



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

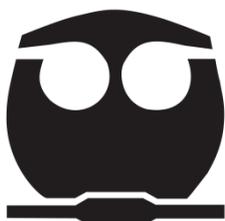
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PKC EN LOS PROCESOS DE  
PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE ASTROCITOMAS HUMANOS, MEDIADOS  
POR EL RECEPTOR A PROGESTERONA.**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**GONZÁLEZ JORGE JESÚS**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Aliesha Araceli González Arenas

**VOCAL:** Profesor: Olivia Tania Hernández Hernández

**SECRETARIO:** Profesor: Carolina Guzmán Arriaga

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Edith Araceli Cabrera Muñoz

**2° SUPLENTE:** Profesor: Carolina Álvarez Delgado

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**SUSTENTANTE (S):** González Jorge Jesús

Este proyecto fue financiado por el CONACyT con el número CB-2009-132037

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
<b>3. Antecedentes</b>	
3.1 Tumores cerebrales .....	4
3.2 Progesterona, estructura y mecanismo de acción.....	5
3.3 Receptor a progesterona (RP).....	8
3.3.1 Isoformas del RP.....	9
3.3.2 Fosforilación del RP.....	10
3.4 RP y astrocitomas.....	14
3.5 Proteína cinasa C (PKC).....	15
3.6 RP, PKC y astrocitomas.....	17
<b>4. Planteamiento del problema</b> .....	18
<b>5. Hipótesis</b> .....	18
<b>6. Objetivos</b>	
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos particulares.....	19
<b>7. Materiales y métodos</b>	
7.1 Cultivo celular .....	19
7.2 Tratamientos.....	19
7.3 Evaluación de la activación de la PKC en la proliferación mediada por el RP en astrocitomas humanos.....	20
7.4 Evaluación del papel de la PKC en la migración mediada por el RP en astrocitomas humanos.....	21
7.5 Porcentaje de co-localización del RP y de la PKC $\alpha$ en biopsias de	

pacientes con astrocitomas grado IV.....	21
7.6 Análisis estadístico .....	22
<b>8. Resultados</b>	
8.1 Evaluación de la activación de la PKC en la proliferación mediada por el RP en astrocitomas humanos.....	23
8.2 Evaluación del papel de la PKC en la migración mediada por el RP en astrocitomas humanos. ....	25
8.3 Porcentaje de colocalización del RP y de la PKC $\alpha$ en biopsias de pacientes con astrocitomas grado IV.....	27
<b>9. Discusión</b> .....	29
<b>10. Conclusiones</b> .....	32
<b>11. Referencias</b> .....	32

## 1. Resumen

La progesterona (P4) y sus receptores intracelulares (RP) participan en la regulación de diversos procesos en el Sistema Nervioso Central (SNC) incluido el crecimiento de tumores cerebrales como los astrocitomas. Los tumores cerebrales más comunes son los de tipo primario y de éstos los astrocitomas son los más frecuentes (69%) y se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral. El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de diversos genes blanco de la P4. Este receptor tiene 2 isoformas RP-A y RP-B que interactúan con la P4 formando un complejo con alta afinidad al DNA que favorece la transcripción de genes. La fosforilación del RP en sitios específicos regula su actividad transcripcional. Distintos trabajos han demostrado la participación de diferentes cinasas en la fosforilación del RP. Se ha detectado por experimentos realizados en nuestro laboratorio que el residuo serina 400 (Ser400) podría ser fosforilado por la proteína cinasa C (PKC). Las PKCs representan a una familia de serina-treonina cinasas, que tienen un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación, la diferenciación celular, la migración y la angiogénesis. En gliomas las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos, así como al aumento en la expresión de oncogenes. En células U373 (derivadas de astrocitomas humanos grado III) se han detectado estas isoformas de PKC.

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, a través del RP, modifica la proliferación celular de las líneas U373 y D54 derivadas de astrocitomas humanos grados III y IV respectivamente.

Recientemente en el laboratorio se demostró en células U373 que la activación de PKC con un éster de forbol (TPA) aumenta la fosforilación del RP en el residuo serina 400 y que esta fosforilación aumenta su actividad transcripcional además de marcarlo para una subsecuente degradación por la vía del proteosoma 26S. Las PKC  $\alpha$  y  $\delta$  son las isoformas que participan en el aumento de la fosforilación del RP y en su degradación. También se observó una asociación basal de PKC $\alpha$  con el RP, que aumentó a los 5 minutos de

tratamiento con TPA; se detectaron ambas proteínas tanto en citoplasma como en núcleo.

En este proyecto se evaluó la actividad de la PKC en la proliferación de células U373 utilizando ensayos de incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU). Se observó que la activación de PKC induce la proliferación en las células a las 24 horas (h) después de ser activada directamente por TPA, además la inducción en la proliferación disminuyó al inhibir al RP. También se evaluó el papel de la PKC en el proceso de migración, donde se observó que al activar esta enzima con TPA favorece la migración a las 24 y 48 h, así mismo este efecto se ve disminuido al inhibir al RP. Por último se determinó que existe colocalización de PKC $\alpha$  y RP en biopsias de pacientes con astrocitomas de grado IV a través de la técnica de inmunofluorescencia.

## **2. Introducción**

Los tumores cerebrales son numerosas patologías de múltiples características que producen diversos síntomas neurológicos como resultado de su tamaño, localización y capacidad invasiva. Los gliomas son tumores neuroectodérmicos de células gliales. Recientemente se ha sugerido que estos tumores surgen de células troncales neuroectodérmicas (Alcantara Llaguno et al., 2009; Louis et al., 2007). También se plantea que existen células neuronales y gliales preneoplásicas provenientes de distintas regiones del cerebro, que poseen una mayor susceptibilidad a cambios génicos, que sumados con el microambiente y las señales de células no neoplásicas, pueden generar un riesgo hacia el desarrollo de gliomas. (Chen and Gutmann, 2013).

Los gliomas se catalogan de acuerdo a sus características histológicas e inmunohistoquímicas en: astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas (Furnari et al., 2007).

Los astrocitomas son los tumores cerebrales más frecuentes (69%); están compuestos de astrocitos neoplásicos, los cuales son un tipo de célula glial, tienen un alto grado de malignidad y alta capacidad proliferativa, se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, y se presentan con mayor frecuencia en adultos de entre 40 y 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. Los tratamientos que existen son la cirugía seguida de quimioterapia y radioterapia, pero la supervivencia de los pacientes de grado III y IV sigue siendo muy baja.

La P4 participa en la regulación de múltiples procesos fisiológicos en los mamíferos, como el mantenimiento del embarazo, la conducta sexual y la excitabilidad neuronal, además desempeña un papel importante en procesos patológicos como el cáncer, particularmente participa en el crecimiento de algunos tumores cerebrales, como los astrocitomas.

El mecanismo de acción clásico de la P4 se produce cuando esta hormona se une al RP nuclear provocando un cambio conformacional en éste que conlleva a su activación.

El RP es un factor de transcripción activado por ligando que posee dos isoformas RP-A y RP-B. Este receptor es susceptible a modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, que regula su actividad transcripcional y su degradación por vía del proteosoma 26S. El RP puede ser fosforilado por diferentes cinasas como la caseína cinasa II, la cinasa 2 dependiente de ciclina, las proteínas cinasas activadas por mitógenos y la cinasa glicógeno sintasa-3 $\beta$ . A través de estudios *in silico* y experimentales se ha detectado que el RP también podría ser fosforilado por la PKC en los residuos Ser400.

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 supervivencia, la migración y la angiogénesis. En gliomas las PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos, y al aumento en la expresión de oncogenes. En células U373 se han detectado las isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  de la PKC.

A pesar de que se han detectado las dos isoformas del RP (RP-A y RP-B) tanto en astrocitomas humanos como en líneas derivadas de éstos y que el receptor aumenta su actividad transcripcional al ser fosforilado por PKC, hasta el momento se desconoce el papel de la PKC en la migración y proliferación reguladas por el RP en los astrocitomas humanos.

### **3. Antecedentes**

#### **3.1 Tumores cerebrales**

Los tumores cerebrales son patologías de variadas características que producen diversos síntomas neurológicos como resultado 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, los primarios son los más comunes, estos se originan dentro del SNC, y los secundarios se originan fuera del SNC y migran a éste (Felix et al. 1995). Los astrocitomas son los tumores cerebrales más frecuentes (69%); estos son derivados de células gliales, oligodendrocitos, células multinucleadas no uniformes, células troncales cancerosas y tienen un alto grado de malignidad, se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, microscópicamente tienen un aspecto uniforme con alta actividad proliferativa y se presentan con mayor frecuencia en adultos de entre 40 y 60 años de edad (Nguyen et al. 1984; Valenzuela et al. 1990; Sarkar et al., 2009).

Los síntomas más comunes de los astrocitomas son dolor de cabeza, cambios en el comportamiento, convulsiones, pérdida de la vista y memoria, entre otros que pueden ocurrir dependiendo del tamaño y la localización del tumor (Fountaine et al., 2006).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado estos tumores en cuatro grados siguiendo criterios morfológicos, histológicos, invasivos y progresivos, siendo los de grado I menos agresivos y los de grado IV los más agresivos biológicamente.

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 de bajo grado de malignidad, 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 también conocidos como anaplásicos son multicelulares, invaden los tejidos vecinos, presentan un notable pleomorfismo y anaplasia, con células multinucleadas y mitosis atípicas abundantes sin

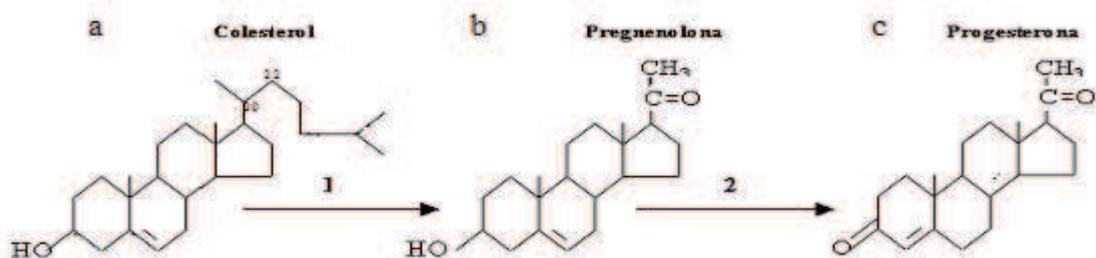
presentar extensas necrosis. El tratamiento consiste en cirugías, haciendo la máxima remoción del tumor sin causar deficiencias neurológicas, seguida de quimioterapia y radioterapia (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas pueden estar compuestos por diferentes tipos celulares como astrocitos y oligodendrocitos, presentan una rápida evolución, son malignos y están localizados preferentemente en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo. 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).

### 3.2 Progesterona, estructura y mecanismo de acción.

La P4 es una hormona esteroide 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 SNC (Graham y Clarke 1997; Zwain y Yen 1999).

La síntesis de P4 se da con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente la transformación de la pregnenolona a P4 (Figura 1).



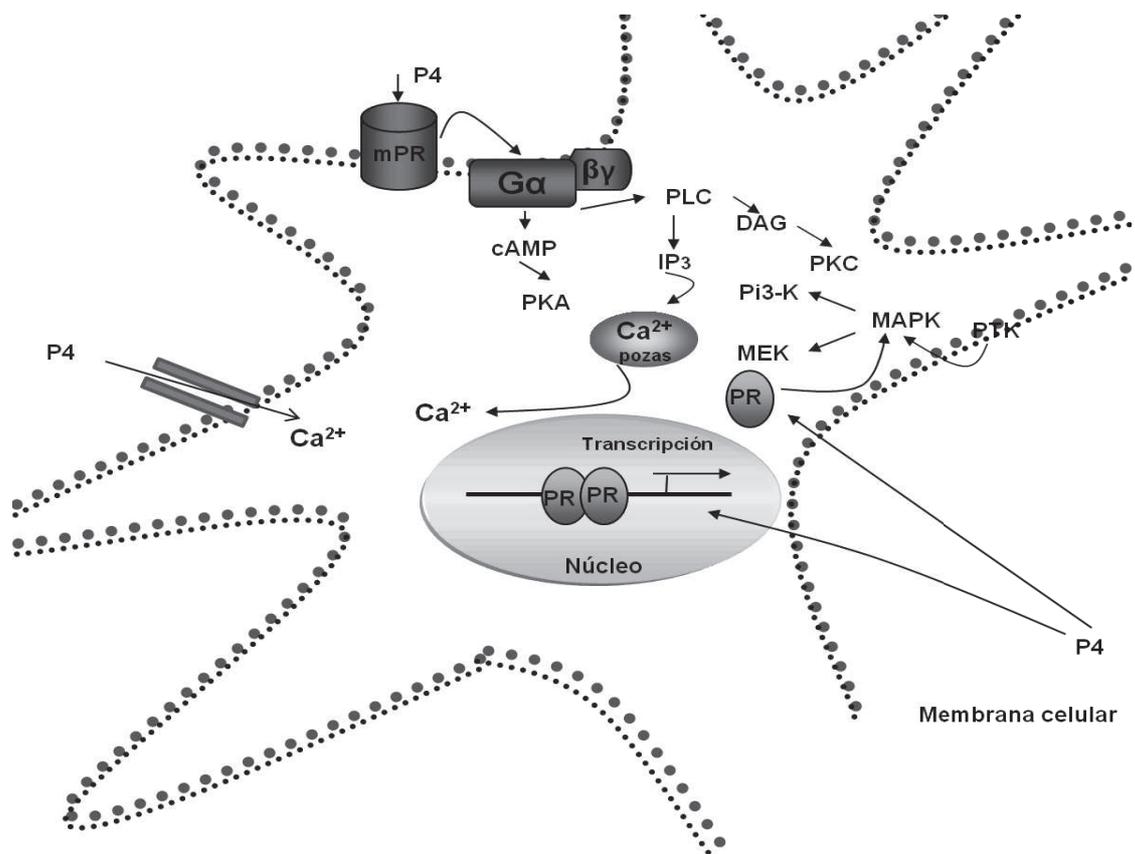
**Figura 1. Biosíntesis de la P4.** La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Estructura del colesterol. b) Estructura de la pregnenolona. c) Estructura de la progesterona. 1) 20,22 esteroide liasa: enzima de escisión entre C20 y C22, paso inicial y limitante de la biosíntesis de diversas hormonas esteroidales; 2) 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa (Gore-Langton et al., 1988).

Una vez que la P4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, en el hígado la P4 se convierte en pregnandirol, el cual se conjuga con ácido glucorónico y se excreta en la orina (Ganong, 2006).

En los mamíferos la P4 participa en la regulación de múltiples procesos tanto reproductivos como no reproductivos 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).

La P4 juega 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- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) (Murphy et al. 1986; Musgrove y Sutherland 1993) y protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos) (Musgrove et al. 1991) y estos efectos fueron bloqueados por el compuesto RU486 que es un antagonista del RP. Además, se ha observado que la P4 y sus receptores influyen en la proliferación de células derivadas de estos tumores tanto *in vivo* como *in vitro* (German-Castelan L. en preparación).

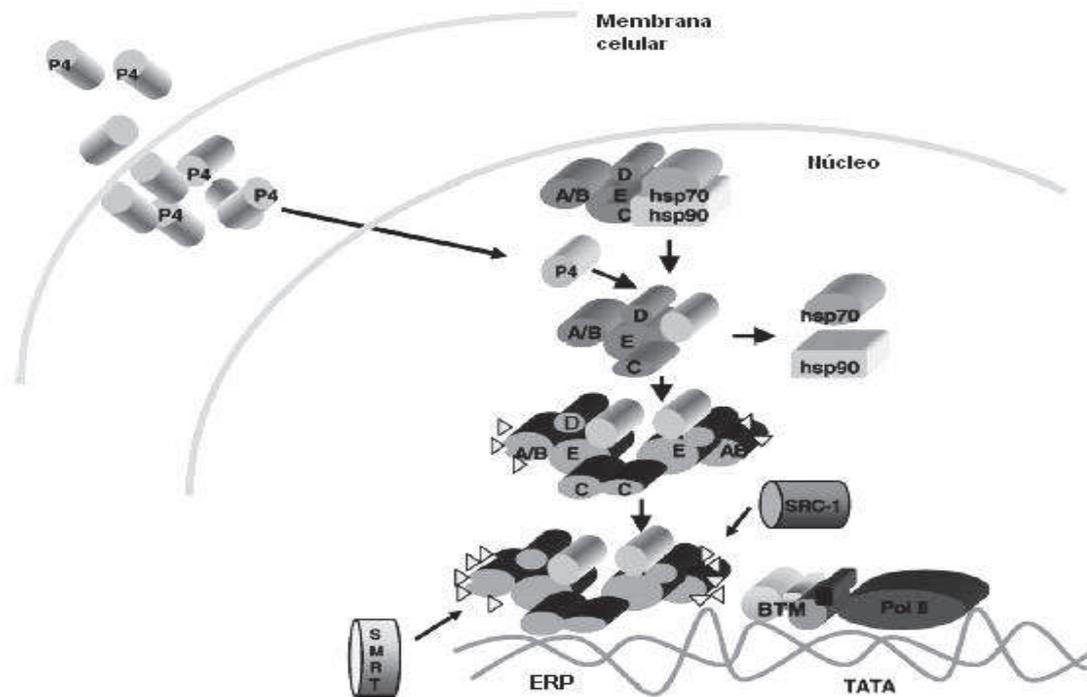
La P4 actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales denominados clásico y no clásico. El primero involucra la interacción de la P4 con el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la hormona con receptores membranales, con sitios de regulación presentes en los receptores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



**Figura 2.** Mecanismos de acción de la P4. La P4 actúa mediante dos mecanismos, en el clásico la P4 atraviesa la membrana y se une a su receptor induciendo su dimerización, fosforilación y activación como factor de transcripción; y en el no clásico la P4 interactúa con receptores de membrana y canales desencadenando señales intracelulares. G: Proteína G,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa 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, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, MEK: Cinasa de MAPK,  $\text{Ca}^{2+}$ : Calcio. (Tomada de González-Arenas y Hernández-Hernández, 2011)

La mayoría de los efectos de la P4 sobre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular están mediados por el RP (Camacho-Arroyo et al. 2003), el mecanismo de acción de la P4 ocurre con su ingreso a la célula por difusión simple; ya en el núcleo se une al RP que previamente se encontraba unido a proteínas chaperonas (proteínas de choque térmico como HSP). Se forma el complejo ligando-receptor lo que provoca un cambio conformacional en éste, separándolo 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 a P4 (ERP). 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 la transcripción (Figura 3) (Liu et al. 2001).

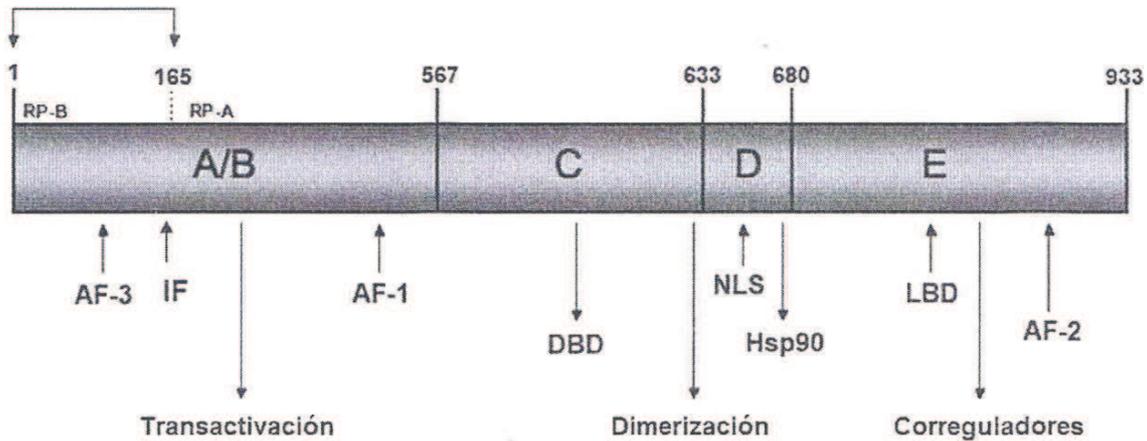


**Figura 3.** Mecanismo de acción clásico de la P4, regulación de la expresión génica vía RP intracelular. En la forma libre el receptor está asociado a proteínas chaperonas como las proteínas de choque térmico (HSPs). Tras la unión de la P4, el RP se libera de las HSP y se dimeriza con otro RP. Posteriormente, el RP se fosforila (triángulos) y forma complejos con corre reguladores, como el coactivador del receptor de esteroides (SRC-1) o el corre presor del receptor de hormonas tiroideas (SMRT). El complejo formado interactúa con elementos de respuesta a progesterona (ERP) en la región promotora de genes blanco a P4 y da señal para que actúe la maquinaria de transcripción basal (BMT). A/B, C, D y E son dominios del RP ( Camacho-Arroyo, 2007).

### 3.3 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 dominio tiene una función de activación (AF) y una función de inhibición (IF), este dominio 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

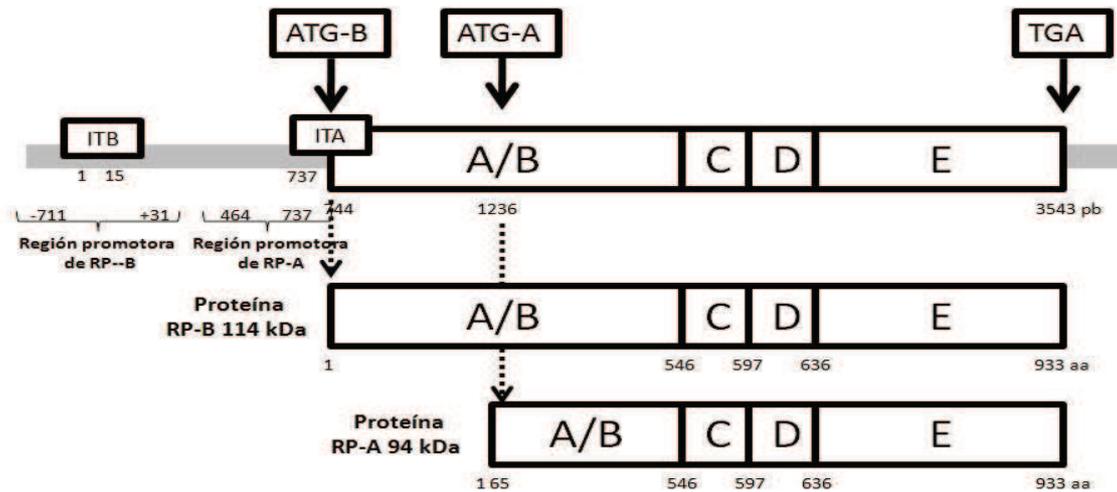
de zinc que permiten esta unión. 3) Dominio bisagra (D) participa en procesos de estabilización del receptor por unión a HSPs y en la localización nuclear ya que contiene las secuencias de localización nuclear. 4) Dominio de unión al ligando (E) participa en la interacción con el ligando y corre reguladores que participan en AF-2 (Figura 4).



**Figura 4.** Dominios del RP (A-E). Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delinean el inicio y término de cada dominio, mientras que las flechas (↓) indican el sitio de inicio de la traducción de las dos isoformas. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio A/B el cual tiene dos funciones de activación (AF) y una función de inhibición (IF), C: dominio de dimerización y de unión al DNA (DBD) caracterizado por tener dos dedos de zinc, D: región de bisagra contiene las secuencias de localización nuclear (NLS) y la de unión a chaperonas (Hsp90), E: dominio de unión al ligando (LBD) y corre reguladores y hacia el extremo carboxilo terminal tiene una función de activación (AF-2). También se muestra el numero de aminoácidos de cada dominio y del RP-A y RP-B. (Modificada de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

### 3.3.1 Isoformas del receptor a progesterona.

En el ser humano se han caracterizado dos isoformas del RP denominadas RP-A (94 kDa) y RP-B (116 kDa). (Camacho-Arroyo et al., 2009). La diferencia entre ellas radica en 164 aminoácidos presentes en el extremo amino-terminal de RP-B. Esta región es conocida como BUS (B-receptor upstream segment) (Conneely y Jericevic 2002; Giangrande y McDonnell 1999). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen localizado en el cromosoma 11 q22-23, pero difieren en su sitio de inicio de la transcripción (Conneely et al. 1987) (Figura 5).



**Figura 5.** Secuencia del gen y de las isoformas del RP. Se indican los sitios de inicio de la transcripción del RP-A ( ITA) y RP-B ( ITB); 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). (Tomado de Morales y Velazquez, 2009)

El contenido de las isoformas del RP así 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).

### 3.3.2 Fosforilación del RP

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan et al., 1989; Zhang et al., 1997). El estado de fosforilación del RP puede influenciar su localización celular, actividad transcripcional, formación de complejos protéicos y especificidad de genes blanco (Qiu et al., 2003; Pierson-Mullany y Lange 2005; Faivre et al., 2008). 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). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas a este (Rowan et al., 2000).

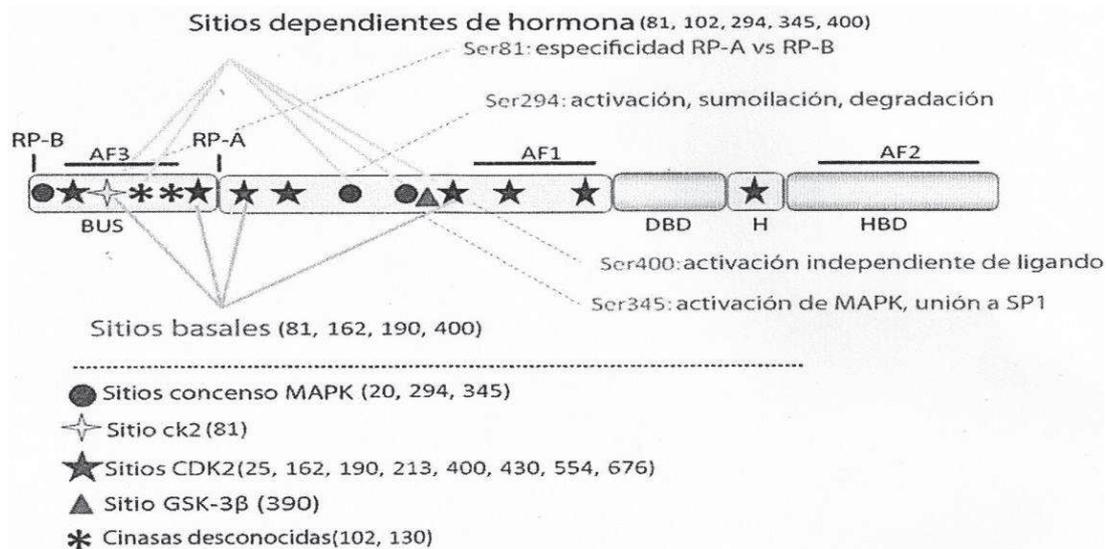
La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por la P4. El RP de humano (hRP) contiene 15 sitios de fosforilación (Figura 6), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo* (Ser20, Ser81, Ser102, Ser162, Ser190, Ser213, Ser294, Ser346, Ser400, Ser676) y cinco únicamente

por fosforilación *in vitro* (Ser25, Ser130, Ser345, Thr430, Ser554) (Zhang et al., 1994 y 1997, Lange et al., 2000, Knotts et al., 2001). Hasta ahora se sabe que la P4 induce la fosforilación del RP en tres residuos que son la Ser102, Ser294 y Ser345 y que los residuos Ser81, Ser162, Ser190, Ser345 y Ser400 son sitios ya fosforilados en condiciones basales que incrementan su fosforilación después del tratamiento con P4 (Zhang et al., 1994 y 1995).

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, 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).

Hasta el momento se conoce que cuatro cinasas pueden fosforilar al RP, la caseína cinasa II (CK2) (Zhang et al. 1994), la cinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2) (Knotts et al., 2001; Zhang et al., 1997), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK-44 y 42) (Lange et al., 2000) y la cinasa de la glicógeno sintasa 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Wang et al., 2013).

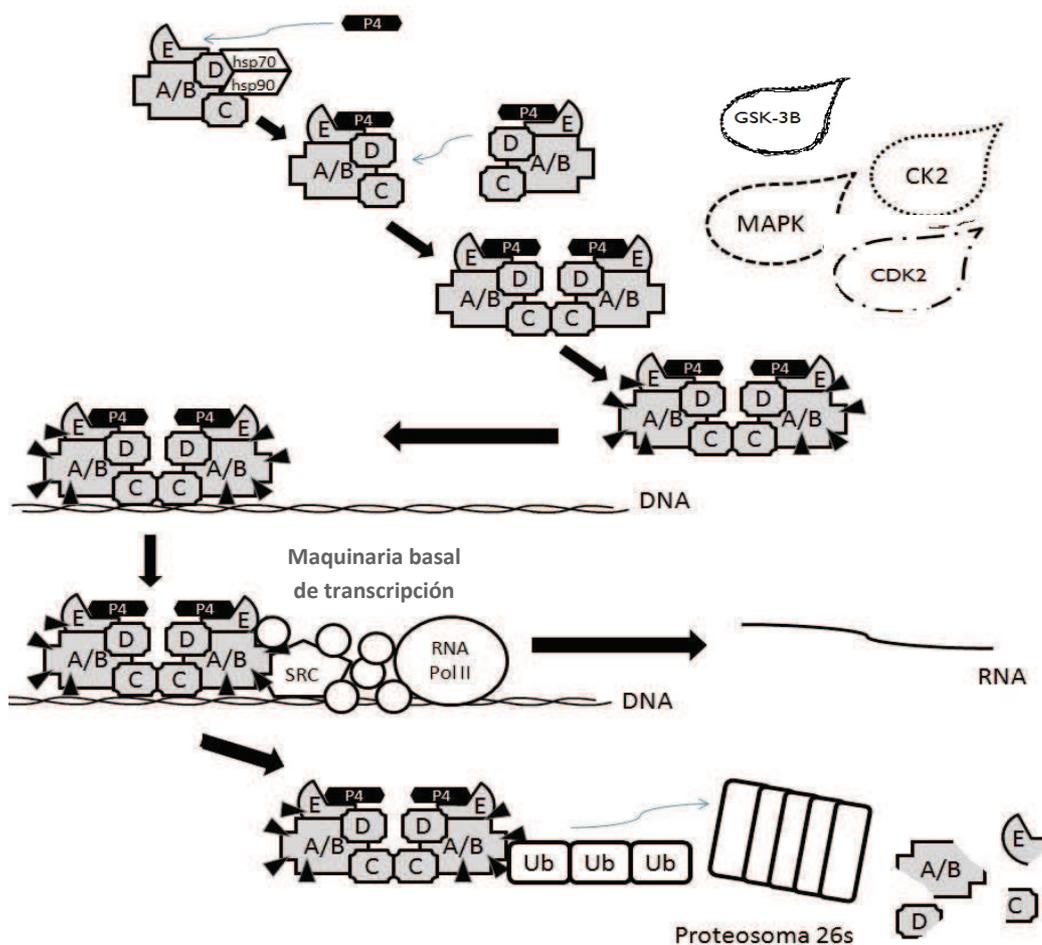
La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo localización nuclear en respuesta a la activación de CDK2 que fosforila al residuo Ser400 (Pearson-Mullany y Lange, 2004), la fosforilación de MAPK en el residuo Ser294 que eleva la actividad transcripcional del RP y simultáneamente disminuye su estabilidad en la célula al marcarlo para su ubiquitinación (Lange et al., 2000; Qiu y Lange, 2003); sinergismo transcripcional en presencia de P4 al fosforilar Ser345 por MAPKs (Faivre et al., 2008) y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Kazmi et al., 1993; Lange, 2004).



**Figura 6. Sitios de fosforilación en el RP humano.** Se esquematizan los residuos de fosforilación en el RP identificados hasta la fecha *in vivo* e *in vitro*, y las cinasas responsables en la fosforilación directa de estos sitios; GSK-3β: Cinasa de la glucógeno sintasa, MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos, CDK2: Cinasa 2 dependiente de ciclina, CK2: Caseína cinasa 2. Los 3 dominios de transactivación (AF1 - AF3), el segmento BUS, el dominio de unión al DNA (DBD) y de unión a ligando (HBD), la región bisagra (H). El RP es fosforilado basalmente, así como en respuesta a hormona. (Tomado de Hagan et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, la P4 induce la fosforilación del RP, lo que ocasiona un aumento en la actividad transcripcional así como la inducción de su degradación por el proteosoma 26S (Lange, 2004). Se ha observado que la fosforilación en el residuo Ser294 de manera dependiente de ligando es señal para que el RP sea degradado por la vía Ubiquitina-Proteosoma 26S. Por otro lado se ha sugerido que la fosforilación de la Ser400 puede estar implicada tanto en el recambio del receptor 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).

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) (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de la activación y fosforilación del RP. El RP puede ser fosforilado por cinasas como CK2, CDK2, MAPK y GSK-3 $\beta$ , ya fosforilado el RP tiene actividad transcripcional y es marcado para su posterior degradación por el proteasoma 26S. A/B, C, D, E: Subunidades del RP, P4: Progesterona, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, CK2: Caseína Cinasa 2, CDK2: Cinasa 2 Dependiente de Ciclina, GSK-3 $\beta$ : Cinasa de la glucógeno sintasa DNA: Ácido Desoxirribonucleico, SRC: Coactivador de Receptores Esteroides, RNA Pol II: RNA polimerasa, RNA: Ácido Ribonucleico, Ub: Ubiquitina.

Hasta el momento se conoce que las cinasas CK2, CDK2, MAPKs y GSK-3 $\beta$  son capaces de fosforilar al RP. Recientemente en el laboratorio se ha demostrado en células U373 que la activación de PKC con TPA aumenta la fosforilación del RP en el residuo serina400 y que esta fosforilación aumenta su actividad transcripcional además de marcarlo para una subsecuente degradación por la vía del proteosoma 26S. Las PKC $\alpha$  y  $\delta$  son las isoformas que participan en el aumento de la fosforilación del RP y en su degradación. También se ha observado una asociación basal de PKC $\alpha$  con el RP, que aumentó a los 5 minutos de tratamiento con TPA; se detectaron ambas proteínas tanto en citoplasma como en núcleo (González-Arena et al. en preparación).

### 3.4 RP y astrocitomas

En un estudio realizado en biopsias de pacientes adultos mexicanos 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, esta expresión se observó en ácido ribonucleico mensajero (mRNA) (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, esto se determinó mediante la técnica de inmunohistoquímica avidina-biotina (Khalid et al. 1997). Además, se ha demostrado mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) e inmunohistoquímica 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, por otra parte, en células U373 con la isoforma RP-A sobre-expresada y tratadas con P4, no se observó el incremento en el número celular inducido por esta hormona. 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-Aguero 2001, Cabrera-Muñoz 2009).

La expansión de los tejidos tumorales requiere de nuevos vasos sanguíneos para su desarrollo, la vascularización es un factor importante para la progresión e invasión de estos tumores, se ha reportado que la P4 a través de su receptor nuclear aumentan la expresión de genes involucrados en la angiogénesis como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) en células T47D. La P4 aumenta la expresión de VEGF y EGFR en células D54 (Hernandez-Hernandez et al., 2012). Dicho aumento mediado por el RP también se ha observado en otros modelos de cáncer como el cáncer de mama y de próstata (Cabrera-Muñoz et al., 2011).

La P4 y sus receptores influyen en la proliferación de células derivadas de astrocitomas tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la P4 a través de su receptor, induce la proliferación de las líneas celulares U373 y D54. También se demostró que la administración de RU486 durante 21 días a ratones trasplantados con células

U373 en la corteza frontal reduce el crecimiento tumoral inducido por P4 (German- Castelán L., enviado).

Estos resultados demuestran la importancia que tiene la expresión del RP y su regulación, con la progresión de estos tipos de tumores.

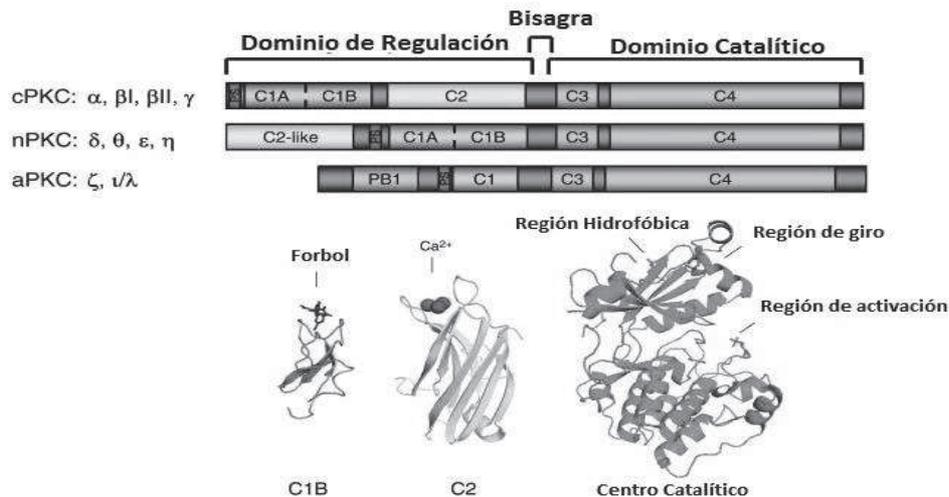
### **3.5 Proteína cinasa C.**

Las PKCs comprenden 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 involucradas 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) (Figura 8).

Las PKC pueden ser clasificadas en 3 grupos dependiendo de sus regiones reguladoras: clásicas, nuevas y atípicas. Las PKCs clásicas (cPKC), PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II y PKC $\gamma$ , son activadas por diacilglicerol (DAG), calcio, fosfatidilserina (PS) y ésteres de forbol (el más utilizado es el TPA, 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato). Las PKC nuevas (nPKC), PKC $\sigma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  y PKC $\theta$ , no dependen de calcio para activarse pero son reguladas por DAG, PS y ésteres de forbol. Las PKC atípicas (aPKC), PKC $\xi$  y PKC $\lambda$ , 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 como con MAPK5 a través de la interacción de sus dominios PB1 (figura 8) (Mackay y Twelves 2007, Steinberg 2008).

### Isoformas de PKC: Estructura de Dominios



**Figura 8.** Estructura de las isoformas y de la familia de PKC. La parte superior de la figura muestra los dominios de las diferentes isoformas de PKC. Las PKCs clásicas (cPKCs) poseen una región de unión a TPA y/o DAG (C1B y C1A) y una región dependiente de calcio (C2), en el caso de la región C2 de las PKCs nuevas (nPKCs) es independiente 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 muestra esquemas de los dominios C1, C2 y del sitio catalítico. (Tomada de Steinberg 2008)

Seguidas de su activación, las PKCs migran a la membrana celular de manera rápida mediante un mecanismo que involucra acumulación de DAG (debida a la fosfolipasa C), 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 de otras cinasas o autofosforilaciones, en residuos de serina/treonina muy conservados de la región carboxilo terminal y en el caso de PKCδ en residuos de tirosina (Li; 1995, Soltoff; 1995, Denning; 1996); las PKCs también pueden ser sustratos de caspasas; y finalmente, 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, la diferenciación, la sobrevivencia, la migración o la angiogénesis. En el laboratorio se han detectado las isoformas α, δ y ε de las PKC en células U373

(Gonzalez-Arenas et al. 2006).

### **3.6 RP, PKC y astrocitomas.**

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 la activación de las PKCs  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos, y al aumento en la expresión de genes como las ciclinas; esta asociación fue detectada por medio de Western blot y microscopia de inmunofluorescencia en el caso de PKC $\alpha$  y  $\delta$ , en el caso de PKC $\epsilon$  se utilizaron métodos de silenciamiento con RNAs de interferencia (siRNAs) en células de glioma U87 y U251 (Sarkar y Yong 2009; Sharif y Sharif 1999; Okhrimenko et al. 2005).

Las isoenzimas desempeñan diferentes papeles en el desarrollo de los tumores, estas funciones son tejido-dependientes, debido a esto la sobreexpresión o la actividad desregulada de las PKCs no siempre son indicadores de los mismos efectos (El-Rayes et al.,2008). Esto destaca la importancia del estudio y comprensión de los efectos y mecanismos de las PKCs en el desarrollo de los tumores.

En el caso de PKC $\alpha$  su activación le da a las células resistencia a la apoptosis en diversos modelos y bajo diferentes estímulos como la apoptosis inducida por radiación (Nakajima et al.,2008). Se ha comprobado *in vitro* que PKC $\alpha$  activa la vía ERK y NF $\kappa$ B, induciendo la activación de metaloproteasas que aumentan la migración e invasión de este tipo de tumores (Lin et al., 2010).

Por otro lado PKC $\delta$  también participa en la activación de metaloproteasas inducida por tenacina, una proteína de la matriz extracelular, lo que aumenta la invasividad de los tumores (Sakar y Yong, 2010). PKC $\alpha$  induce la apoptosis en células irradiadas de la línea LNCaP de cáncer de próstata de humano resistentes a la radiación, mediante la activación de la proteína Atm (Truman JP, Gueven N et al., 2005).

Se ha reportado que la PKC $\epsilon$  actúa tanto como inductor de la proliferación, así como de la muerte celular, siendo estos efectos tejido-especifico. PKC $\epsilon$  esta sobreexpresada y activada en gliomas, induciendo su proliferación y resistencia a la apoptosis (Okhrimenko et al.,2005).

Recientemente en el laboratorio se ha demostrado en células U373 que la activación de PKC con TPA aumenta la fosforilación del RP en el residuo Ser400 y que esta fosforilación aumenta su actividad transcripcional y lo marca para una subsecuente degradación por la vía del proteosoma 26S. Las PKC $\alpha$  y  $\delta$  son las isoformas que participan en el aumento de la fosforilación del RP, esto se determinó utilizando siRNAs para inhibir la expresión de dichas isoformas y posteriormente se identificó su participación en la fosforilación del RP mediante citometría de flujo. También se ha observado una asociación basal de PKC $\alpha$  con el RP, que aumenta a los 5 min de tratamiento con TPA; se ha determinado la localización intracelular de PKC  $\alpha$  y el RP encontrando a ambas proteínas tanto en citoplasma como en núcleo.

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

Los astrocitomas son los tumores cerebrales más frecuentes; a pesar de que existen diversos tratamientos contra los astrocitomas, éstos son muy agresivos repercutiendo en el funcionamiento cerebral y en la calidad de vida de los pacientes que los padecen.

Se sabe que en células derivadas de astrocitomas humanos grado III, las PKCs tiene un papel importante, ya que son capaces de fosforilar al RP en el residuo Ser400, alterando su actividad transcripcional, se ha demostrado que la PKC $\alpha$  participa en dicha fosforilación, y que esta induce la degradación del RP por la vía del proteosoma 26S. También, se ha observado una asociación basal de PKC $\alpha$  con el RP, la cual aumenta a los 5 minutos de tratamiento con TPA; se ha determinado la localización intracelular de PKC $\alpha$  y el RP encontrando a ambos tanto en citoplasma como en núcleo, PKC $\alpha$  está involucrada en la proliferación, migración e inhibición de la apoptosis en varios tipos de cáncer como el de mama, próstata y pulmón, sin embargo se desconoce el papel de las PKCs en los procesos de proliferación y migración de células derivadas de astrocitomas humanos grado III, y si existe una co-localización proporcional de PKC $\alpha$  con el RP en astrocitomas de grado IV.

#### **5. Hipótesis**

La activación directa de PKC con TPA, aumentara la proliferación y migración de las células U373 derivadas de astrocitomas humanos grado III, y al inhibir al RP con un antagonista (RU486) disminuirán estos efectos.

El porcentaje de PKC $\alpha$  que co-localiza con RP será proporcional al grado de evolución de los astrocitomas en biopsias de pacientes con estos tumores.

## **6. Objetivos**

### **a. Objetivo general**

Evaluar el papel de la PKC en los procesos de malignidad de células derivadas de astrocitomas humanos grado III mediados por el RP, así como su co-localización con PKC $\alpha$  en muestras de astrocitomas grado IV.

### **b. Objetivos particulares**

- 1) Evaluar el papel de la activación de PKC en la proliferación de células derivadas de astrocitomas humanos grado III, mediada por el RP.
- 2) Evaluar el papel de la activación de PKC en la migración de células derivadas de astrocitomas humanos grado III, mediada por el RP.
- 3) Determinar si existe co-localización de PKC $\alpha$  y RP en biopsias de pacientes con astrocitoma de grado IV.

## **7. Materiales y Métodos.**

### **7.1 Cultivo celular**

La línea celular U373, derivada de astrocitomas humanos grado III, se cultivó en cajas petri con Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM), con rojo fenol, complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato 1 mM y aminoácidos no esenciales 0.1 mM, hasta que alcanzaron una confluencia del 80% para los experimentos de proliferación o del 70 % para los experimentos de migración. Se incubaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. 24 h antes de cada experimento se reemplazó el medio de cultivo por DMEM sin rojo fenol y con suero fetal bovino libre de hormonas.

### **7.2 Tratamientos**

Para la evaluación de la proliferación se aplicaron a las células los siguientes tratamientos dejando en incubación por 24 h: Vehículo (DMSO 10% + EtOH 10%), TPA 1  $\mu$ M, RU486 10  $\mu$ M y RU486 10  $\mu$ M + TPA 1 $\mu$ M (el TPA se agregó 30 minutos después de tratar con RU486).

Para la evaluación de la migración se aplicaron a las células los siguientes tratamientos dejando en incubación por 24 y 48 h: Vehículo (DMSO 10% + EtOH 10%), TPA 1  $\mu$ M, RU486 1  $\mu$ M, y RU486 1  $\mu$ M + TPA 1  $\mu$ M (el TPA se agregó 30 minutos después de tratar con RU486).

### **7.3 Evaluación de la activación de PKC en la proliferación mediada por el RP en astrocitomas humanos.**

Para analizar el efecto proliferativo inducido por PKC mediado por el RP en la línea celular U373. Se sembraron aproximadamente 2000 células en una laminilla para inmunofluorescencia de 8 pozos, y se dejaron crecer por 48 h en 200  $\mu$ L de medio DMEM en las condiciones mencionadas en el apartado de "cultivo celular". Posteriormente las células se trataron como se indica en el apartado "tratamientos" antes de realizar el ensayo de incorporación de BrdU; transcurrido el tiempo se prosiguió con la adición de BrdU (10  $\mu$ M) y se dejó incubar durante 30 minutos para posteriormente realizar la inmunofluorescencia. Al transcurrir este tiempo se realizaron 3 lavados con solución de buffer de fosfatos (PBS) durante 5 minutos, las células se fijaron con etanol fijativo (glicina 10 mM y etanol al 70%, pH 2.0) a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Después se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5% en PBS y suero normal de cabra al 5% en PBS durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  para evitar el pegado inespecífico, al concluir, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos. A continuación, se incubaron las células con anticuerpo primario monoclonal anti-BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine labeling and detection Kit I, Roche) dilución 1:100 en solución buffer de incubación durante toda la noche. Posteriormente, se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 488 (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse (H+L), Invitrogene) a una concentración 2  $\mu$ g/mL durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz. Después de cada incubación con cada uno de los anticuerpos, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. Para teñir los núcleos se realizó una incubación con el fluorocromo Hoechst a una concentración de 24.6  $\mu$ g/mL por 7 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  en condiciones de oscuridad. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Se dejó secar y se montó en un cubre objetos con medio de montaje no fluorescente (fluoro care anti-fade mountant , Biocare Medical).

Las células se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia. Para el análisis cuantitativo fueron tomadas 3 imágenes por tratamiento y la cuantificación, tanto para los núcleos, como para las células BrdU positivas se hizo utilizando el programa imageJ.

#### **7.4 Evaluación del papel de la PKC en la migración mediada por el RP en astrocitomas humanos.**

Se cultivó la línea celular U373 en cajas de 12 pozos, en las condiciones mencionadas en la parte de “cultivo celular”. Para la evaluación del papel de la PKC en la migración celular mediada por el RP, se realizó un ensayo de scratch wound, que consiste en generar una zona libre de células realizando un surco a lo largo del diámetro de cada pozo; para lo anterior se utilizó el lado más fino de una punta de micropipeta estéril. Inmediatamente después se aspiró el medio para retirar los restos celulares levantados, y se agregó nuevamente medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB. Las células se trataron como se indica en el apartado de “tratamientos”.

Se agregó a cada pozo Ara-C 50  $\mu$ M (1:100), el cual es un inhibidor de la proliferación celular, para asegurar que lo que se evaluó solo fuera el proceso de migración y no la proliferación; finalmente se monitoreó el experimento a las 0, 24 y 48 h. Para el análisis cuantitativo, fueron tomadas tres imágenes por tratamiento y el número de células que migraron a la zona libre fue cuantificado utilizando el programa imageJ.

#### **7.5 Porcentaje de colocalización de RP y PKC $\alpha$ en biopsias de pacientes con astrocitomas de grado IV.**

Se utilizaron 6 biopsias donadas por el Instituto Nacional de Cancerología; de pacientes con diagnóstico clínico e histológico de astrocitoma de grado IV, tomando como criterio de inclusión que las muestras fueran de mujeres entre 30 y 70 años, sin tratamiento previo de quimioterapia o radioterapia, sin tomar en cuenta la región cerebral; se excluyeron las muestras de hombres para evitar una mayor variabilidad en los resultados.

Las biopsias seleccionadas embebidas en parafina se analizaron para determinar la presencia y colocalización de PKC $\alpha$  y RP mediante inmunofluorescencia. Para ello, se desparafinaron de la siguiente manera: se incubaron cortes de 10 micras de espesor con parafina montados en portaobjetos a 60°C por 30 minutos, posterior se eliminó gradualmente la parafina sumergiendo las muestras en el siguiente orden de solventes: Xilol 2 veces por 5 minutos, Xilol:EtOH (1:1) 2 veces por 5 minutos, EtOH 100% 2 veces durante 5 minutos, EtOH 96% 2 veces durante 5 minutos, EtOH 90% 2

veces durante 5 minutos, se lavo con agua 2 veces durante 3 minutos en agitación y se dejaron las muestras en PBS, posteriormente se hizo el desenmascaramiento del antígeno, para exponerlo a la acción de los anticuerpos; para lo anterior se uso un tratamiento térmico, que consistió en colocar los portaobjetos en un refractario y cubrirlos con un buffer de Citrato de Sodio 10 mM, pH 6,0; se calentaron a 95°C durante 5 minutos; y se dejaron enfriar en solución tampón durante 20 minutos. Se lavaron con agua 3 veces durante 2 minutos cada vez; y se aspiró el exceso de líquido. Se delimitó la zona de la muestra con PAP pen (marcador siliconado) y se bloqueó con 200 µL de suero normal de cabra al 10% en PBS-Tween (PBS-T) al 0.1% por 1 h a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios, anti-RP montado en ratón (Santa Cruz Biotechnology) y anti-PKCα montado en conejo (Santa Cruz Biotechnology), en una concentración de 8 µg/mL para el RP y 2 µg/mL para PKCα, en solución buffer de bloqueo a 4°C durante toda la noche, al finalizar se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T en agitación. Posteriormente se agregaron los anticuerpos secundarios anti-IgG-ratón acoplado a Alexa 488 (Invitrogene) para el RP y anti-IgG-conejo acoplado a Alexa 594 (Invitrogene) para PKCα en una concentración de 2 µg/mL en solución buffer de bloqueo y se incubaron por 40 minutos, transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T. En seguida se agregó Hoescht que tiñe al DNA, durante 7 minutos en una concentración de 24.6 µg/mL y se realizaron 3 lavados por 5 minutos con PBS-T. Las preparaciones se montaron con fluoro care anti-fade mountant .

Para el análisis cuantitativo se tomaron 5 fotos de distintos campos de cada una de las laminillas y se cuantificaron utilizando el programa imageJ.

## **7.6 Análisis estadístico**

Los resultados de las gráficas muestran la media de los diferentes experimentos ± el error estándar. Los grupos experimentales para la evaluación de la proliferación fueron analizados mediante una prueba paramétrica T de Student. Los grupos experimentales para la evaluación de la migración y co-localización de PKCα con el RP fueron comparados mediante el análisis de varianza, ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey para la

comparación múltiple de todos los grupos. Se utilizó el programa GraphPad Prism5 para calcular los datos estadísticos.

En todas las pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza del 95%, por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de  $p < 0.05$ .

## **8. Resultados**

### **8.1 Evaluación de la activación de PKC en la proliferación mediada por el RP en astrocitomas humanos.**

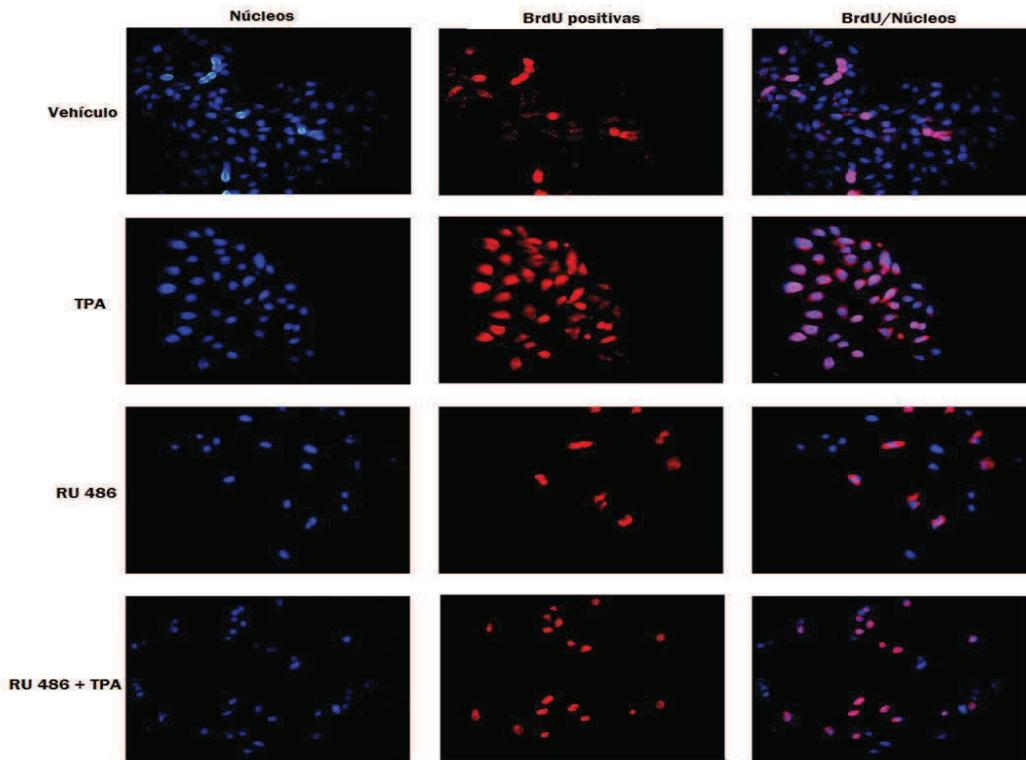
Para evaluar la participación de la PKC en la proliferación celular de la línea U373, se usaron 4 tratamientos diferentes: DMSO 10% como vehículo, TPA que es un activador de PKC que interactúa en el mismo sitio de unión que el DAG, RU486 el cual es un antagonista del RP; y RU486 + TPA, a las concentraciones antes mencionadas en el apartado “tratamientos”. Se incubaron por 24 h en las condiciones mencionadas en el apartado “cultivo celular”, una vez transcurrido el tiempo se realizó el ensayo de BrdU descrito en la metodología, las células fueron teñidas por inmunofluorescencia e incubadas con anticuerpo anti-BrdU, seguido del anticuerpo secundario anti-Ig-ratón acoplado a Alexa 488.

Los núcleos fueron teñidos con Hoechst y cuantificados antes de analizar el efecto de los tratamientos en la proliferación (Figura 9B), esto se utilizó como control, brindando información sobre el número de células totales que se tenían por campo.

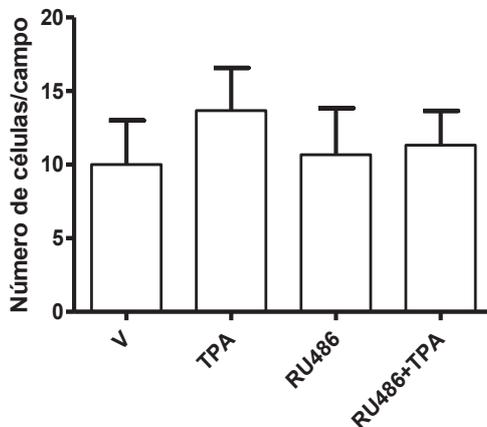
Se observó un aumento en la proliferación de las células U373 tratadas con TPA por 24 h. En contraste la incorporación del antagonista del RP RU486 no mostró un efecto proliferativo en estas células tumorales. En el tratamiento con RU486 + TPA, el RU486 inhibió la proliferación inducida por PKC cuando es activada por TPA (figura 9C).

Las siguientes figuras 9 (A, B y C) representan los resultados obtenidos en la evaluación del papel de la PKC en el efecto proliferativo mediado por RP.

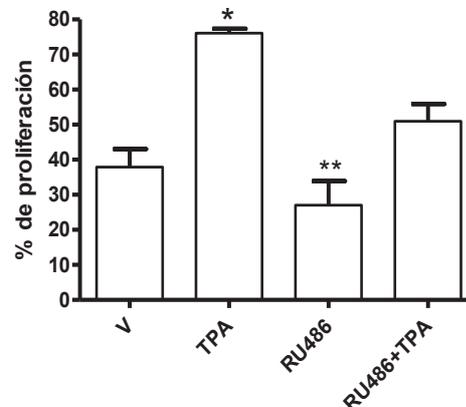
9A



9B



9C



**Figura 9. Ensayo de detección de BrdU.** 9A) Las células U373 fueron teñidas por inmunofluorescencia. Las células fueron incubadas con anticuerpo anti-BrdU, seguido del anticuerpo secundario anti-Ig-ratón. Las células BrdU positivas se muestran en rojo y fue usado Hoescht para la tinción de núcleos en azul. Se muestra también el merge de las imágenes como BrdU/núcleos, la co-localización de las células se aprecia en color morado. 9B) En la gráfica se muestran los resultados de los núcleos teñidos con Hoechst que representan el total de las células contadas por campo antes de los tratamientos con Vehículo (DMSO 10% + EtOH 10%), TPA 1  $\mu$ M, RU486 10 $\mu$ M, y RU486+TPA (el RU486 se añadió 30 minutos antes de tratar con TPA). 9C) La gráfica muestra el porcentaje de proliferación para las células U373 que fueron BrdU positivas. Los porcentajes se obtuvieron de las células BrdU positivas con respecto al número de núcleos totales de cada tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (E.E.) con una n=3. \*p<0.001 vs todos los grupos; \*\*p<0.02 vs RU486+TPA.

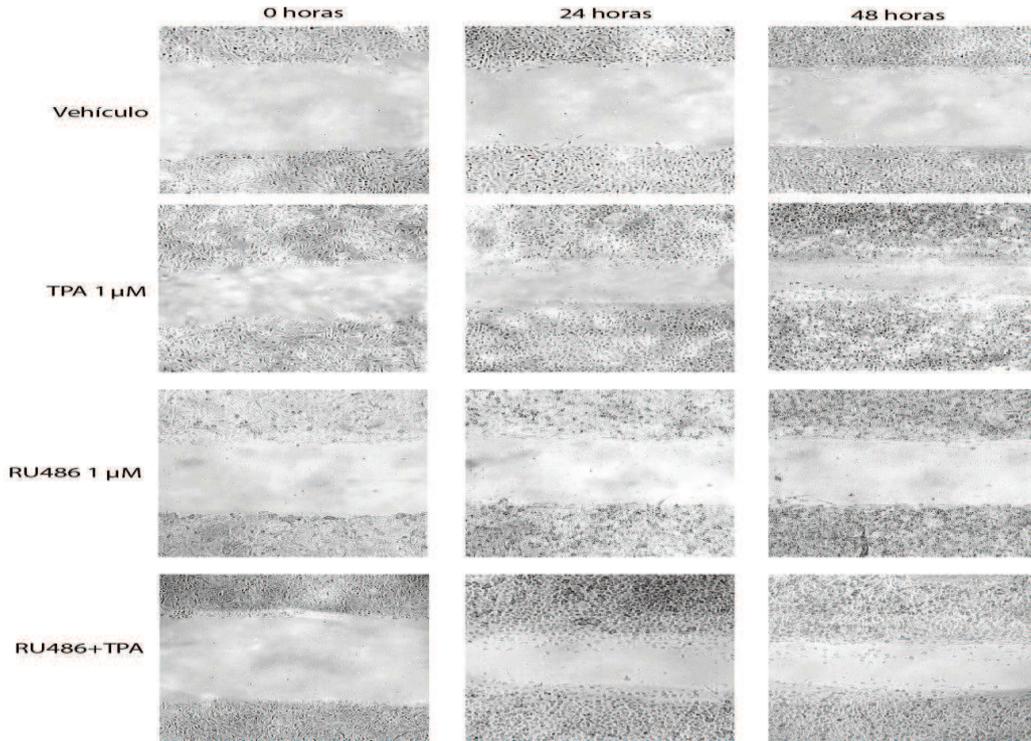
## **8.2 Evaluación del papel de la PKC en la migración mediada por el RP en astrocitomas humanos.**

Para evaluar la participación de la PKC en el proceso de la migración celular de la línea U373 se realizó un ensayo scratch wound, el cual consiste en generar una zona libre de células realizando un surco a lo largo del diámetro de cada pozo. Las células se trataron como se indica en el apartado de “tratamientos”. También se agregó Ara-C en todos los tratamientos, para descartar fenómenos de proliferación celular, que pudieran intervenir en los resultados; finalmente se monitoreo el experimento a las 0, 24 y 48 h.

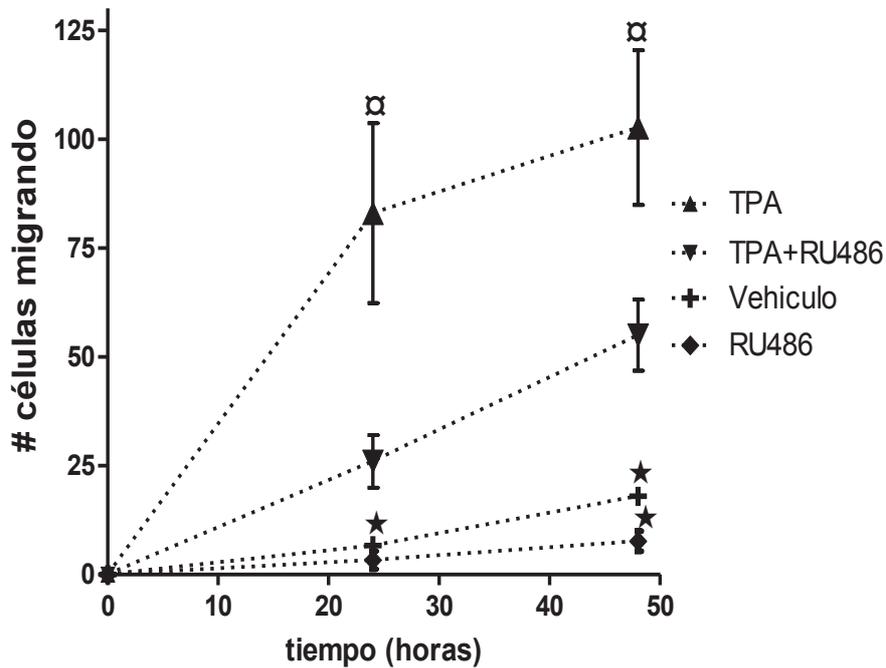
En los resultados obtenidos se observó un efecto significativo de TPA en el aumento de la migración, en las células U373, también se observó que entre el RU486 y el vehículo no hubo diferencia significativa; con el tratamiento de TPA + RU486 se observó una disminución en la migración de las células inducida por PKC al ser activada por TPA. Estos datos nos dan información acerca del papel que juega el RP en la migración inducida por la activación de PKC. Los efectos observados fueron a partir de las 24 h hasta las 48 h después de administrar los tratamientos (figura 10B).

Las figuras 10A y 10B muestran los resultados obtenidos en la evaluación del papel de la PKC en la migración de la línea celular U373, mediada por RP.

10A



10B



**Figura 10. Perfiles de migración** 10A) Se muestran los perfiles de migración de las células U373 con los tratamientos de Vehículo (DMSO 10% + EtOH 10%), TPA 1  $\mu$ M, RU486 1  $\mu$ M, y RU486 30 minutos antes de tratar con TPA; monitoreados después de realizar el surco a las 0, 24 y 48 horas.

10B) Cuantificación de la tasa de migración como el número de células migrando al área libre. Los símbolos representan la media  $\pm$  E.E. con una n=3;  $\alpha$  p<0.0001 vs todos los grupos;  $\star$  p<0.0001 vs RU486+TPA y TPA. Las diferencias estadísticas fueron obtenidas por un ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey's de comparación múltiple.

### **8.3 Porcentaje de co-localización de RP y PKC $\alpha$ en biopsias de pacientes con astrocitomas de grado IV.**

Estudios recientes en células derivadas de astrocitomas humanos grado III, han demostrado que la PKC $\alpha$  participa en la fosforilación del RP en la Ser400. También se ha observado una asociación basal de PKC $\alpha$  con el RP, que aumenta a los 5 minutos de tratamiento con TPA; se ha determinado la localización intracelular de PKC $\alpha$  y el RP, encontrando a ambos tanto en citoplasma como en núcleo.

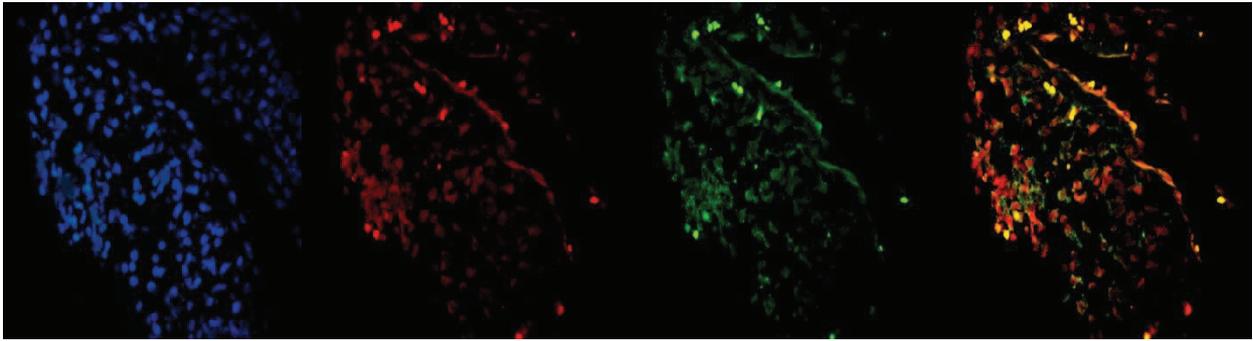
Con el siguiente ensayo se buscó evaluar, la relación que existe entre el porcentaje de co-localización de PKC $\alpha$  con el RP en muestras (biopsias) de pacientes con astrocitomas de grado IV donadas por el Instituto Nacional de Cancerología.

En la figura 11A se muestra a PKC $\alpha$  y RP en las biopsias de astrocitoma de grado IV, se puede observar que ambas proteínas tanto PKC $\alpha$  y RP se encuentran en un alto porcentaje de células por campo. En el último cuadrante (PKC $\alpha$ /RP) se observa la co-localización de ambas proteínas en color naranja.

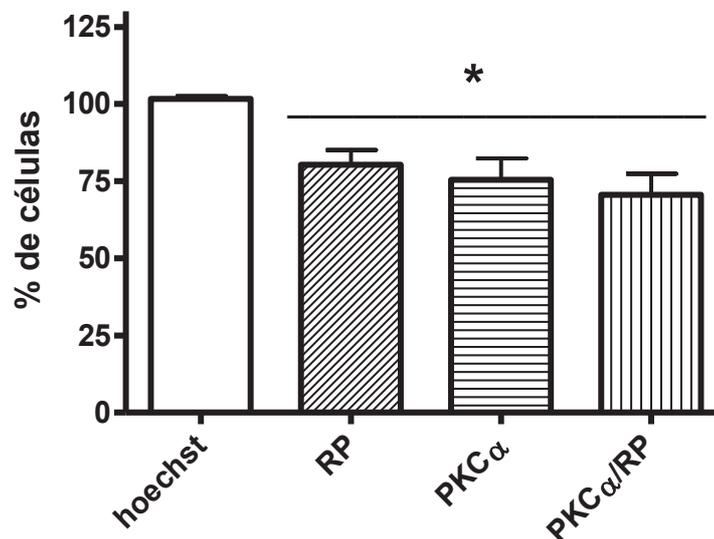
En la figura 11B se muestra el gráfico que representa el porcentaje de células que presentan tanto a PKC $\alpha$  (en verde), como a RP (en rojo), así como ambas proteínas co-localizando (PKC $\alpha$ /RP en naranja); los porcentajes se obtuvieron de las células positivas para cada proteína con respecto al número de núcleos totales (Hoechst); en el caso de la co-localización, el porcentaje se obtuvo de las células positivas para PKC $\alpha$  con respecto a las positivas para RP. Se observó una diferencia significativa en todos los casos en relación al número de núcleos totales. Aproximadamente el 70% de las células expresaron ambas proteínas PKC $\alpha$  y RP co-localizando en muestras de biopsias de pacientes con astrocitomas de grado IV.

11A

Hoechst                      RP                      PKC $\alpha$                       PKC $\alpha$ /RP



11B



**Figura 11. Co-localización del RP y PKC $\alpha$ .** 11A) Las muestras fueron preparadas para inmunofluorescencia, las cuales fueron incubadas con los anticuerpos anti-RP y anti-PKC $\alpha$  seguidos de anticuerpos secundarios anti-IgG-ratón acoplado a Alexa 488 y anti-IgG-conejo acoplado a Alexa 594 respectivamente. PKC $\alpha$  se muestra en verde, RP en rojo y Hoescht fue usado para la tinción de núcleos en azul. Se muestra también el merge de las imágenes PKC $\alpha$  / RP, la co-localización de las células positivas para ambas proteínas se muestra como las áreas en naranja. 11B) La gráfica muestra los resultados como el porcentaje de células de astrocitomas grado IV que fueron positivas para RP, PKC y la co-localización PKC $\alpha$ /RP. Los porcentajes se obtuvieron de las células positivas para cada proteína con respecto al número de núcleos totales (Hoechst), en el caso de la co-localización, el porcentaje se obtuvo de las células positivas para PKC $\alpha$  en relación a las positivas para RP. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. con una n=6. \*p<0.0031 vs Hoechst.

## 9. Discusión

En el presente trabajo se buscó evaluar el papel de las PKCs sobre los procesos de proliferación y migración mediados por el RP en la línea celular U373, derivada de astrocitomas humanos grado III. La fosforilación del RP incrementa su actividad transcripcional y/o lo dirige a sitios específicos como SP1 que es un factor de transcripción humano implicado en la expresión génica (Faivre et al, 2008). La fosforilación del receptor también es clave para su localización intracelular, la formación de complejos proteicos y el marcaje para su degradación por la vía del proteosoma 26S (Qui et al; 2003; Pierson Mullany y Lange, 2005; Faivre et al, 2008; Yang et al. 2003).

Hasta el momento se conocen 4 tipos de cinasas que pueden fosforilar al RP humano en 15 sitios diferentes, estas cinasas son la CK2, la CDK2, las MAPK y la GSK-3 $\beta$  (Zang et al, 1994; Lange et al, 2000; Knotts et al, 2001; Wang et. Al, 2013). Además trabajos previos en nuestro laboratorio sugieren que PKC $\alpha$  fosforila al RP en la Ser400, esto se determinó utilizando siRNAs para inhibir la expresión de dicha isoforma y posteriormente se identificó su participación en la fosforilación del RP mediante citometría de flujo (González Arenas et al, 2013) incrementando su actividad transcripcional y su degradación.

Las PKCs son cinasas involucradas en una gran variedad de fenómenos tanto fisiológicos como patológicos. Debido a su diversidad de sustratos juegan un papel central en la señalización de la proliferación, diferenciación, apoptosis y angiogénesis. Por lo tanto, la desregulación de la actividad de estas cinasas se ha visto implicada en procesos patológicos como el cáncer, sus isoenzimas tienen funciones variables en la biología del tumor que en parte dependen del tipo de célula y la localización intracelular; existen estudios recientes con la técnica de bloqueo de genes, donde se muestra que PKC está implicada en procesos cancerígenos (El Rayes et al, 2008; Kanopatskaya y Poole, 2009). Sus isoenzimas desempeñan diferentes papeles en el desarrollo de los gliomas, por ejemplo; las PKCs  $\alpha$  y  $\delta$  se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos, por medio de las técnicas Western blot y microscopia de inmunofluorescencia en la línea U251 de glioma humano, y en el caso de PKC $\epsilon$  se utilizaron métodos de silenciamiento con siRNAs en células de glioma U87 y U251 (Sarkar y Yong, 2009; Sharit, 1999; Okhrimenko et al., 2005). Sin

embargo, estas funciones son tejido dependientes, por lo que la actividad desregulada de las PKCs no siempre es indicador de los mismos efectos (El Rayes et al, 2008).

Como primer objetivo de este trabajo se buscó evaluar el papel que desempeña la PKC en la proliferación mediada por el RP en la línea celular U373, mediante el ensayo de detección de BrdU, el porcentaje del efecto observado con el vehículo fue tomado como la proliferación basal de referencia, la cual fue aproximadamente de un 40%, y con respecto a esta proliferación basal, se observó un efecto significativo 24 h después de activar a PKC directamente con TPA, este porcentaje de proliferación fue de 80%, prácticamente el doble con respecto al vehículo. En el caso del tratamiento de TPA+RU486 se observó que el efecto de proliferación inducido por TPA al activar PKC disminuyó por efecto de la adición previa de RU486 (antagonista del RP), el porcentaje de inhibición inducido por el RU486 sobre el efecto de proliferación fue de un 30%. Estos datos son mostrados en las figuras 9A, 9B y 9C.

En estudios anteriores en el laboratorio se demostró que la P4 mediante su receptor, induce la proliferación de las líneas U373 y D54 (González Agüero et al, 2001). También se demostró que el RU486 administrado a ratones inoculados con células U373 en la corteza frontal del cerebro, reduce el crecimiento tumoral inducido por P4 (Germán Castelán, en preparación). El hecho de que la activación del RP ya sea por su ligando o independientemente de este induzca la proliferación y que el tratamiento con RU486 reduzca este efecto, sugiere que este proceso es mediado por el RP. Por otra parte se corrobora que las PKCs están involucradas en procesos patológicos a través de diferentes vías de señalización. Lo anterior coincide con lo reportado en la literatura en donde PKC participa activamente en procesos de proliferación; como es el caso de PKC $\epsilon$  que en las líneas celulares U87, U251 y LN-229 derivadas de gliomas induce la proliferación y la evasión de la apoptosis (Okhrimenko et al. 2005). Con estos datos podemos sugerir que la activación de PKC es importante para mediar los efectos inducidos por el RP, y por otra parte vemos que al usar RU486 podemos regular la actividad de PKC sobre el RP lo que nos podría permitir regular a la baja los efectos patológicos en los que está involucrada PKC.

Posteriormente se busco evaluar el papel de la PKC en el efecto de migración mediado por el RP en la línea celular U373, mediante el ensayo “scratch wound”, de la misma forma que en el experimento anterior, se observó un efecto significativo en el aumento de la migración con el TPA comparado con el vehículo a las 24 y 48 h de tratamiento, mientras que el pretratamiento con RU486 antes del TPA disminuyó significativamente la migración a las 48 h en un 50%, como se puede observar en las figuras 10A y 10B. Estudios anteriores reportados en la literatura hablan acerca del papel de PKC sobre el efecto de la migración, específicamente de la isoenzima PKC $\alpha$ , se ha comprobado *in vitro* por medio de la técnica scratch wound y silenciamiento con siRNAs que la activación de PKC $\alpha$  por medio de TPA activa las vías ERK y NF $\kappa$ B, y esto a su vez induce la activación de metaloproteasas que aumentan la migración e invasión de células de glioma GBM8401(Lin et al, 2010). A pesar de que nuestro ensayo no nos permite identificar que isoenzima está participando en la migración observada, gracias a los antecedentes (González-Arenas et al; en preparación) se puede sugerir que PKC $\alpha$  es la que podría estar induciendo este efecto aumentando la actividad transcripcional del RP por fosforilación en la línea U373.

Como se mencionó anteriormente en experimentos previos realizados por nuestro grupo de trabajo se observó una asociación basal de PKC $\alpha$  con el RP que aumenta a los 5 min de tratamiento con TPA; así como también se determinó la localización intracelular de PKC $\alpha$  y el RP, encontrando a ambas tanto en citoplasma como en el núcleo de la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos grado III (González-Arenas; 2014 enviado). En este trabajo se buscó determinar la localización de estas proteínas en biopsias de pacientes con astrocitomas grado IV y el porcentaje de co-localización en este tipo de tumores. En los resultados obtenidos se observó que en las biopsias se obtuvieron células positivas para ambas proteínas, en los siguientes porcentajes, para PKC $\alpha$  70% y para RP 80%, también se observó que el 70% de las células positivas para ambas proteínas (PKC $\alpha$ /RP), co-localizan en biopsias de astrocitomas grado IV.

Los resultados en conjunto, demuestran la importancia de la participación de PKC en la activación del RP, lo que nos permite comprender que esta interacción está relacionada con procesos patológicos en estas

células tumorales, y que el grado de expresión que presentan estas proteínas en dichas células puede estar relacionado con el grado de evolución de los astrocitomas. Estos datos resultan relevantes para la búsqueda y el estudio de blancos terapéuticos para esta y otros tipos de patologías, en donde tanto el RP como las PKCs juegan un papel importante en los procesos de proliferación y migración de células tumorales.

## 10. Conclusiones

La activación de las PKCs induce los procesos de proliferación y migración de la línea celular U373, mediados por el RP.

La proliferación y migración inducidas por TPA disminuyen en un 30% y 50% respectivamente, al inhibir al RP.

El 70% de las células de astrocitomas de grado IV expresan tanto RP como PKC $\alpha$ .

## 11. Referencias

Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G. S., Tung, L. & Horwitz, K. B. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem* 277, 33950-6 (2002).

Beck, C. A., Weigel, N. L., & Edwards, D. P. (1992). Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol*, 6(4), 607–620.

Boonyaratanakornkit, V., McGowan, E., Sherman, L., Mancini, M. A., Cheskis, B. J., & Edwards, D. P. (2007). The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol*, 21(2), 359–375.

Boyle, D. M., & Van Der Walt, L. A. (1988). Enhanced phosphorylation of progesterone receptor by protein kinase C in human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry*, 30, 239–244.

Cabrera-Munoz, E., Gonzalez-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., Garcia-Becerra, R., & Camacho-Arroyo, I. (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113(1-2), 80–84.

Cabrera-Munoz, E., Hernandez-Hernandez, O. T., & Camacho-Arroyo, I. (2011). Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem*, 11(13), 1663–1667.

Cabrera-Muñoz, E., Fuentes-Romero, L. L., Zamora-Chávez, J., Camacho-Arroyo, I., & Soto-Ramírez, L. E. (2012). Effects of progesterone on the content of CCR5 and CXCR4 coreceptors in PBMCs of seropositive and exposed but uninfected Mexican women to HIV-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 132(1-2), 66–72.

Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pelaprat, D., & Di Paolo, T. (2001). Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse*, 41(2), 131–138.

Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Dominguez, R., Mendoza-Rodriguez, C. A., Cruz, M. E., & Cerbon, M. A. (1998). C-fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci*, 62(13), 1153–1159.

Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A. M., & Cerbon, M. A. (1996). Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett*, 214(1), 25–28.

Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A. M., Perez-Palacios, G., & Cerbon, M. A. (1995). Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin*, 47(4), 329–340.

Camacho-Arroyo, I., Villamar-Cruz, O., Gonzalez-Arenas, A., & Guerra-Araiza, C. (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 76(5), 267–271.

Cervantes, M., Gonzalez-Vidal, M. D., Ruelas, R., Escobar, A., & Morali, G. (2002). Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res*, 33(1), 6–14.

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

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

Conneely, O. M., Maxwell, B. L., Toft, D. O., Schrader, W. T., & O'Malley, B. W. (1987). The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 149(2), 493–501.

Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Threadgill, D. W., Magnuson, T., & Yuspa, S. H. (1996). Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J Biol Chem*, 271(10), 5325–5331.

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

Engel, S. R., Purdy, R. H., & Grant, K. A. (2001). Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone. *J Pharmacol Exp Ther*, *297*(2), 489–495.

Faivre, E. J., Daniel, A. R., Hillard, C. J., & Lange, C. A. (2008). Progesterone Receptor Rapid Signaling Mediates Serine 345 Phosphorylation and Tethering to Specificity Protein 1 Transcription Factors. *Molecular Endocrinology Baltimore Md*, *22*, 823–837.

Felix, C. A., Slavic, I., Dunn, M., Strauss, E. A., Phillips, P. C., Rorke, L. B., et al. (1995). p53 gene mutations in pediatric brain tumors. *Med Pediatr Oncol*, *25*(6), 431–436.

Furnari, F. B. et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. *21*, 2683-2710.

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

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

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

Gonzalez-Aguero, G., Gutierrez, A. A., Gonzalez-Espinosa, D., Solano, J. D., Morales, R., Gonzalez-Arenas, A., et al. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, *32*(2), 129–135.

Gonzalez-Aguero, G., Ondarza, R., Gamboa-Dominguez, A., Cerbon, M. A., & Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull*, *56*(1), 43–48.

Gonzalez-Arenas, A., Aguilar-Maldonado, B., Avendano-Vazquez, S. E., & Garcia-Sainz, J. A. (2006). Estrogens cross-talk to alpha1b-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*, *70*(1), 154–162.

Gonzalez-Arenas, A., Villamar-Cruz, O., Guerra-Araiza, C., & Camacho-Arroyo, I. (2003). Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *85*(1), 25–31.

González-Morán, M. G., González-Arenas, A., Germán-Castelán, L., & Camacho-Arroyo, I. (2013). Changes in the content of sex steroid hormone receptors in the growing and regressing ovaries of *Gallus domesticus* during development. *General and Comparative Endocrinology*, *189C*, 51–58.

Graham, J. D., & Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, *18*(4), 502–519.

Guerra-Araiza, C., Gomora-Arrati, P., Garcia-Juarez, M., Armengual-Villegas, A., Miranda-Martinez, A., Lima-Hernandez, F. J., et al. (2009). Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology*, *90*(1), 73–81.

Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., Gonzalez-Arenas, A., Chavira, R., & Camacho-Arroyo, I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol*, *15*(10), 984–990.

Gueven N, Lavin MF, Kozlov S, Peng C, Birrell G, Chen P, Scott S. (2005). Atm and cellular response to DNA damage. *Med Biol*. 2005;570:457-76

Hagan, C. R., Daniel, A. R., Dressing, G. E., & Lange, C. A. (2012). Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol Cell Endocrinol*, *357*(1-2), 43–49.

Hernandez-Hernandez, O. T., & Camacho-Arroyo, I. (n.d.). Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF. *Mini Rev Med Chem*, *13*(5), 635–642.

Hernandez-Hernandez, O. T., Gonzalez-Garcia, T. K., & Camacho-Arroyo, I. (2012). Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *132*(1-2), 127–134.

Huang, H.-D., Lee, T.-Y., Tzeng, S.-W., & Horng, J.-T. (2005). KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research*, *33*, W226–W229.

Inoue, T., Akahira, J.-I., Suzuki, T., Darnel, A. D., Kaneko, C., Takahashi, K., et al. (2002). Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(11), 5325–31.

Kajimoto, T., Sawamura, S., Tohyama, Y., Mori, Y., & Newton, A. C. (2010). Protein kinase C delta-specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases. *J Biol Chem*, *285*, 41896–41910.

Khalid, H., Shibata, S., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Iseki, M., & Hiura, T. (1997). Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer*, *80*(11), 2133–2140.

Knotts, T. A., Orkiszewski, R. S., Cook, R. G., Edwards, D. P., & Weigel, N. L. (2001). Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem*, *276*(11), 8475–8483.

Konopatskaya, O., & Poole, A. W. (2009). Protein kinase Calpha: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci*, *31*(1), 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*(2), 269–278.

Lange, C. A., Shen, T., & Horwitz, K. B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(3), 1032–1037.

Li, W., Yu, J. C., Shin, D. Y., & Pierce, J. H. (1995). Characterization of a protein kinase C-delta (PKC-delta) ATP binding mutant. An inactive enzyme that competitively inhibits wild type PKC-delta enzymatic activity. *J Biol Chem*, *270*(14), 8311–8318.

Lim, C. S., Baumann, C. T., Htun, H., Xian, W., Irie, M., Smith, C. L., & Hager, G. L. (1999). Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol*, *13*(3), 366–375.

Lin, C. W., Shen, S. C., Chien, C. C., Yang, L. Y., Shia, L. T., & Chen, Y. C. (n.d.). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKC $\alpha$ /ERK/NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 expression. *J Cell Physiol*, *225*(2), 472–481.

Liu, Z., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (2001). Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(22), 12426–12431.

Mackay, H. J., & Twelves, C. J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer*, *7*(7), 554–562.

Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Galbiati, M., & Martini, L. (2001). Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int Rev Neurobiol*, *46*, 145–176.

Murphy, L. J., Sutherland, R. L., Stead, B., Murphy, L. C., & Lazarus, L. (1986). Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res*, *46*(2), 728–734.

Musgrove, E. A., Lee, C. S., & Sutherland, R. L. (1991). Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol*, *11*(10), 5032–5043.

Newton, A. C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, *9*(2), 161–167.

Nguyen, J. P., Caron, J. P., Gaston, A., Louarn, F., & Poirier, J. (1984). [Anatomo-radiological correlations in astrocytic cerebral tumors]. *Neurochirurgie*, *30*(1), 11–15.

Nilsen, J., & Brinton, R. D. (2002). Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*, *143*(1), 205–212.

Okhrimenko-H et al. (2005). Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. *Cancer Res*, 15,65(16), 7301-9.

Pierson-Mullany, L. K., & Lange, C. A. (2004). Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol Cell Biol*, 24(24), 10542–57.

Rowan, B. G., Weigel, N. L., & O'Malley, B. W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 275(6), 4475–4483.

Sarkar, S., & Yong, V. W. (2009). Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix. *J Neurooncol*, 91(2), 157–164.

Sarkar, S., & Yong, V. W. (2010). Reduction of protein kinase C delta attenuates tenascin-C stimulated glioma invasion in three-dimensional matrix. *Carcinogenesis*, 31(2), 311–317.

Schumacher, M., Coirini, H., Robert, F., Guennoun, R., & El-Etr, M. (1999). Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res*, 105(1), 37–52.

Sharif, T. R., & Sharif, M. (1999). Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J Oncol*, 15(2), 237–243.

Shen, T., Horwitz, K. B., & Lange, C. A. (2001). Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol*, 21(18), 6122–6131.

Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*, 88(4), 1341–1378.

Takimoto, G. S., Hovland, A. R., Tasset, D. M., Melville, M. Y., Tung, L., & Horwitz, K. B. (1996). Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem*, 271(23), 13308–13316.

Tata, J. R. (2002). Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9), 702–710.

Truman JP, Gueven N, Lavin M, Leibel S, Kolesnick R, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A. Down-regulation of ATM protein sensitizes human prostate cancer cells to radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):23262-72

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

Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R., & Camacho-Arroyo, I. (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(3), 276–281.

Wang, S., Li, Y., Hsu, P.-H., Lee, S.-Y., Kim, Y., & Lee, E. Y.-H. P. (2013). Progesterone receptor A stability is mediated by GSK-3 $\beta$  kinase in the Brca1-deficient mammary gland. *J Biol Chem*.

Zhang, Y., Beck, C. A., Poletti, A., Clement, J. P. th, Prendergast, P., Yip, T. T., et al. (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(6), 823–832.

Zhang, Y., Beck, C. A., Poletti, A., Edwards, D. P., & Weigel, N. L. (1994). Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem*, 269(49), 31034–31040.

Zhang, Y., Beck, C. A., Poletti, A., Edwards, D. P., & Weigel, N. L. (1995). Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol*, 9(8), 1029–1040.

Zwain, I. H., & Yen, S. S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140(8), 3843–3852.