 induce la degradación de su receptor; células en medio DMEM sin rojo fenol complementado con suero fetal bovino sin hormonas fueron tratadas con E2 10 nM para inducir la expresión del RP y posteriormente con P4 10 nM. Luego del tratamiento con P4 las células se colectaron a los 0, 15, 30, 60, 180 y 300 min. Se observó una disminución significativa del contenido de ambas isoformas del RP a los 300 min del tratamiento con P4 10 nM, lo que indica que la P4 induce la degradación de su receptor intracelular y que ésta degradación es significativa 5 horas después del tratamiento con su ligando.

En la figura 7 se representa los resultados obtenidos después del tratamiento con P4 para la isoforma A y B del RP.

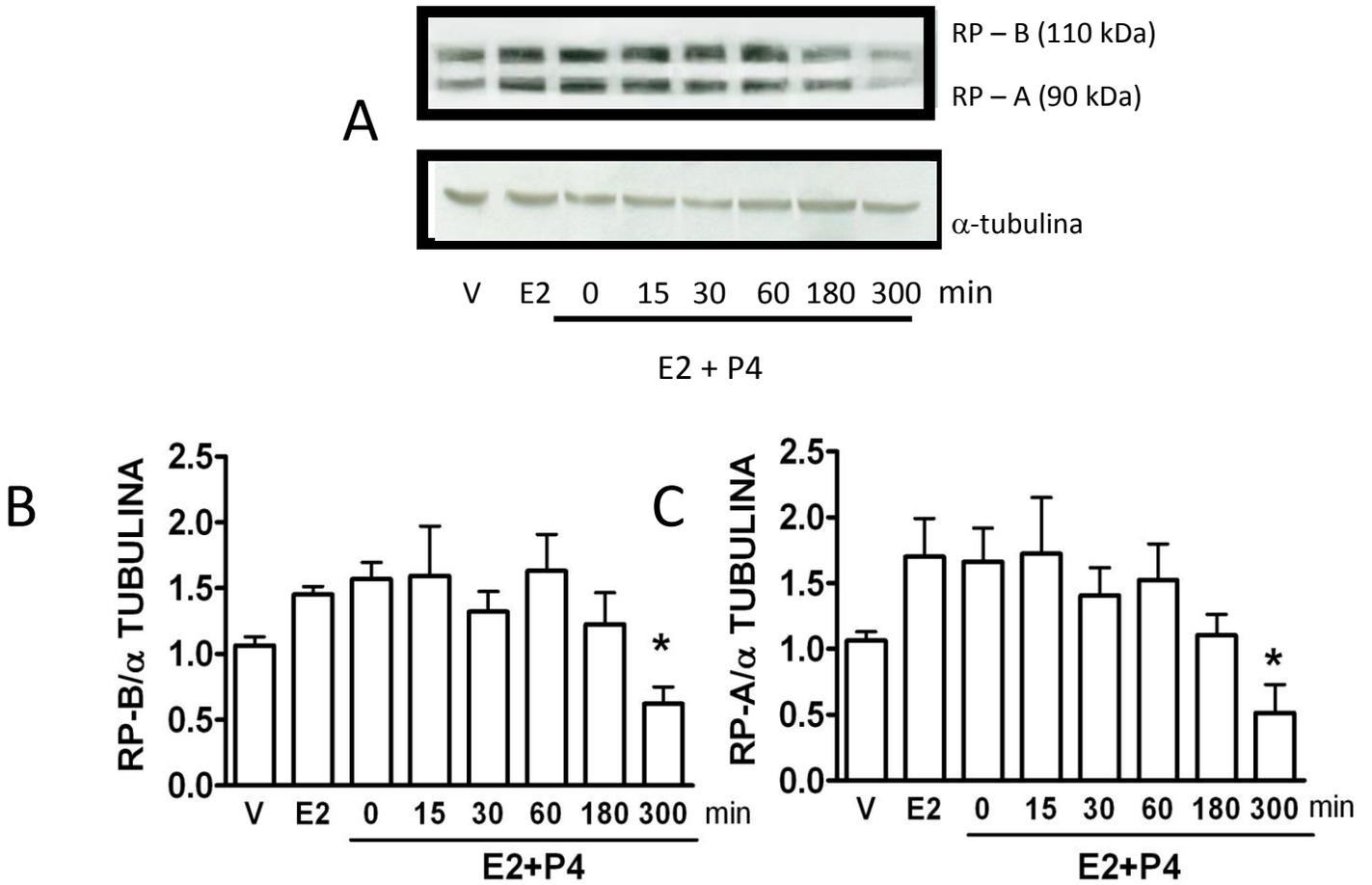


Figura 7. Degradación del RP dependiente de ligando. Las células U373 se trataron con vehículo (V, ciclodextrina 30 nM), E2 10 nM y P4 10 nM durante 0, 15, 30, 60, 180 y 300 min. En el panel A se representa un Western blot representativo de 3 experimentos en donde se aprecian las isoformas del RP y la α - tubulina utilizada como control de carga. En los paneles B y C se presentan las densitometrías de los resultados obtenidos (n=3), los cuales están normalizados a 1 con respecto al vehículo. (* $p < 0.05$ vs todos los grupos)

8.2 Determinación de la participación de PKC en la degradación de las isoformas del RP inducida por su ligando.

Posteriormente, se buscó evaluar el papel de PKC en la degradación de las isoformas del RP por su ligando. Para lo anterior, se utilizaron inhibidores generales de MAPK (UO126) y de PKC (Estaurosporina, St) antes de tratar las células con P4. Dado que las MAPKs 44 y 42 son cinasas que fosforilan al RP induciendo su degradación, se utilizaron estas proteínas como control de degradación del receptor. Las células U373 en medio DMEM sin rojo fenol complementado con suero fetal bovino sin hormonas se trataron con E2 10 nM para inducir la expresión del RP y posteriormente con UO126 100 nM y/o St 100 nM durante 30 min. Transcurrido el tiempo se colocó medio nuevo y se añadió P4 10 nM. Luego del tratamiento con P4 las células se recolectaron a los 300 min.

En las células tratadas con los inhibidores no se aprecia la disminución en el contenido de ambas isoformas del RP observada en la ausencia de éstos (Fig. 8). El tratamiento conjunto con UO y St no tuvo en efecto aditivo sobre el contenido de las isoformas del RP.

La figura 8 representa los resultados obtenidos para las isoformas del RP después del tratamiento conjunto de P4 previa exposición con o sin los inhibidores de las cinasas MAPK y PKC, UO126 y St, respectivamente.

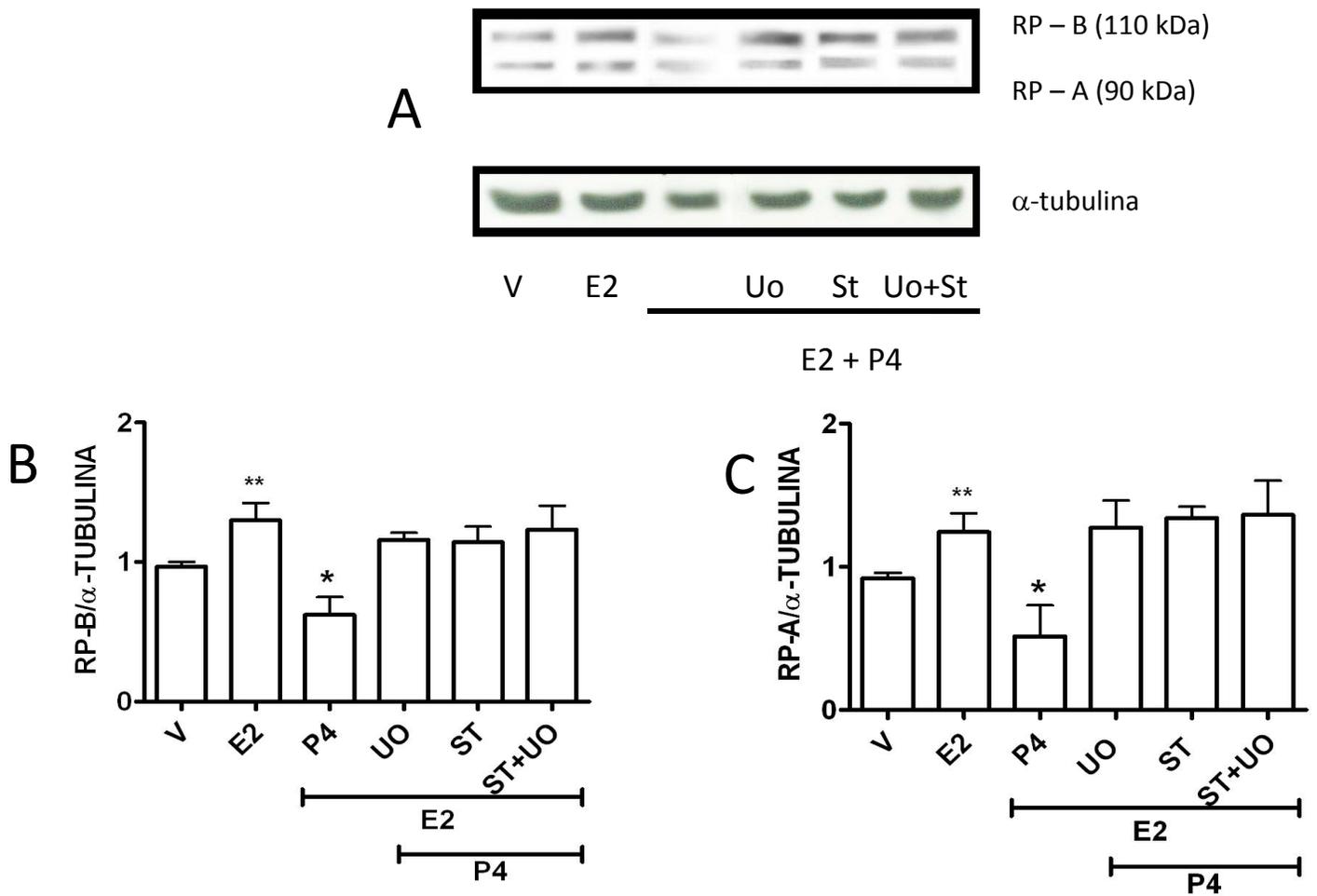


Figura 8. Papel de MAPK y de PKC en la degradación del RP por su ligando. Las células U373 tratadas con vehículo (V, ciclodextrina), E2 y P4 con los inhibidores de PKC (St 100 nM) o de MAPK (UO126 100 nM) durante 30 min antes de ser tratados con P4 durante 300 min. En el panel A se presenta un Western blot representativo en donde se aprecian en la parte superior las isoformas del RP y en la parte inferior la α -tubulina utilizada como control de carga. En los paneles B y C se presentan las densitometrías de los resultados obtenidos (n=3) normalizados a 1 con respecto al vehículo (* p < 0.05 vs todos los grupos excepto V, ** p < 0.05 vs V).

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

Finalmente, se buscó evaluar el efecto de la activación de PKC en la degradación de las isoformas del RP. Para esto, se utilizó al activador general de PKC (TPA) para observar si al aumentar la actividad de estas cinasas también aumentaba la degradación del RP. Las células en medio DMEM sin rojo fenol complementado con suero fetal bovino sin hormonas se trataron con E2 10 nM para inducir la expresión del RP y posteriormente con TPA 1 μ M durante 5 min. Transcurrido el tiempo se colocó medio nuevo y las células se colectaron a los 0, 15, 30, 60 y 180 min. Se realizó un control con el inhibidor de PKC (St) para evaluar si PKC es el responsable de la degradación. Después del tratamiento con E2, se añadió al medio St 100 nM durante 30 min, después de cambiar el medio se trataron con TPA 1 μ M durante 5 min, posteriormente se colocó medio nuevo, finalmente se colectaron las células después de 30 min.

Se observó una disminución en el contenido del RP desde el tiempo 0, es decir, inmediatamente después de los 5 minutos de tratamiento con TPA (Fig. 9). Sin embargo se observó diferencia significativa para ambas isoformas a los 15 y 30 min después de la activación de PKC por TPA. Se observó que el contenido de ambas isoformas incrementa nuevamente a partir de 60 min. En cuanto al control, se observa que al inhibir PKC con St, el contenido del RP es semejante al presente con el tratamiento de E2 (Fig 9).

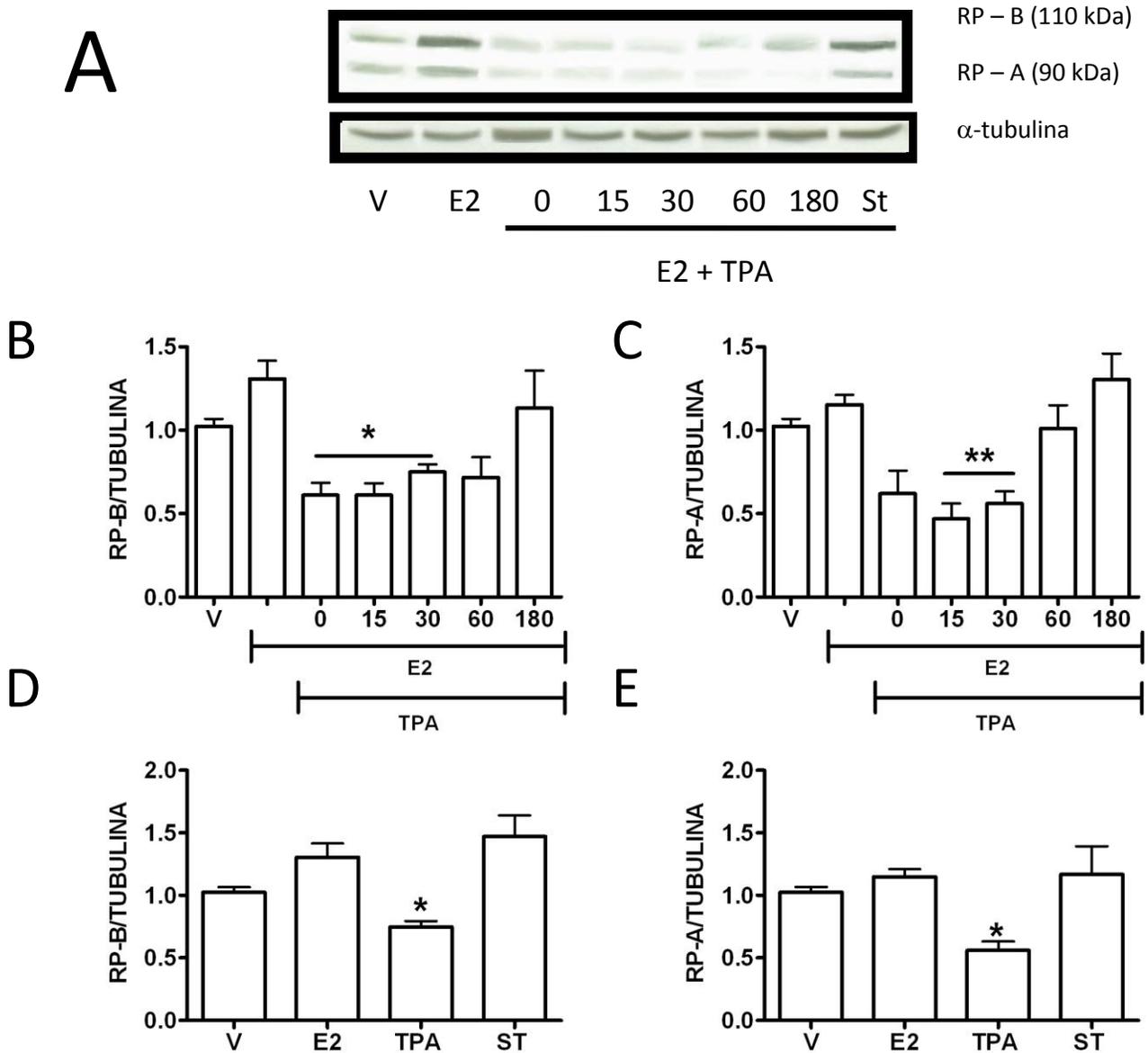


Figura 9. Degradación del RP por activación de PKC. Las células U373 se trataron con vehículo (V, ciclodextrina), E2 y con el activador de PKC (TPA) 1 μ M 5 min, después de la activación de PKC se retiró el medio y se colocó nuevo medio hasta la recolección de las células a los 0, 15, 30, 60, 180 y 300 min. En el panel A se presenta un Western Blot representativo en donde se aprecian en la parte superior las isoformas del RP y en la parte inferior la α -tubulina utilizada como control de carga. En los paneles B, C, D y E se presentan las densitometrías de los resultados obtenidos (n=3). Los paneles B y C corresponden al contenido del RP al activar a PKC a los tiempos indicados. Los paneles D y E presentan los resultados del control utilizado, las células se trataron con vehículo (V, ciclodextrina), E2, con el activador de PKC (TPA) 1 μ M 5 min y recolectadas a los 30 min y con el inhibidor de PKC (St) durante 30 min antes de tratar con TPA en las condiciones mencionadas y recolectadas a los 30 min. Los resultados están normalizados a 1 con respecto al vehículo (* $p < 0.05$ vs todos los grupos, ** $p < 0.05$ vs todos los grupos excepto 0)

IX. Discusión

En el presente trabajo se estudió el papel de las PKCs sobre el contenido del RP en la línea celular U373, derivada de astrocitomas humanos grado III. Como ya se mencionó, la P4 regula diferentes funciones en esta línea celular a través de su receptor, como el número celular por ejemplo. Para que el RP sea activo debe interactuar con su ligando, formar dímeros y fosforilarse. La fosforilación del RP es necesaria para que éste se una a los elementos de respuesta a P4 e inicie la transcripción de genes blanco, sin embargo, esta fosforilación también induce la poliubiquitinación del receptor, marcándolo para ser degradado por el proteosoma 26S. La fosforilación del receptor es clave para la regulación de su actividad. Como primer objetivo se buscó determinar el tiempo en el que se observa una disminución significativa en el contenido del RP después del tratamiento con P4. Se observó una disminución en el contenido del RP a los 300 min post tratamiento con P4; Lange y colaboradores reportan que en células de cáncer de mama, la degradación del receptor inducida por la progestina R5020 ocurre desde 4 las hasta las 12 horas (Lange et al. 2000). Posteriormente se buscó evaluar la participación de la familia de cinasas PKC en la degradación del RP inducida por su ligando.

Las PKCs son cinasas involucradas en una gran variedad de fenómenos tanto fisiológicos como patológicos. En diferentes tipos de cáncer se ha observado que participan de manera importante induciendo la migración de las células. Particularmente en glioma, se ha observado que isoformas específicas de PKC participan activamente en la invasión y migración de las células. El papel que desarrolla PKC en la proliferación, migración o invasividad de esta línea celular no ha sido caracterizado. Mediante el programa KinasePhos se detectaron sitios en los cuales el RP que podría ser fosforilado por PKC; para comprobar la participación de PKC en la fosforilación y degradación del RP se trataron células con St, inhibidor de PKC y posteriormente con P4. Por otro lado, se ha reportado que MAPK fosforila al RP en la Ser²⁹⁴ induciendo su degradación (Lange et al. 2000). Por lo anterior, se trataron células con el inhibidor de estas cinasas

(UO126) para comprobar si el modelo utilizado era el apropiado. No se observó degradación del RP al tratar las células con UO126 a pesar del tratamiento posterior con P4, esto indica que MAPK no puede fosforilar al receptor y por lo tanto no es degradado. Esto concuerda con lo reportado previamente, lo que indica que el modelo utilizado es adecuado. Además, al tratar las células con St y P4 tampoco se observó degradación del RP, incluso se observó un contenido del RP que no tiene diferencia significativa con el de las células tratadas con UO 126. Finalmente al comparar los tratamientos que inhiben a ambas cinasas tanto por separado como en conjunto se observa que los efectos en la degradación son muy similares y no se observa un efecto aditivo entre las dos vías de fosforilación, lo que sugiere que son vías diferentes de regulación del RP

El hecho de que la inhibición de PKC disminuya la degradación del RP por su ligando indica que PKC puede ser activada por P4 mediante mecanismos que pueden o no involucrar al RP. Una vez comprobado que PKC participa en la fosforilación del RP en esta línea celular, se determinó el efecto de la activación directa de PKC por TPA (un éster de forbol que activa a PKCs) sobre el contenido del RP. Células U373 fueron tratadas con TPA durante 5 min y fueron colectadas a diferentes tiempos después de dicho tratamiento. Se observó que la activación de PKCs disminuyó el contenido de ambas isoformas del RP, a los 15 min, tiempo mucho menor al observado con el tratamiento con P4 (300 min). Esto sugiere que la P4 activa a PKC mediante un mecanismo que aún no puede detallarse y esta cinasa fosforila al RP induciendo su degradación; sin embargo, al activar de manera directa a PKC, sin necesidad de activar una cascada de señalización, esta cinasa puede fosforilar a sus sustratos de manera más rápida. Se realizó un control para observar si la activación de PKCs era la responsable de esta degradación, utilizando al inhibidor de PKCs (St) previo al tratamiento con TPA. El tratamiento conjunto de St y TPA no reflejó diferencias con respecto al tratamiento con E2, pero sí con el tratamiento con TPA, lo que indica que la activación de PKC disminuye de manera significativa el contenido de las isoformas del RP.

En conjunto, los resultados anteriores indican que PKC participa en la fosforilación y posterior degradación del RP, y que PKC podría activarse por P4. Los mecanismos de la activación de PKC por P4 no han sido estudiados, de igual manera los resultados no permiten determinar en qué residuos se fosforila el RP por PKC.

XI. Conclusiones

Los resultados en conjunto indican que en células U373 la P4 induce la degradación de su receptor intracelular 5 horas después de su adición.

La activación de PKC regula la degradación de las isoformas del RP por su ligando.

X. Perspectivas

- Determinar en qué residuo (Ser⁴⁰⁰ o Thr⁴³⁰) PKC fosforila al RP.
- Identificar la o las isoformas de PKC presentes en esta línea celular que participen en esta fosforilación.
- Evaluar los efectos tanto de P4 como de PKC en procesos relacionados con la malignidad de estas células.

XIII. Referencias

Arbogast, L. A. y J. L. Voogt (2002) Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*. **75**, 273-81.

Backstrom, T., L. Andreen, V. Birzniece, I. Bjorn, I. M. Johansson, M. Nordenstam-Haghjo, S. Nyberg, I. Sundstrom-Poromaa, G. Wahlstrom, M. Wang y D. Zhu (2003) The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome. *CNS Drugs*. **17**, 325-42.

Backstrom, T., B. Zetterlund, S. Blom y M. Romano (1984) Effects of intravenous progesterone infusions on the epileptic discharge frequency in women with partial epilepsy. *Acta Neurol Scand*. **69**, 240-8.

Beck, C. A., N. L. Weigel y D. P. Edwards (1992) Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol*. **6**, 607-20.

Beyenburg, S., B. Stoffel-Wagner, J. Bauer, M. Watzka, I. Blumcke, F. Bidlingmaier y C. E. Elger (2001) Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res*. **44**, 141-53.

Cabrera-Munoz, E., A. Gonzalez-Arenas, M. Saqui-Salces, J. Camacho, F. Larrea, R. Garcia-Becerra y I. Camacho-Arroyo (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **113**, 80-4.

Callier, S., M. Morissette, M. Grandbois, D. Pelaprat y T. Di Paolo (2001) Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse*. **41**, 131-8.

Camacho-Arroyo, I., A. Gonzalez-Arenas, G. Gonzalez-Aguero, C. Guerra-Araiza y G. Gonzalez-Moran (2003) Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **136**, 447-52.

Camacho-Arroyo, I., S. T. Mendez-Cruz, C. Guerra-Araiza y M. A. Cerbon (1998) Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol*. **157**, 71-4.

Camacho-Arroyo, I., A. M. Pasapera y M. A. Cerbon (1996) Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett.* **214**, 25-8.

Camacho-Arroyo, I., A. M. Pasapera, G. Perez-Palacios y M. A. Cerbon (1995) [Progesterone and its metabolites in central nervous system function]. *Rev Invest Clin.* **47**, 329-40.

Camacho-Arroyo, I., O. Villamar-Cruz, A. Gonzalez-Arenas y C. Guerra-Araiza (2002) Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology.* **76**, 267-71.

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

Conneely, O. M. y B. M. Jericevic (2002) Progesterone regulation of reproductive function through functionally distinct progesterone receptor isoforms. *Rev Endocr Metab Disord.* **3**, 201-9.

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

Denner, L. A., N. L. Weigel, B. L. Maxwell, W. T. Schrader y B. W. O'Malley (1990) Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science.* **250**, 1740-3.

Denning, M. F., A. A. Dlugosz, D. W. Threadgill, T. Magnuson y S. H. Yuspa (1996) Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J Biol Chem.* **271**, 5325-31.

Engel, S. R., R. H. Purdy y K. A. Grant (2001) Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone. *J Pharmacol Exp Ther.* **297**, 489-95.

Etgen, A. M., M. A. Ansonoff y A. Quesada (2001) Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology. *Horm Behav.* **40**, 169-77.

Felix, C. A., I. Slavic, M. Dunn, E. A. Strauss, P. C. Phillips, L. B. Rorke, L. Sutton, G. R. Bunin y J. A. Biegel (1995) p53 gene mutations in pediatric brain tumors. *Med Pediatr Oncol.* **25**, 431-6.

Freeman, E. W., C. A. Frye, K. Rickels, P. A. Martin y S. S. Smith (2002) Allopregnanolone levels and symptom improvement in severe premenstrual syndrome. *J Clin Psychopharmacol.* **22**, 516-20.

Fujimoto, J., S. Ichigo, R. Hirose, H. Sakaguchi y T. Tamaya (1997) Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **62**, 449-54.

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

Giangrande, P. H. y D. P. McDonnell (1999) The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res.* **54**, 291-313; discussion 313-4.

Gomez, C., A. Saldivar-Gonzalez, G. Delgado y R. Rodriguez (2002) Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* **72**, 543-50.

Gonzalez-Aguero, G., A. A. Gutierrez, D. Gonzalez-Espinosa, J. D. Solano, R. Morales, A. Gonzalez-Arenas, E. Cabrera-Munoz y I. Camacho-Arroyo (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine.* **32**, 129-35.

Gonzalez-Aguero, G., R. Ondarza, A. Gamboa-Dominguez, M. A. Cerbon y I. Camacho-Arroyo (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull.* **56**, 43-8.

Gonzalez-Arenas, A., B. Aguilar-Maldonado, S. E. Avendano-Vazquez y J. A. Garcia-Sainz (2006) Estrogens cross-talk to alpha1b-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol.* **70**, 154-62.

González-Arenas, A. y T. Hernández-Hernández (2011) *Papel de la progesterona y de sus receptores en la proliferación celular de astrocitomas humanos*, UAM-PUIS, México, DF

Gonzalez-Arenas, A., O. Villamar-Cruz, C. Guerra-Araiza y I. Camacho-Arroyo (2003) Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **85**, 25-31.

Gore-Langton, R. E. (1988) Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* **57**, 187-98.

Graham, J. D. y C. L. Clarke (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* **18**, 502-19.

Guerra-Araiza, C., O. Villamar-Cruz, A. Gonzalez-Arenas, R. Chavira y I. Camacho-Arroyo (2003) Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol.* **15**, 984-90.

Hulleman, E. y K. Helin (2005) Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res.* **94**, 1-27.

Ignar-Trowbridge, D. M., K. G. Nelson, M. C. Bidwell, S. W. Curtis, T. F. Washburn, J. A. McLachlan y K. S. Korach (1992) Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 4658-62.

Kastner, P., A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer y P. Chambon (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9**, 1603-14.

Kazmi, S. M., V. Visconti, R. K. Plante, A. Ishaque y C. Lau (1993) Differential regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated trans-activation by phosphorylation. *Endocrinology.* **133**, 1230-8.

Khalid, H., S. Shibata, M. Kishikawa, A. Yasunaga, M. Iseki y T. Hiura (1997) Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer.* **80**, 2133-40.

Knotts, T. A., R. S. Orkiszewski, R. G. Cook, D. P. Edwards y N. L. Weigel (2001) Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem.* **276**, 8475-83.

Konopatskaya, O. y A. W. Poole (2009) Protein kinase Calpha: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci.* **31**, 8-14.

Lange, C. A. (2004) Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol.* **18**, 269-78.

Lange, C. A., T. Shen y K. B. Horwitz (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 1032-7.

Li, W., J. C. Yu, D. Y. Shin y J. H. Pierce (1995) Characterization of a protein kinase C-delta (PKC-delta) ATP binding mutant. An inactive enzyme that competitively inhibits wild type PKC-delta enzymatic activity. *J Biol Chem.* **270**, 8311-8.

Liu, Z., J. Wong, S. Y. Tsai, M. J. Tsai y B. W. O'Malley (2001) Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 12426-31.

Mackay, H. J. y C. J. Twelves (2007) Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer.* **7**, 554-62.

Medina, V. M., M. E. Dawson-Basoa y A. R. Gintzler (1993) 17 beta-estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: relevance to the analgesia of pregnancy. *Neuroendocrinology.* **58**, 310-5.

Melcangi, R. C., V. Magnaghi, M. Galbiati y L. Martini (2001) Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int Rev Neurobiol.* **46**, 145-76.

Murphy, L. J., R. L. Sutherland, B. Stead, L. C. Murphy y L. Lazarus (1986) Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* **46**, 728-34.

Musgrove, E. A., J. A. Hamilton, C. S. Lee, K. J. Sweeney, C. K. Watts y R. L. Sutherland (1993) Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* **13**, 3577-87.

Musgrove, E. A., C. S. Lee y R. L. Sutherland (1991) Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol.* **11**, 5032-43.

- Newton, A. C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 161-7.
- Nguyen, J. P., J. P. Caron, A. Gaston, F. Louarn y J. Poirier (1984) [Anatomo-radiological correlations in astrocytic cerebral tumors]. *Neurochirurgie.* **30**, 11-5.
- Nilsen, J. y R. D. Brinton (2002) Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology.* **143**, 205-12.
- Pierson-Mullany, L. K. y C. A. Lange (2004) Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol Cell Biol.* **24**, 10542-57.
- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge y M. J. Garabedian (1999) Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem.* **274**, 22296-302.
- Rosse, C., M. Linch, S. Kermorgant, A. J. Cameron, K. Boeckeler y P. J. Parker (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**, 103-12.
- Rowan, B. G., N. L. Weigel y B. W. O'Malley (2000) Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* **275**, 4475-83.
- Rupprecht, R. y P. Zwanzger (2003) [Significance of GABAA receptors for the pathophysiology and therapy of panic disorders]. *Nervenarzt.* **74**, 543-51.
- Sarkar, S. y V. W. Yong (2010) Reduction of protein kinase C delta attenuates tenascin-C stimulated glioma invasion in three-dimensional matrix. *Carcinogenesis.* **31**, 311-7.
- Schumacher, M., H. Coirini, F. Robert, R. Guennoun y M. El-Etr (1999) Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res.* **105**, 37-52.
- Sharif, T. R. y M. Sharif (1999) Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J Oncol.* **15**, 237-43.
- Shen, T., K. B. Horwitz y C. A. Lange (2001) Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by

mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol.* **21**, 6122-31.

Sheridan, P. L., R. M. Evans y K. B. Horwitz (1989) Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem.* **264**, 6520-8.

Soltoff, S. P. y A. Toker (1995) Carbachol, substance P, and phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in salivary gland epithelial cells. *J Biol Chem.* **270**, 13490-5.

Steinberg, S. F. (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* **88**, 1341-78.

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

Takimoto, G. S., A. R. Hovland, D. M. Tasset, M. Y. Melville, L. Tung y K. B. Horwitz (1996) Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem.* **271**, 13308-16.

Tata, J. R. (2002) Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 702-10.

Techasen, A., W. Loilome, N. Namwat, E. Takahashi, E. Sugihara, A. Puapairoj, M. Miwa, H. Saya y P. Yongvanit (2009) Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation promotes cholangiocarcinoma cell migration and metastasis via the protein kinase C-dependent pathway. *Cancer Sci.* **101**, 658-65.

Tomiya, T., J. H. Kang, R. Toita, T. Niidome y Y. Katayama (2009) Protein kinase Calpha-responsive polymeric carrier: its application for gene delivery into human cancers. *Cancer Sci.* **100**, 1532-6.

Tsai, M. J. y B. W. O'Malley (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* **63**, 451-86.

Turgeon, J. L. y D. W. Waring (2000) Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology.* **141**, 3422-9.

Valenzuela, J. I., S. J. Hasan y J. D. Steeves (1990) Stimulation of the brainstem reticular formation evokes locomotor activity in embryonic chicken (in ovo). *Brain Res Dev Brain Res.* **56**, 13-8.

Villamar-Cruz, O., J. Manjarrez-Marmolejo, R. Alvarado y I. Camacho-Arroyo (2006) Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull.* **69**, 276-81.

Weigel, N. L. (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J.* **319 (Pt 3)**, 657-67.

Yang, Y. y X. Yu (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *Faseb J.* **17**, 790-9.

Zhang, Y., C. A. Beck, A. Poletti, J. P. t. Clement, P. Prendergast, T. T. Yip, T. W. Hutchens, D. P. Edwards y N. L. Weigel (1997) Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol.* **11**, 823-32.

Zhang, Y., C. A. Beck, A. Poletti, D. P. Edwards y N. L. Weigel (1994) Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem.* **269**, 31034-40.

Zhang, Y., C. A. Beck, A. Poletti, D. P. Edwards y N. L. Weigel (1995) Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* **9**, 1029-40.

Zwain, I. H. y S. S. Yen (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* **140**, 3843-52.