



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Participación del receptor a estrógenos beta y de la proteína cinasa C
alfa en el desarrollo de los meduloblastomas**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Rubí Hernández Rojas

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Aliesha Araceli González Arenas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México, marzo, 2019



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.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con las claves IA201215 e IA200718.

A las doctoras de mi comité tutor, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. María de Lourdes Álvarez y el Dr. Pedro Francisco Valencia Mayoral (Hospital Infantil de México, Federico Gómez) por la donación de muestras de meduloblastoma.

A las Doctoras integrantes del jurado evaluador de este trabajo: Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, Dra. Rocío Ángeles García Becerra, Dra. María Elena Ibarra Rubio, Dra. Marcela Lizano Soberón y Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg.

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada como alumna del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

ÍNDICE

1. Índice de figuras y tablas.....	1
2. Índice de tablas.....	3
3. Abreviaturas.....	4
4. Resumen.....	6
5. Abstract.....	8
6. Introducción.....	9
7. Antecedentes.....	10
7.1 Meduloblastomas.....	10
Definición y epidemiología.....	10
Diagnóstico y tratamiento.....	11
Clasificación.....	12
Origen de los meduloblastomas.....	16
7.2 Receptores a estrógenos (RE).....	17
Función y estructura de los RE.....	17
El RE β y sus isoformas.....	18
Mecanismo de acción de los RE.....	20
El RE β en meduloblastomas.....	22
7.3 Proteína cinasa C (PKC).....	27
Características de las PKC.....	27
PKC en meduloblastomas.....	29
8. Planteamiento del problema.....	30
9. Hipótesis.....	30
10. Objetivos.....	30
11. Procedimientos experimentales.....	31
Cultivo celular y tratamientos.....	31
Proliferación.....	31
Inmunoprecipitación.....	33
Western blot.....	34
Determinación de la localización del RE β , la PKC α y δ en la línea celular DAOY mediante Inmunofluorescencia.....	35
Evaluación del contenido del RE β , la PKC α y δ en muestras de meduloblastoma mediante Inmunofluorescencia.....	36
Correlación de Spearman de la expresión de las proteínas RE β -PKC α y RE β -PKC δ en muestras de meduloblastoma.....	37

Análisis estadístico	37
12. Resultados	38
Evaluación del papel del RE β en la proliferación de la línea celular DAOY.....	38
Contenido del RE β en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico	38
Determinación de la localización subcelular del RE β y de la PKC α tras la activación de PKCs clásicas y nuevas en la línea celular DAOY.....	40
Evaluación del efecto de la activación de las PKCs clásicas y nuevas sobre la proliferación de la línea celular DAOY.....	43
Determinación de la localización subcelular del RE β y de la PKC δ tras la activación de PKCs en la línea celular DAOY.....	47
Contenido de PKC α y PKC δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico.....	51
Correlación de Spearman del contenido de las proteínas RE β -PKC α y RE β -PKC δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico	51
13. Discusión de resultados.....	55
14. Conclusiones.....	60
15. Perspectivas.....	60
16. Referencias.....	61

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Imagen de resonancia magnética característica del meduloblastoma	11
Fig. 2. Microfotografías de las variantes histológicas de los meduloblastomas	13
Fig. 3. Estructura y homología de los RE	19
Fig. 4. Representación esquemática de las isoformas del RE β humano (hRE β).....	20
Fig. 5. Mecanismo de acción de los RE.....	21
Fig. 6. Sitios de fosforilación del RE β humano.....	22
Fig. 7. Expresión relativa del gel del RE β (ESR2) en meduloblastomas de clasificación molecular respecto a la expresión en tejido sano cerebelar.....	23
Fig. 8. Características estructurales de las PKC.....	28
Fig. 9. Expresión relativa del gel de la PKC α (PRKCA) en meduloblastomas de clasificación molecular respecto a la expresión en tejido sano cerebelar.....	29
Fig. 10. El agonista del RE β , DPN, incrementa significativamente el número celular y el contenido del RE β en la línea celular DAOY.....	39
Fig. 11. El agonista del RE β , DPN, incrementa significativamente la incorporación de BrdU en la línea celular DAOY.....	40
Fig. 12. El antagonista del RE β , PHTPP, bloquea el incremento en la proliferación celular inducido por el DPN.....	41
Fig. 13. Las muestras de meduloblastoma clásico presentan contenido del RE β significativamente mayor que el cerebelo sano.....	42
Fig. 14. El tratamiento con TPA induce la translocación de la PKC α al núcleo de células DAOY.....	43
Fig. 15. El tratamiento con TPA disminuye significativamente la proliferación de la línea celular DAOY.....	45
Fig. 16. El tratamiento con Gö 6976 1 μ M bloquea la proliferación de la línea celular DAOY.....	46
Fig. 17. El tratamiento con rotlerina 1 μ M bloquea la proliferación de la línea celular DAOY.....	48

Fig. 18. El tratamiento con TPA induce la translocación de la PKC δ al núcleo de células DAOY	49
Fig. 19. El tratamiento con TPA incrementa la inmunoprecipitación de PKC δ con el RE β	50
Fig. 20. El tratamiento con TPA disminuye el contenido de PKC α y δ en la línea celular DAOY.....	50
Fig. 21. El incremento en el contenido de PKC α y δ en meduloblastoma desmoplásico y clásico es poco frecuente.....	52
Fig. 22. Coeficiente de correlación de Spearman: RE β -PKC α	53
Fig. 23. Coeficiente de correlación de Spearman: RE β -PKC δ	54
Fig. 24. Mecanismo por el cual PKC α y PKC δ median la disminución en la proliferación de la línea celular DAOY.....	59

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación molecular de los meduloblastomas.....	15
Tabla II. Comparación de los ensayos <i>in vitro</i> del efecto del E2 en la proliferación de líneas celulares de meduloblastoma.....	25
Tabla III. Comparación de los ensayos en xenoinjertos de células D-283-Med para evaluar la relevancia del RE β en los meduloblastomas	26
Tabla IV. Compuestos utilizados en los tratamientos celulares.....	33
Tabla V. Características clinicopatológicas de las biopsias analizadas.....	37

3. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Función de activación
Akt	Proteína cinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ASB	Albúmina sérica bovina
BrdU	Bromodesoxiuridina
CaMK	Cinasa dependiente de calcio/calmodulina
CHK	Cinasa de control
DAG	Diacilglicerol
DBD	Dominio de unión a ligando
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
E2	Estradiol
EC ₅₀	Concentración efectiva 50
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
IGFR1	Receptor del factor de crecimiento epidermal insulínico tipo 1
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FT	Factor de transcripción
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IRM	Imagen por resonancia magnética nuclear
JAK	Cinasa de Janus
kDa	Kilo Daltones
LBD	Dominio de unión a ligando
LCR	Líquido cefalorraquídeo
mA	Mili Amperios
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKAP-K2	Proteína cinasa 2 activada por la proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína cinasa de la cinasa activada por mitógenos
MNAR	Modulador no genómico de los receptores a estrógenos

MYC	Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar V-myc
OMS	Organización Mundial de la Salud
PANCAN	Pancreatic Cancer Action Network por sus siglas en inglés
PBS	Solución buffer de fosfatos
PDE	Eukaryotic promoter database por sus siglas en inglés
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PS	Fosfatidilserina
RE	Receptor a estrógenos
RPS6KA3	Proteína cinasa S6 ribosomal A3
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SHH	Sonic hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SP1	Proteína estimuladora 1
TBS	Solución amortiguadora Tris
TGCA	The Cancer Genome Atlas por sus siglas en inglés
Thr	Treonina
TP53	Proteína tumoral p53
Tyr	Tirosina
Trk	Cinasas relacionadas con tropomiosina
WNT	Wingless

4. RESUMEN

Los meduloblastomas son los tumores cerebrales pediátricos más comunes y malignos. El receptor a estrógenos beta (RE β) es un factor posiblemente asociado al desarrollo de estos tumores al promover la proliferación de las células que los originan; además, este receptor puede ser fosforilado por la proteína cinasa C alfa (PKC α), sin embargo, se desconoce el efecto que esta modificación postraduccional podría tener sobre el RE β .

El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación del RE β y la PKC α en el desarrollo de los meduloblastomas, así como su interacción para regular procesos celulares como la proliferación.

Se sabe que la PKC α se asocia y fosforila al RE β en la línea celular DAOY derivada de un meduloblastoma humano con características desmosplásicas, por lo que se procedió a estudiar el papel de ambas proteínas en la proliferación de estas células. Mediante ensayos de exclusión por azul de tripano e incorporación de BrdU se observó que el agonista del RE β , DPN, incrementó la proliferación celular después de 72 horas de tratamiento, misma que fue bloqueada por el antagonista del RE β , PHTPP. En biopsias derivadas de meduloblastoma desmoplásico y clásico, mediante inmunofluorescencia, se encontró que este último grupo presentó un contenido del RE β significativamente mayor respecto al tejido sano. Estos resultados sugieren que el RE β está implicado en la promoción de la proliferación de la línea celular DAOY y posiblemente de los meduloblastomas clásicos provenientes de pacientes.

En lo referente a la participación de la PKC α , utilizando la técnica de inmunofluorescencia se observó que la activación de las PKCs clásicas y nuevas con un éster de forbol, induce la translocación de esta cinasa al núcleo en las células DAOY, en donde se localiza principalmente el RE β , lo cual sugiere que el receptor y las proteínas cinasas pueden interactuar. Mediante el ensayo de exclusión por azul de tripano e incorporación de BrdU, se observó que la activación de estas cinasas disminuyó significativamente la proliferación celular, efecto que se vio potenciado por el bloqueo del RE β . Contrario a lo que había sido reportado con anterioridad, mediante western blot se encontró que la línea celular utilizada contiene abundantemente PKC δ , por lo que se evaluó la asociación entre esta proteína y el RE β . En este sentido, se encontró que la activación de PKCs induce la translocación de PKC δ al núcleo, además de que incrementa el contenido de la cinasa inmunoprecipitada con el RE β , lo que indica que ambas proteínas interactúan.

Al evaluar el contenido de la PKC α y δ mediante inmunofluorescencia en las muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico, se observó que la mayoría de ellas presentaban contenidos de estas proteínas cinasas similares a las encontradas en tejido cerebelar sano. No se encontró correlación de Spearman significativa entre el contenido del RE β y el de las cinasas evaluadas. A pesar de que no existe relación en el contenido de las proteínas estudiadas, no se puede descartar la regulación de las PKCs sobre el RE β , determinada por el estado de activación de las mismas.

De manera general, los resultados obtenidos indican que el RE β participa en la promoción de la proliferación de la línea celular DAOY y posiblemente de los meduloblastomas clásicos; además, la fosforilación de este receptor por PKC α , y probablemente por PKC δ , reduce la proliferación de la línea celular DAOY.

5. ABSTRACT

Medulloblastomas are the most common and aggressive pediatric brain tumors. Estrogen receptor beta ($ER\beta$) has been associated with development of these tumors due to its contribution to proliferation promotion of cells that originates them. Moreover, protein kinase C alpha ($PKC\alpha$) is able to phosphorylate it; however, the effect of this posttranslational modification on $ER\beta$ is unknown.

The aim of this work was to study the role of $ER\beta$ and $PKC\alpha$ in medulloblastoma development, as well as their interaction to regulate cellular proliferation using DAOY cell line.

Through trypan blue exclusion method and BrdU incorporation, we observed that the $ER\beta$ agonist, DPN, significantly increased proliferation after 72 hours of treatment, which was blocked by the $ER\beta$ antagonist, PHTPP. In classic and desmoplastic medulloblastoma biopsies, using immunofluorescence, a significantly higher $ER\beta$ content was found compared to cerebellar health tissue. These results suggest that $ER\beta$ is implicated in proliferation of DAOY cells and possibly in classic medulloblastoma.

Regarding $PKC\alpha$ role, through immunofluorescence assay it was observed that classic and novel PKCs activation with a phorbol ester, induced $PKC\alpha$ translocation to nucleus, where it can interact with $ER\beta$. In addition, PKCs activation significantly diminished DAOY cells proliferation, effect that was enhanced by $ER\beta$ blocking.

Contrary to what was previously reported, it was observed that DAOY cell line abundantly express $PKC\delta$, so it was decided to evaluate the association between this kinase and $ER\beta$. Similar to $PKC\alpha$ behavior, PKCs activation induced $PKC\delta$ translocation to nucleus and significantly increased the content of this kinase immunoprecipitated with $ER\beta$, suggesting an interaction of both proteins.

Using immunofluorescence, we observed that there was no significant difference in $PKC\alpha$ and δ content in classic and desmoplastic biopsies compared to health cerebellar tissue. In addition, there was no significant Spearman correlation between the proteins of interest; however, $ER\beta$ -regulation by PKCs cannot be discarded since it is determined by their activation state.

Overall, our results suggest that $ER\beta$ is important to promote proliferation in DAOY cells and possibly, in classic medulloblastoma. Furthermore, $ER\beta$ phosphorylation by $PKC\alpha$ could reduce proliferation of this cell line.

6. INTRODUCCIÓN

Los meduloblastomas son tumores de origen embrionario que surgen en el vermis cerebelar o en los hemisferios cerebelares. La población pediátrica es la más afectada por estos tumores, ya que son las neoplasias cerebrales más frecuentes en esta población, con picos de incidencia en niños de 3 a 6 años (Banan et al., 2017; Smoll y Drummond 2012; Brandes et al., 2009). La implementación de nuevas técnicas moleculares en los últimos años ha permitido establecer que los meduloblastomas son tumores altamente heterogéneos incluso dentro de los grupos moleculares en los que han sido clasificados; entre estas diferencias se pueden encontrar la expresión diferencial de genes, las características mutacionales, la demografía y la prognosis, por citar algunos de ellos (Rouzbeh y Harmann, 2017; Kool et al., 2012; Brandes et al., 2014). Entre los factores asociados al desarrollo de los meduloblastomas se encuentra el receptor a estrógenos β (RE β), ya que se ha visto que regula el crecimiento y la maduración de las células granulares cerebelares, las cuales dan origen a estos tumores (Belcher et al., 2008; Wong et al., 2003; Jakab et al., 2001). Se sabe que los RE llevan a cabo procesos celulares importantes en tejidos reproductivos y no reproductivos, pues regulan la proliferación y diferenciación celular de estos (Craig y Timm, 2004). Además, existen reportes que indican que la activación del RE β promueve la proliferación de líneas celulares derivadas de meduloblastomas (Belcher et al., 2009). En biopsias derivadas de estos tumores se ha reportado que sobreexpresan esta proteína respecto al contenido encontrado en muestras de cerebelo sano (Zanoni et al., 2016).

La fosforilación del RE β en sitios específicos puede modificar su actividad transcripcional: en cáncer de mama se ha visto que la fosforilación en los residuos Ser87 y Ser105 aumenta la actividad transcripcional del receptor al incrementar el reclutamiento de coactivadores transcripcionales (Pinceti et al., 2015). Mediante ensayos *in silico*, en nuestro grupo de trabajo se han identificado diferentes residuos del RE β como posibles sitios de fosforilación por la proteína cinasa C α (KC α), entre los que destacan los residuos Ser200, Ser219, Ser234 y Ser452. En ensayos de coinmunoprecipitación realizados previamente en nuestro laboratorio, se observó que existe asociación basal entre el RE β y la PKC α , así como aumento significativo en la misma después de la activación de la cinasa e incremento en el contenido del RE β fosforilado, lo cual sugiere que la PKC α participa en la fosforilación de este receptor (Hernández-Rojas, resultados sin publicar). Por lo anterior, resulta relevante estudiar si la interacción entre estas dos proteínas contribuye al desarrollo de los meduloblastomas.

7. ANTECEDENTES

7.1 MEDULOBLASTOMAS

Definición y epidemiología

Los meduloblastomas se encuentran dentro de los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) más frecuentes y malignos en infantes y niños (Rouzbeh y Hartmann, 2017), son tumores de origen embrionario y surgen en la región infratentorial, ya sea en el vermis cerebeloso con proyección al cuarto ventrículo o en los hemisferios cerebelares (Fig. 1). Debido a su localización, estas neoplasias presentan una tendencia inherente a la metástasis a través de la vía del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Brandes et al., 2009; Smoll y Drummond et al., 2012) hacia el espacio subaracnoideo y las leptomeninges (Rivera-Luna, et al., 2007), aunque también pueden diseminarse hacia otros sitios del SNC, médula ósea, hueso, hígado, nódulos linfáticos y otros sitios menos frecuentes (Svalina et al., 2016).

Los meduloblastomas representan aproximadamente el 15% de los tumores pediátricos del SNC; cerca del 70% de todos los casos son diagnosticados en pacientes con edades menores a 16 años y aproximadamente el 25% se diagnostican en pacientes con edades entre 16 y 44 años; de manera general, se observa un pico de incidencia en niños de entre 3 y 6 años (De Braganca y Millard, 2015; Ciucci et al., 2014; Smoll y Drummond, 2012). En adultos los meduloblastomas son muy poco comunes, ya que representan menos del 1% de los tumores diagnosticados en este grupo de pacientes (Kieran et al., 2010). Aunque la incidencia de los meduloblastomas en la población general es de aproximadamente 1.5/1000000/año, la probabilidad de diagnosticar estas neoplasias en la población infantil es 10 veces mayor respecto a la reportada en la población adulta, con incidencias de 6 y 0.6/1000000/año respectivamente (Brandes et al., 2014). Además de esto, durante la infancia la incidencia es mayor en hombres que en mujeres, con un cociente aproximado de 1.5:1 (Smoll y Drummond, 2012; Brandes et al., 2014).

El pronóstico de los pacientes con meduloblastomas depende de la edad, el tipo del tumor, la localización y el tamaño, entre otros factores. Aunque el tratamiento ha aumentado la tasa de supervivencia a 5 años a un 70-80% (Kijima y Kanemura, 2016), la mayoría de ellos presentan secuelas permanentes debidas tanto a la presencia del tumor como al tratamiento, entre las que destacan deterioros cognitivos y alteraciones en las funciones endócrinas, así como la aparición de neoplasias secundarias (Smoll y Drummond, 2012).

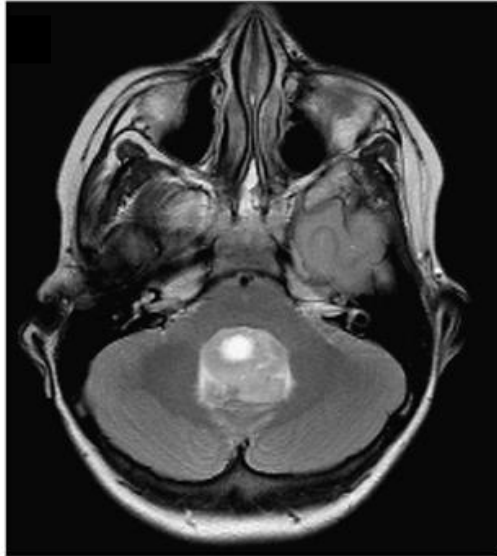


Fig. 1. Imagen de resonancia magnética característica del meduloblastoma. Tumor de origen embrionario que surge en la región infratentorial, ya sea en el vermis cerebeloso con proyección al cuarto ventrículo o en los hemisferios cerebelares. Resonancia magnética axial T2. Tomada de Martínez L., 2011.

Diagnóstico y tratamiento

Los pacientes con meduloblastoma usualmente son diagnosticados 2 a 3 meses después de que inician los síntomas, que generalmente se deben a la acumulación del LCR en el cerebro debido a que su flujo se ve bloqueado, lo cual provoca hidrocefalia y dolor de cabeza, así como náuseas, letargo, ataxia, retraso psicomotor y dificultades para alimentarse (Smoll y Drummond ,2012; De Braganca y Millard, 2015; Brandes et al., 2014; Gerber et al., 2013; Rouzbeh y Hartmann, 2017).

Para determinar el estadio del tumor y la caracterización, se recomienda realizar una imagen por resonancia magnética (IRM), en donde se puede apreciar el tumor cerebelar, con compresión en el cuarto ventrículo que bloquea el flujo del LCR. La evaluación de la citología de este líquido, así como IRM del canal espinal son necesarios para determinar posible diseminación (Brandes et al., 2009).

El tratamiento para los pacientes con meduloblastoma incluye resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia adyuvante; los ciclos e intensidad de la radioterapia, así como la dosis de la quimioterapia dependen de la extensión del tumor y la edad de los pacientes, con base en la probabilidad de recurrencia y el riesgo de daños cognitivos en los pacientes más jóvenes (De Braganca y Millard, 2015). La estratificación de los pacientes mayores a 3 años en grupos de riesgo

está basada en factores clínicos, que incluyen el estado de metástasis y la presencia o ausencia de tumor residual después de la resección. Los pacientes de riesgo promedio son aquellos con menos de 1.5 cm² de área de tumor residual y sin diseminación, mientras que los de alto riesgo presentan más de 1.5 cm² de área de tumor residual y/o diseminación. En estos grupos el tratamiento incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia adyuvante (De Braganca y Millard, 2015). Los pacientes menores a 3 años son sometidos a resección quirúrgica y quimioterapia, sin embargo, no se recomienda radioterapia debido al alto riesgo de deterioro cognitivo severo (Rutkowski et al., 2005).

La quimioterapia postoperatoria incluye, entre otros, combinaciones de vincristina, lomustina, metotrexato, citarabina, cisplatino, dacarbazina, procarbazona y ciclofosfamida (Brandes et al., 2014; Gerber et al., 2013; Rouzbeh y Hartmann, 2017). La vincristina impide la formación de microtúbulos al unirse a las subunidades α y β de la tubulina, alterando la mitosis en la metafase (Silverman y Deitcher, 2013). El metotrexato afecta la proliferación celular principalmente por la inhibición de la formación de precursores nucleótidos del ADN y ARN (Thomas et al., 2015). Se ha propuesto que la citarabina inhibe la síntesis del ADN, aunque el mecanismo aun no es claro. Por otra parte, la lomustina, el cisplatino, la dacarbazina y la procarbazona son agentes alquilantes, por lo que son capaces de unirse a las cadenas del ADN y ARN e impedir la replicación y transcripción, al igual que la ciclofosfamida tras su activación, pues se trata de un profármaco (Chakkat et al., 2015).

Clasificación

Clasificación histológica

De acuerdo con su histología, los meduloblastomas han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en clásicos, desmoplásicos/nodulares, de nodularidad extensiva y de células grandes/anaplásicos (Fig. 2) (Gupta et al., 2017; Rouzbeh y Hartmann, 2017), todos ellos categorizados como tumores de grado IV, que corresponde a neoplasias citológicamente malignas típicamente asociadas a una rápida evolución pre y postoperatoria y pronóstico fatal (Rouzbeh y Hartmann, 2017).

Los meduloblastomas con histología clásica son los más comunes tanto en la población pediátrica como en adultos, ya que representan el 80% de los casos en niños y el 70% en adultos. Se caracterizan por presentar células pequeñas con forma redonda u ovalada, núcleo hipercromático, escaso citoplasma, pleomorfismo nuclear incrementado, desdiferenciadas y densamente

empacadas, con índices elevados de proliferación (Gupta et al., 2017; De Braganca y Millard, 2015; Brandes et al., 2009).

Los meduloblastomas desmoplásicos/nodulares representan el 15% en la población pediátrica y del 30 al 40% en adultos. Se caracterizan por presentar desmoplasia generalizada con células embrionarias desdiferenciadas y nódulos pobres en reticulina (islas pálidas), en donde se encuentran células de diferenciación neurocítica embebidas en una matriz fibrilar, rodeadas de células densamente empacadas y mitóticamente activas. Esta variante presenta una baja tasa de crecimiento (Gupta et al., 2017; De Braganca y Millard, 2015; Ellison, 2010; Brandes et al., 2009; Giangaspero et al., 1999).

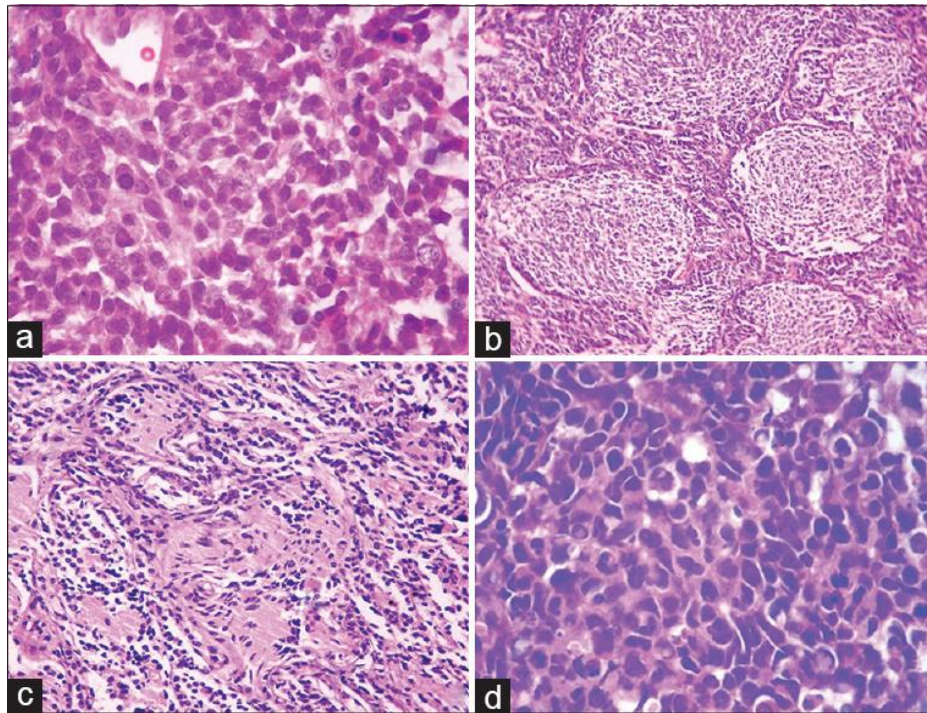


Fig. 2. Microfotografías de las variantes histológicas de los meduloblastomas: a) Meduloblastoma clásico, b) desmoplásico/nodular, c) con nodularidad extensiva y d) de células grandes/ anaplásico. Tinción hematoxilina-eosina x400. Tomada de Gupta T., et al., 2017.

Los meduloblastomas de nodularidad extensa representan aproximadamente el 3% de los casos diagnosticados. Estos están estrechamente relacionados con los meduloblastomas desmoplásicos, y se distinguen de ellos por exhibir una arquitectura lobular expandida, con zonas libres de reticulina ricas en tejido tipo neurópilo y células pequeñas. Las regiones internodulares ricas en reticulina son un componente minoritario en esta variante. (Gupta et al., 2017; Brandes et al., 2009; Louis et al., 2007).

De manera general, se ha visto que los pacientes con meduloblastomas desmoplásicos o de nodularidad extensiva tienen un mejor pronóstico respecto a las otras variantes debido a que exhiben una forma más diferenciada (Rouzbeh y Hartmann, 2017; Brandes et al., 2014).

Finalmente, la variante de células grandes/anaplásicos representa del 10 al 20% de los casos diagnosticados. Se caracterizan histológicamente por células esféricas con núcleo grande, redondo y vesicular, así como nucleolo central prominente, con un grado de atipia pronunciado y generalizado, con mitosis y apoptosis muy frecuentes (De Braganca y Millard, 2015; Ellison, 2010; Brandes et al., 2009; Louis et al., 2007). Es importante mencionar que esta variante está compuesta por las que fueron dos variantes diferentes hasta 2016: la variante de células grandes y la variante anaplásica (Gupta et al., 2017; Rouzbeh y Hartmann, 2017).

Clasificación molecular

Estudios de perfil transcripcional y análisis de metilación del genoma completo han permitido clasificar a los meduloblastomas en al menos 3 grupos moleculares: Wingless (WNT) activada, Sonic Hedhehog (SHH) activada y No WNT/ No SHH; este último comprende los subgrupos 3 y 4 (Rouzbeh y Hartmann, 2017). Estos grupos moleculares poseen diferentes características citogenéticas, mutacionales, de expresión de genes, histología, demografía y prognosis (Tabla 1) (Kool et al., 2012; Brandes et al., 2014; Perreault et al., 2014; De Braganca y Millard, 2015). La identificación molecular permite predecir el pronóstico y las características clínicas con mayor exactitud respecto a la identificación histopatológica, por lo cual en la actualidad se recomienda realizar la caracterización de cada tumor de acuerdo con ambas clasificaciones (Rouzbeh y Hartmann, 2017).

Los meduloblastomas WNT activada se caracterizan por presentar aberraciones en los genes involucrados en la vía de señalización WNT/ β catenina, lo cual provoca un aumento en la activación de esta. Usualmente exhiben un fenotipo histológico clásico, aunque se pueden encontrar tumores de células grandes/anaplásicos. Los pacientes con meduloblastomas de esta variante presentan tasas de supervivencia a los 5 años superiores al 80%, entre otras características debido a que menos del 10% presenta metástasis al momento del diagnóstico y responden mejor al tratamiento respecto a los otros grupos, por lo que son considerados tumores de menor riesgo (Rouzbeh y Hartmann, 2017). Este grupo es el menos común, pues corresponde al 10% de los meduloblastomas en niños y 15% en adultos (Remke et al., 2011).

El grupo SHH activada está asociado a mutaciones somáticas en los genes de la vía SHH. Este tipo de tumores presentan mayor metástasis que los tumores WNT, pero menor que los grupos 3 y 4 (De Braganca y Millard, 2015), corresponden al 30% de los meduloblastomas; se presentan principalmente en adultos (60%) y en niños menores de 3 años. La tasa de supervivencia a los 5 años es aproximadamente del 70% (Brandes et al., 2014). En este grupo los pacientes con tumores sin mutaciones en TP53 (codifica la proteína supresora tumoral; las mutaciones en este gen ha sido asociadas con varios tipo de cáncer humano), son clasificados en el grupo de riesgo estándar, mientras que aquellos con mutaciones en este gen se encuentran en el grupo de alto riesgo. Los primeros comprenden fenotipos histológicos desmoplásicos y de nodularidad extensiva, mientras que los segundos generalmente presentan fenotipos de células grandes/anaplásicos (Rouzbeh y Hartmann, 2017; Li et al., 2013).

Tabla I. Clasificación molecular de los meduloblastomas. NI: no identificada, H: hombres, M: mujeres, C: clásicos, CGA: células grandes/anaplásicos, DN: desmoplásicos/nodulares, NE: nodularidad extensiva. Editada de De Braganca y Millard, 2015.

	WNT	SHH	No WNT/No SHH	
			Grupo 3	Grupo 4
Vías de señalización asociadas	Wnt/ β -catenina	Sonic Hedgehog	NI	NI
Incidencia	10%	30%	25%	35%
Tasa H:M	1:1	1:1	2:1	2:1
Histología	C, CGA	DN, NE	CGA, C	CGA, C
Metástasis	<10 %	> 10%	45%	30-40%
Sobrevivencia a los 5 años	95% niños 80% adultos	70%	40-50%	75%

En el caso del grupo No WNT/ No SHH, que comprende los grupos 3 y 4, no se han identificado vías de señalización asociadas ni existen ensayos convencionales que permitan diferenciarlos, sin embargo, se ha propuesto que los tumores del grupo 3 presentan expresión elevada del gen *C-MYC*, mientras que los del grupo 4 sobreexpresan el gen *N-MYC* (factores de transcripción

involucrados con la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular), de igual forma, se ha visto que presentan perfiles de metilación diferentes (Braganca y Millard, 2015). Los pacientes con tumores de estos dos grupos con el cromosoma 11 intacto son considerados en el grupo de riesgo estándar, mientras que los que presentan pérdida parcial en este cromosoma se consideran de bajo riesgo (Rouzbeh y Hartmann, 2017). Los meduloblastomas de los grupos 3 y 4 exhiben un fenotipo de células grandes/anaplásicos y clásicos. Los del grupo 3 representan el 25 % de los casos diagnosticados, presentan alta tendencia a la metástasis (45%) y tienen un pico de incidencia en la infancia y niñez, con tasas de supervivencia a los 5 años entre 40 y 50% (Northcott et al., 2012). Por otro lado, los meduloblastomas del grupo 4 son los más frecuentes, ya que representan aproximadamente el 35% de los casos; se presentan tanto en niños (35%) como en adultos (25%), con tasas de supervivencia a los 5 años del 75% (Northcott et al., 2012).

En los grupos WNT y SHH se ha observado una proporción de 1:1 entre hombres y mujeres, mientras que en el grupo No WNT/ No SHH la proporción aproximada es de 2:1 (Lam S., 2016).

Al existir características tan heterogéneas entre los grupos moleculares, se ha propuesto la existencia de diversas subestructuras que pueden ser clasificados como subtipos (Cavalli et al., 2017) biológicamente distintos y clínicamente relevantes, sin embargo, hasta el día de hoy la OMS solo ha reconocido los 3 grupos descritos anteriormente.

La etiología de la mayoría de los pacientes permanece desconocida, aunque se sabe que aproximadamente el 5% de los casos se asocian a predisposiciones hereditarias como el síndrome de Turcot (mutaciones germinales en el gen *APC*, que participa en la vía WNT) o el síndrome de Gorlin (mutaciones germinales en los genes *PTCH* y/o *SUFU*, que participan en la vía SHH) (Brandes et al., 2015).

A pesar de la elevada heterogeneidad molecular entre los grupos de meduloblastoma, se ha visto que existen proteínas que se expresan en todos ellos, como es el caso del REβ.

Origen de los meduloblastomas

Los meduloblastomas comprenden un grupo heterogéneo de tumores que se originan a partir de células precursoras de neuronas granulares localizadas en diferentes sitios del cerebelo en desarrollo.

Se ha propuesto que el grupo WNT surge a partir de progenitores neurales localizados en el tronco cerebral dorsal o en el labio rómbico inferior (Wang y Wechsler-Reya, 2014, Lin et al., 2016, Azzarelli et al., 2018). El grupo SHH se origina a partir de precursores de neuronas granulares localizadas en la capa granular externa o en el núcleo coclear del tronco cerebral dorsal (Wang y Wechsler-Reya, 2014), ambos tipos celulares provenientes del labio rómbico. El origen del grupo 3 de los meduloblastomas aun no es claro, sin embargo, se ha propuesto que se pueden originar a partir de precursores de neuronas granulares, células madre de la zona ventricular u otra clase de progenitores (Wang y Wechsler-Reya, 2014, Lin et al., 2016, Azzarelli et al., 2018). Finalmente, se ha propuesto que el grupo 4 surge a partir de precursores en el labio rómbico superior y sus precursores derivados (Lin et al., 2016).

Durante la maduración y migración de las células precursoras de neuronas granulares cerebelares en el desarrollo del cerebelo, se ha visto que estas presentan picos elevados de expresión del RE β , los cuales descienden en células maduras, por lo que esta proteína ha sido involucrada con la proliferación de células granulares inmaduras (Jakab et al., 2001; Belcher et al., 2008). Aunado a esto, se ha visto que cultivos primarios de células granulares cerebelares responden a concentraciones bajas de 17 β -estradiol, causand incremento en la fosforilación de ERK, cinasa involucrada en efectos mitogénicos y neuroprotectores (Wong et al., 2003).

7.2 RECEPTORES A ESTRÓGENOS (RE)

Función y estructura de los RE

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

Hasta el momento, se conocen dos isotipos de RE: el RE α y el RE β , codificados por genes diferentes y con distribuciones diversas y superpuestas, lo que sugiere funciones biológicas distintas. Ambos receptores se expresan en varios órganos, como el ovario, el útero, la glándula mamaria, los testículos, la próstata, la vejiga, los pulmones, el corazón y el cerebro. El RE β muestra patrones de expresión dominantes en la próstata, la vejiga y el cerebelo, mientras que el RE α se expresa de manera dominante en el útero, hepatocitos e hipocampo (Xu et al., 2010; Craig y Timm, 2004; Kuiper et al., 1997).

Los RE pertenecen a la familia de receptores nucleares que funcionan como moduladores de la transcripción activados por ligando. Tal como se ilustra en la figura 3, estos receptores presentan una región A/B, que contiene una función de activación 1 (AF1) en el extremo N-terminal, un dominio de unión a ADN (DBD) o región C, constituido por dos motivos de zinc, un dominio D o región bisagra que contiene una señal de localización nuclear y una región E/F, que contiene el dominio de unión a ligando (LBD), un dominio de unión a un corregulador de superficie (proteína de interacción con receptores nucleares 1 NRIP1) (Koide et al., 2006), el dominio de dimerización, una segunda señal de localización y una función de activación 2 (AF2) dependiente de ligando. AF1 es una función de activación constitutiva que contribuye a la actividad transcripcional de los RE y, con base en estudios de funcionalidad, se ha observado que el RE β no posee actividad en este dominio (Skrzypczak et al., 2013; Xu y Shanle, 2010; Craig y Timm, 2004; Hall y McDonnell, 1999). El DBD es el dominio más conservado entre ambos isotipos, con 96% de homología, mientras que las regiones A/B y D presentan homología del 30% (Craig y Tim, 2004).

El RE β y sus isoformas

El RE β humano consta de 530 aminoácidos, tiene un peso molecular de 56 kDa y es codificado por el gen *ESR2* localizado en el cromosoma 14q23.2 (Bothelo et al., 2015). Esta proteína de longitud completa es llamada hRE β 1, sin embargo, existen varias isoformas como consecuencia de splicing alternativo numeradas del 1 al 5. Estas variantes de empalme comparten con la isoforma silvestre los exones 1 al 7 pero contienen una secuencia única en el exón 8, lo que da lugar a modificaciones en el dominio LBD y en la función de activación AF-2, por lo que estas diferencias se reflejan en la funcionalidad de las variantes (Fig. 4) (Lewandowsky et al., 2002).

La isoforma silvestre RE β 1 es la única que tiene funcionalidad completa y es capaz de unirse al ligando, mientras que las isoformas RE β 2, RE β 3, RE β 4 y RE β 5 no forman homodímeros y no tienen actividad innata por sí mismos, pero modulan la respuesta a estrógenos cuando se dimerizan con la isoforma RE β 1 o con el RE α (Ciucci et al., 2014).

El peso molecular de la isoforma RE β 2 es de 56 kDa y se ha visto que forma dímeros de manera preferencial con el RE α , con lo cual inhibe la unión del RE α al ADN (Ascenzi et al., 2006). Respecto a la variante RE β 3, Lewandowsky sostiene que puede formar homodímeros y heterodímeros, además de ser capaz de unirse a ERE (Lewandowsky et al., 2002), sin embargo, debido a que el AF-2 se encuentra modificado, no promueve la asociación de correguladores. La estructura de esta

isoforma no ha sido estudiada en detalle. Se sabe que el RE β 4 tiene un peso molecular de 54 kDa (Leung et al., 2006; Murphy et al., 2003) mientras que el RE β 5 tiene un peso de 53 kDa (Leung et al., 2006). Otras variantes del RE β han sido reportadas, aunque sus secuencias completas no han sido determinadas (Yasar et al., 2016).

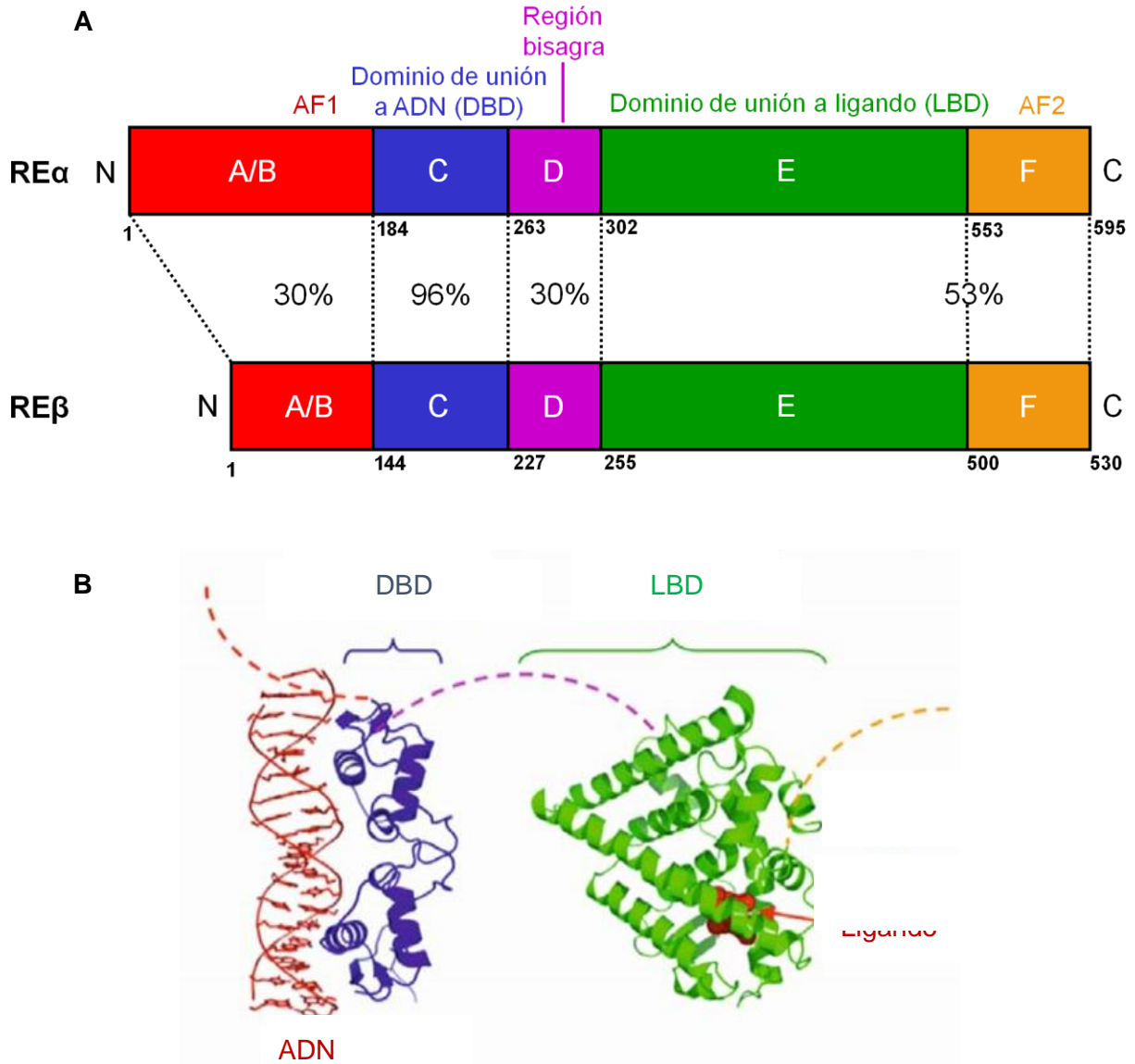


Fig. 3. Estructura y homología de los RE. **A)** Dominios estructurales de los RE; los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan el inicio y término de cada dominio. Los % indican la identidad entre los 2 isotipos de los RE. **B)** Estructura proteica de los RE en 3D (Modificada de Craig y Tim, 2004; Skrzypczak et al., 2013). AF: función de activación.

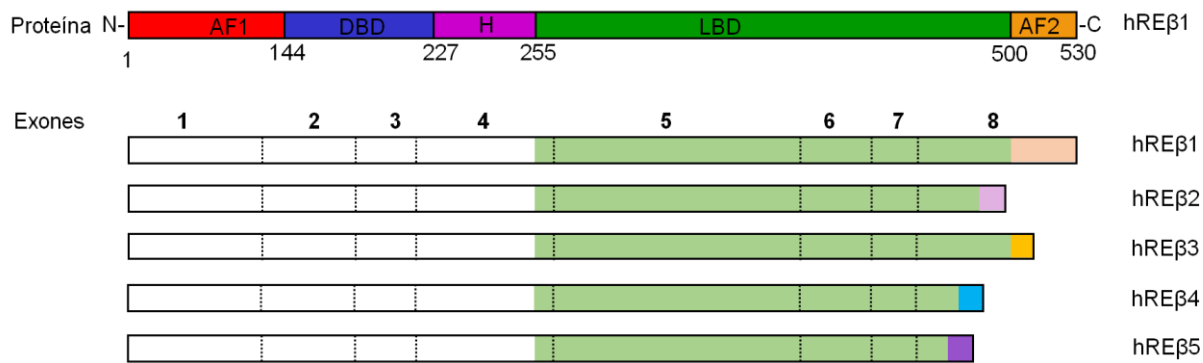


Fig. 4. Representación esquemática de las isoformas del REβ humano (hREβ). En la parte superior se muestran los dominios del REβ de longitud completa, mientras que en la figura inferior los números en negritas indican los exones numerados del 1 al 8. La zona sombreada en verde delimita el dominio LBD (dominio de unión a ligando) de la proteína codificada. Las isoformas 2 a 5 del hREβ se originan a partir de splicing alternativo del exón 8; estas isoformas no son capaces de unirse al ligando pero se pueden dimerizar con el REα o con el REβ1. Los rectángulos de colores diversos indican las secuencias únicas de cada isoforma. AF: función de activación; DBD: dominio de unión al ADN; H: región bisagra. Editada de Yasar et al., 2016.

Mecanismo de acción de los RE

Los RE pueden llevar a cabo sus funciones mediante un mecanismo clásico que consiste en la unión del ligando, lo que desencadena cambios conformacionales que provocan la disociación de proteínas de choque térmico que los estabilizan en su forma inactiva. Los RE activos se dimerizan, se fosforilan y se translocan al núcleo por exposición de las secuencias de localización nuclear (Fig. 5A). En el núcleo pueden unirse a elementos de respuesta estrógenos (ERE) localizados en la secuencia promotora de los genes blanco, lo que les permite regular la unión de coactivadores o correpresores de la transcripción, factores de transcripción, acetiltransferasas y deacetilasas, regulando de esta forma la transcripción de los genes blanco (Skrzypczak et al., 2013; Xu y Shanle, 2010; Mukherjee et al., 2010; Klinge, 2000; Craig y Timm, 2004; Klinge, 2000; McKenna et al., 1999; Ogawa et al., 1998).

También se sabe que los RE pueden regular la transcripción de genes que no albergan ERE mediante la asociación con otros factores de transcripción como Sp1 o el complejo Jun/Fos, lo que conlleva al mismo resultado que la unión directa con el ADN (Fig. 5B) (Ascenzi et al., 2006; Shupnik et al., 2004; Kushner et al., 2000; Paech et al., 1997).

De igual manera, se ha descrito que la activación de los RE puede promover de manera rápida las vías de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K). Para el primer caso, se ha propuesto que los RE unidos a su ligando se unen a la

tirosina cinasa c-Src, complejo que se estabiliza por el modulador no genómico de la actividad de RE (MNAR), lo que provoca la activación de c-Src, Ras y subsecuentemente de la vía MAPK (Fig. 5C). En el caso de la vía PI3K/Akt se ha propuesto que la asociación de los RE con c-Src provoca que la segunda active a la subunidad reguladora p58 de PI3K (Fig. 5D) (Cheskis et al., 2008; Barletta et al., 2004; Castoria et al., 2001; Migliaccio et al., 1999), lo que permite la activación de esta cinasa.

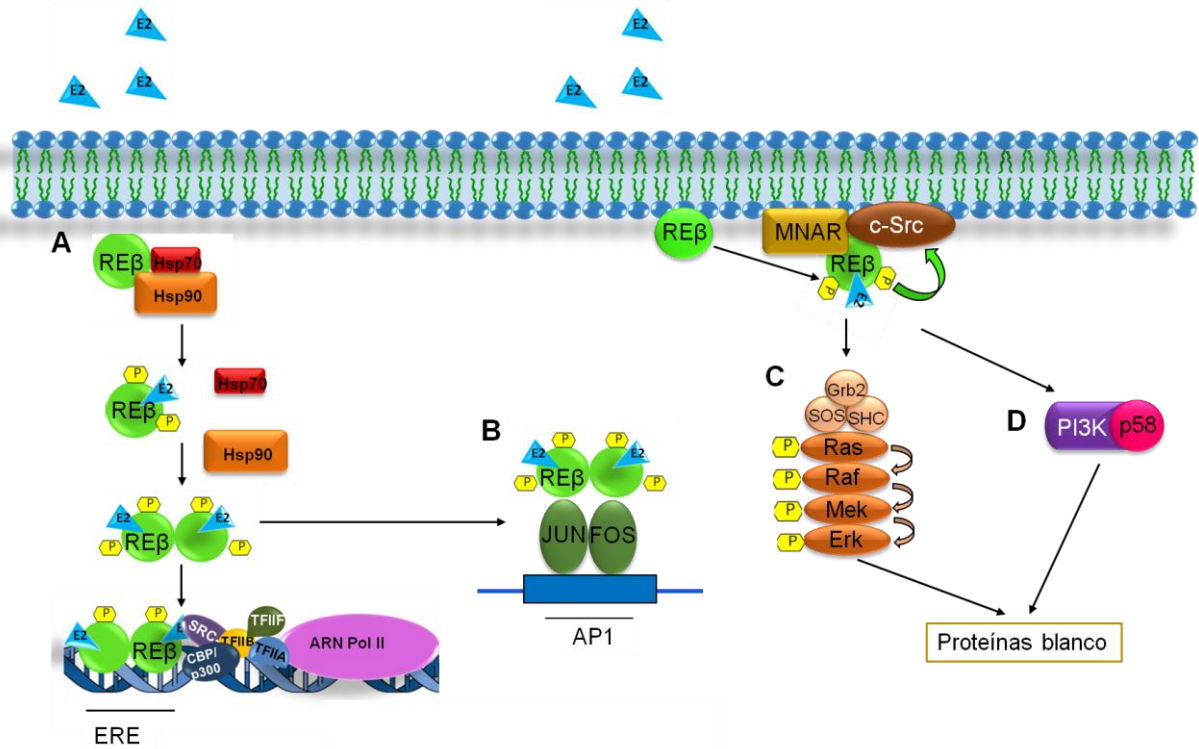


Fig. 5. Mecanismo de acción de los RE. **A)** En el mecanismo clásico los RE se unen a su ligando, se fosforilan, se dimerizan y se unen a los ERE (elementos de respuesta a estrógenos) del promotor de los genes blanco para regular su transcripción. **B)** Regulación de genes cuyos promotores no contienen ERE a través de la unión con otros factores de transcripción, como Jun/Fos. **C)** Activación de vías de señalización rápidas mediante la interacción de los RE con el adaptador de proteínas MNAR (Modulador no genómico de la actividad de los RE) y la subsecuente activación de c-Src, que a su vez fosforila a las proteínas que componen la vía de señalización de las cinasas regulada por señales extracelulares Mek/Erk y **D)** fosfoinositol 3-cinasa (PI3K).

Por otra parte, se sabe que la fosforilación de los RE, usualmente en residuos de serina, puede modular su actividad transcripcional. En el RE α se conocen múltiples sitios de fosforilación en humanos: Ser46/47, Ser104, Ser106, Ser118, Ser167, Ser236, Ser282, Ser294, Ser305, Thr311, Tyr537 y Ser559 (Craig y Timm, 2004). La fosforilación del RE α está involucrada en la regulación de diversas actividades, tales como la sensibilidad a ligandos, la localización nuclear, la unión al ADN y el aumento en la interacción con correguladores de la transcripción, entre otras (Pinceti et al., 2015).

En el RE β humano se han descrito 3 sitios de fosforilación: Ser75, Ser87 y Ser105 (Lam et al., 2015). En células de cáncer de mama, así como de hipocampo, se ha descrito que estos sitios pueden ser fosforilados por ERK1/2 y p38 en respuesta a estradiol (E2). La fosforilación de los sitios Ser87 y Ser105 incrementa el reclutamiento de la proteína correguladora SRC-1, lo cual aumenta la actividad transcripcional del receptor (Fig. 6) (Pinceti et al., 2015; Hamilton-Burke, 2010).

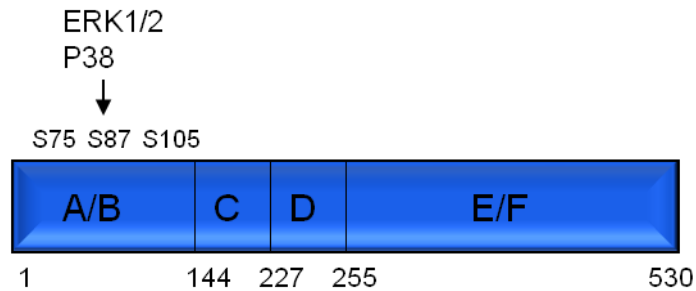


Fig. 6. Sitios de fosforilación del RE β humano. Los residuos S87 y S105 son blanco de las cinasas ERK1/2 y p38; se desconoce la cinasa que fosforila el residuo S75 (Modificada de Craig y Tim, 2004).

De manera general, se ha reportado que la fosforilación de los receptores nucleares de hormonas participa en la activación y regulación transcripcional de los mismos.

Utilizando los programas KinasePhos 0.1 (Huang et al., 2005), NetPhos 2.0 (Bloom et al., 1999) y GPS 2.1 (Xu et al., 2011) en nuestro grupo de trabajo se han identificaron diferentes residuos del RE β como posibles sitios de fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) α y δ , entre los que destacan los residuos Ser200, Ser219, Ser234 y Ser452. En ensayos de coimmunoprecipitación realizados previamente en nuestro laboratorio, se observó que existe una asociación basal entre el RE β y la PKC α , así como un aumento significativo en esta asociación a los 5 minutos de tratamiento con TPA 1 μ M (Hernández-Rojas, resultados sin publicar)

El RE β en meduloblastomas

El RE β podría estar involucrado en el desarrollo de los meduloblastomas debido a que los precursores de neuronas granulares cerebelares (células a partir de las cuáles se ha hipotetizado que se originan estas neoplasias) expresan elevadas cantidades del RE β durante el desarrollo cerebelar. Este receptor nuclear, con función moduladora de la transcripción, está involucrado en procesos de diferenciación, crecimiento, migración y viabilidad celular (Cookman y Belcher, 2015).

Se ha reportado que las líneas celulares Daoy y D283-Med, derivadas de meduloblastoma desmoplásico y clásico respectivamente, expresan el RE β en cantidad elevada, mientras que el RE α se encuentra en concentraciones bajas (Zannoni et al., 2016). En el caso de las biopsias de meduloblastomas se ha visto que a nivel de proteína el RE α se encuentra en cantidades prácticamente indetectables, mientras que el RE β se encuentra sobreexpresado respecto a muestras de pacientes sanos (Zannoni et al., 2016).

Además, a partir de bancos de datos se ha visto que el gen del RE β (ESR2) se sobreexpresa en los diferentes grupos moleculares de meduloblastoma (<https://pecan.stjude.cloud/proteinpaint/ESR2>) (Fig. 7).

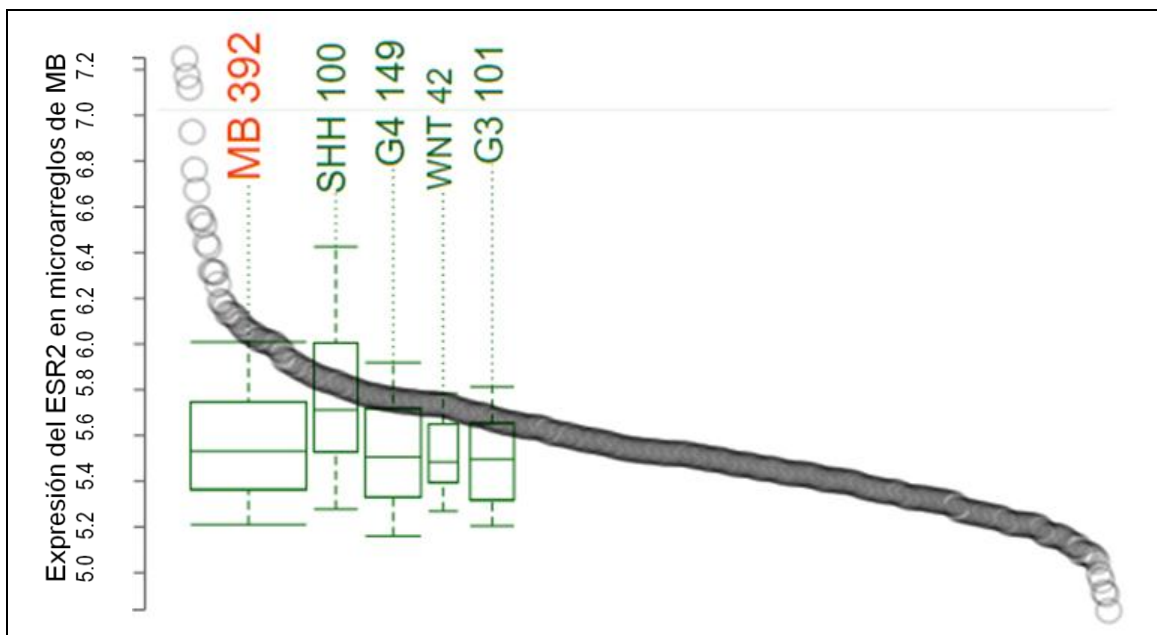


Fig. 7. Expresión relativa del gen del RE β (ESR2) en meduloblastomas de clasificación molecular respecto a la expresión en tejido sano cerebelar. MB: meduloblastoma; WNT: Wingless, SHH: Sonic Hedgehog; G3: grupo 3; G4: grupo 4. Tomada de pecan.stjude.cloud.

Aunado a esto, Belcher y colaboradores reportaron que en las líneas celulares D283-Med y Daoy, así como en xenoinjertos de células D283-Med realizados en ratones, la estimulación con DPN (agonista selectivo del RE β) y E2 (ligando endógeno de los RE) provoca un aumento en el crecimiento y la migración celular, mientras que el antagonista de los RE, ICI 182 780, bloquea esta respuesta (Belcher et al., 2009). Por otro lado, el tratamiento con el agonista selectivo del RE α , PPT, no afecta la proliferación o migración celular (Belcher et al., 2009).

En xenoinjertos de meduloblastoma humano el tratamiento con E2 induce el crecimiento tumoral, efecto que se ve bloqueado con el uso del antagonista ICI 182, 780 (Belcher et al., 2009). De igual

forma, en un modelo murino de meduloblastomas que consiste en ratones $Ptch1^{+/-} Trp53^{-/-}$ se encontró que el uso del ICI 182,780 incrementa la supervivencia libre de síntomas en comparación con los ratones control (Cookman y Belcher, 2015). Más aun, utilizando un modelo murino de meduloblastoma, que consiste en un sistema knockout condicional específico para el gen $Ptch1$ en precursores de células granulares cerebelares ($Ptch1^{C/C} Atoh1-cre$), Cookman y Belcher encontraron que la pérdida de función del REβ ($ER\beta^{-/-}$) disminuye el crecimiento del tumor respecto a aquellos ratones con el REβ funcional ($ER\beta^{+/+}$) a través de la desregulación de la muerte celular mediada por caspasas. La pérdida de función del REβ provocó una disminución en la expresión del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R), mientras que el tratamiento con E2 incrementó los niveles del ARNm de este receptor en líneas celulares de meduloblastoma (Cookman y Belcher, 2015). Se sabe que el IGF1R está involucrado en la proliferación de los progenitores de neuronas granulares cerebelares y que su estimulación promueve la proliferación de líneas celulares de meduloblastoma a través de la activación de las vías de señalización MEK/ERK1/2 y Akt/PKB (Wong et al 2003; Urbanska et al 2009; Del Valle et al 2002; Zhou et al 2011; Hartmann et al 2005), mientras que la inhibición de IGFIR o el bloqueo del REβ provoca la disminución en pAKT y pERK, lo que impide los efectos desencadenados por el REβ (Del Valle et al., 2002). Estos hallazgos indican que el REβ induce el crecimiento de los meduloblastomas al incrementar la expresión y la activación del IGFIR.

Contrario a esto, utilizando un modelo de meduloblastoma inducido por radiación ($Ptch1^{+/-}$), un grupo de investigación reportó que ratones hembra $Ptch1^{+/-}$ ovariectomizadas presentaron menos lesiones cerebelares preneoplásicas, más apoptosis y menos proliferación respecto a los ratones control (Mancuso et al., 2010). Este grupo de investigación también realizó estudios *in vitro* utilizando las líneas celulares D283-Med y Daoy, sin embargo, no encontraron diferencias en el número de células después de 96 h de tratamiento con vehículo, E2 o DPN (Ciucci et al., 2014). Además de esto, Gallo y colaboradores realizaron estudios en xenoinjertos de células D283-Med, en donde encontraron que los tumores desarrollados en hembras fueron significativamente más pequeños y con características desmoplásicas respecto a los tumores desarrollados en machos, además de que en los tumores derivados de hembras había mayor expresión del REβ1, lo cual estuvo relacionado con una menor proliferación (Ciucci et al., 2014). Estos resultados les llevaron a concluir que el REβ inhibe la tumorigénesis y la proliferación celular.

Una posible explicación a esta aparente contradicción se basa en las diferencias entre los modelos empleados por cada grupo. La metodología experimental de cada grupo señala que el número de células utilizado en los ensayos *in vitro* fue diferente (ver Tabla II).

Tabla II. Comparación de los ensayos *in vitro* del efecto del E2 en la proliferación de líneas celulares de meduloblastoma. E2: estradiol, ligando endógeno de los RE; DPN: diarilpropionitrilo, agonista del RE β .

Autores	Belcher et al., 2009	Ciucci et al., 2014
Líneas celulares	D283-Med	D283-Med y Daoy
Tiempo de evaluación	96 horas	96 horas
Número células/tamaño placa	3000 células/ mL Placas de 60 mm	D283-Med: 1×10^5 /pozo Daoy: 8×10^4 /pozo Placas 36 mm
Resultados	El tratamiento con E2 (10^{-9} M, 10^{-8} M) y con DPN (10^{-12} - 10^{-8} M) incrementa la viabilidad celular a 96 horas respecto al vehículo.	El tratamiento con E2 y DPN (10^{-10} - 10^{-6} M) no provoca diferencias significativas.

De acuerdo con la descripción experimental, en el modelo de meduloblastoma inducido por radiación (*Ptch1^{+/-}*) el efecto del E2 fue evaluado en etapas tempranas del desarrollo de los meduloblastomas, ya que en este el tratamiento de los ratones inicia a la semana posnatal 5 y se ha reportado que los tumores en estos modelos se desarrollan al día posnatal 20, por lo que se evalúan lesiones preneoplásicas (Ciucci et al 2014). En el modelo de xenoinjertos de células D283-Med empleado por Belcher, la inyección de las células de meduloblastoma se llevó a cabo a las 3-4 semanas de edad y después de 4 semanas de la inyección (Cookman y Belcher, 2015), tiempo en el que se ha visto que los tumores se encuentran ya formados, se realizaron los diversos tratamientos. De esta forma, en el primer caso se evaluaron etapas preneoplásicas y en el segundo se evaluó el efecto de los fármacos en un tumor ya formado. En el caso de los modelos *Ptch1^{+/-} Trp53^{-/-}* y *Ptch1^{C/C} Atoh1-cre* no existen información disponible que permita conocer la edad de los ratones a la que se desarrollan los tumores.

Además de lo anterior, mientras que en el modelo de xenoinjertos de células D283-Med, Ciucci y colaboradores hicieron uso de ratones de 8 semanas de edad, el grupo de investigación de Belcher utilizó ratones de 3 a 4 semanas, en donde las hembras fueron previamente ovariectomizadas (ver Tabla III). En este caso el nivel hormonal puede ser diferente entre los ratones utilizados por cada

grupo de investigación, y ya que se evalúa el papel del estradiol, las diferencias hormonales en cada grupo de ratones podrían modificar los resultados observados.

Tabla III. Comparación de los ensayos en xenoinjertos de células D-283-Med para evaluar la relevancia del REβ en los meduloblastomas. E2: estradiol, ligando endógeno de los RE.

Autores	Belcher et al., 2009	Ciucci et al., 2014
Edad de los ratones	3-4 semanas Machos y hembras intactos y gonadectomizados	8 semanas Machos y hembras intactos
Número de células inyectadas	1x10 ⁷ células en matrigel libre de rojo fenol y reducido en factores de crecimiento	3x10 ⁷ células en matrigel libre de rojo fenol y reducido en factores de crecimiento.
Tratamiento	E2 ICI 182,780 (Fulvestrant)	Ninguno
Tiempo de evaluación	Días 7-100 post-implantación	Post-mortem: 7 semanas después de la inoculación
Estudios que se realizaron	Volumen del tumor	Tamaño del tumor Características histológicas Proliferación celular Expresión del REβ1
Resultados	El tratamiento con E2 induce el crecimiento tumoral, sexo independiente. Este efecto se ve bloqueado con el uso de Fulvestrant.	Tumores de hembras significativamente más pequeños y con características desmoplásicas respecto a los tumores en machos. Expresión del REβ1 significativamente mayor en tumores de hembras que en machos, lo que correlaciona con una menor proliferación.

Sin lugar a duda es necesario realizar estudios que permitan esclarecer estas diferencias, a partir del uso de modelos similares que puedan ser comparados entre ellos y, de esta forma, obtener información para entender el papel real del RE β en el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas.

Aunque el papel de las isoformas del RE β no ha sido estudiado con detalle, se ha reportado que en xenoinjertos de meduloblastoma y en biopsias de pacientes con este tipo de tumores las muestras provenientes de ratones hembra o mujeres presentan niveles más elevados del RE β 1 respecto a las de ratones macho u hombres (Ciucci et al., 2014; Zannoni et al., 2016), lo cual correlacionó con un menor índice de proliferación y mayores niveles de apoptosis. Debido a las controversias existentes en torno a la función del RE β en el desarrollo y crecimiento de los meduloblastomas, se hace necesaria una investigación más profunda.

7.3 PROTEÍNA CINASA C (PKC)

Características de las PKC

Las PKC son cinasas serina/treonina que han sido relacionadas con la regulación de numerosos procesos celulares incluyendo supervivencia, proliferación, diferenciación, apoptosis y migración (Tarafdar y Michie, 2014; Do Carmo et al., 2013; Arora y Scholar, 2005).

Estas proteínas han sido clasificadas en 3 grupos según sus características estructurales y funcionales (Fig. 8): las PKC clásicas o convencionales (PKCc) incluyen los isotipos α , β I, β II y γ ; las nuevas (PKCn) incluyen los isotipos δ , ϵ , η , θ , y μ ; y las PKC atípicas (PKCa) abarcan los isotipos ζ y ι/λ (λ en roedores) (Do Carmo et al., 2013; Tarafdar y Michie 2014; Newton et al., 2016). Las PKCc requieren DAG, Ca²⁺ y fosfatidilserina (PS) para su activación (Tarafdar y Michie, 2014), las PKCn requieren DAG y PS y las PKCa se activan por unión a fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato (PIP₃) o a ceramidas (Steinberg, 2010).

La activación de las PKC depende de su estructura, que como se describe en la figura 8, es diferente para cada grupo. La región reguladora de las PKC contiene una región autoinhibidora (pseudosustrato) y dos regiones membrana-blanco (C1 y C2). La región C1 se une a DAG y PS, aunque no en el caso de las PKC atípicas. La región C2 contiene aminoácidos ácidos que permiten la unión a Ca²⁺, en el caso de las PKCn, esta región no posee dichos aminoácidos. La región C3 contiene un motivo de unión a ATP y la región C4 se une al sustrato; juntos conforman el

dominio catalítico (Fig. 8) (Griner y Kazanietz, 2007; Kang et al., 2012). Las PKC atípicas no contiene la región C2 pero poseen un dominio rico en cisteínas que le permite interactuar con PIP3 o ceramidas, así como una región PB1 que media la interacción con otras proteínas que contienen esta misma región (Newton et al., 2016; Do Carmo et al., 2013).

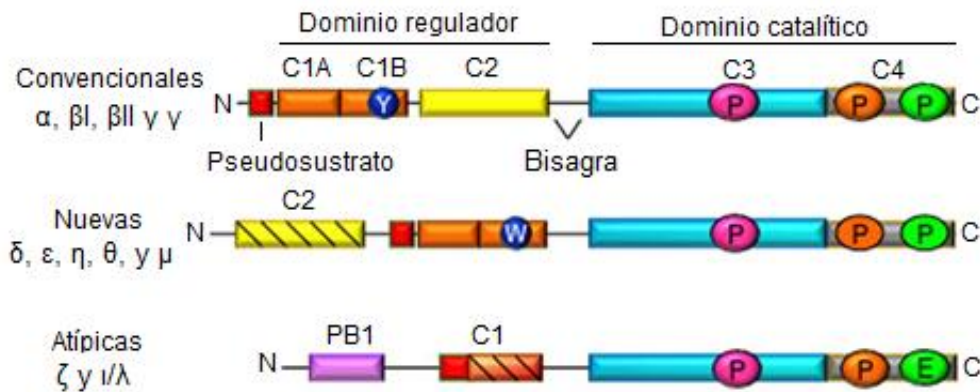


Fig. 8. Características estructurales de las PKC. Todos los isotipos poseen un dominio regulador y un dominio catalítico. El dominio regulador consiste en una región C1 (anaranjado), una región C2 (amarillo) y un pseudosustrato (rojo). Las PKC atípicas no contienen la región C2 pero poseen una región PB1 (morado) que media la interacción con proteínas de andamiaje. El dominio catalítico posee una región C3 (azul) y un dominio C4 (gris), los cuales contienen sitios de fosforilación necesarios para su maduración y activación. (Modificada de Newton et al., 2016).

En lo que respecta a la PKC α , se ha establecido que contribuye a la progresión tumoral en cáncer de próstata, endometrio, gliomas y tumores blandos urinarios de alto grado al incrementar los niveles de ciclina D1 y CDK4 y potenciar la actividad del complejo ciclina/CDK4. También se ha reportado que PKC α es capaz de activar a Raf-1, que conlleva a la activación de la vía de señalización de MAPK (Singh et al 2017; Do Carmo et al., 2013; Hu et al., 2010). Contrario a esto, existe evidencia de que en tumores intestinales y pancreáticos, melanoma, células del epitelio mamario, entre otros, PKC α juega un papel anti-proliferativo a través de la disminución de ciclina D1, CDK1 y la inducción del arresto en la fase G2/M del ciclo celular (Singh et al 2017).

Diversos estudios señalan que algunos isotipos de las PKC pueden actuar como supresores de tumor (Martin y Fabbro, 2007), como es el caso de PKC δ , ya que se ha reportado que causa disminución en la proliferación de células de cáncer de mama e induce arresto en la fase G1 en células de adenocarcinoma de pulmón (Do Carmo et al., 2013). De igual forma, se ha reportado que en cáncer de mama y en glioblastomas, PKC δ posee roles pro y anti-apoptóticos dependiendo de su estado de fosforilación, ya que se ha visto que la fosforilación de esta proteína en la tyr155

protege a las células de glioma de la apoptosis, mientras que la fosforilación en la tyr311 media efectos apoptóticos (Do Carmo et al., 2013).

La localización subcelular de las PKCs cambia con el estado de activación: cuando están inactivas se localizan en el citoplasma, y una vez activadas son capaces de translocarse a la membrana plasmática, a organelos citoplasmáticos o al núcleo (Do Carmo et al., 2013). Se sabe que la translocación de PKC α , β , δ , ϵ y ζ a la membrana plasmática, mitocondria, aparato de golgi, núcleo o regiones perinucleares resulta en la regulación de la mitosis, vías de supervivencia celular, apoptosis, adhesión célula-célula y migración (Steinberg, 2010).

PKC en meduloblastomas

Adesina y colaboradores reportaron que la línea celular DAOY, derivada de un meduloblastoma humano con características desmoplásicas, expresa PKC α , PKC ζ y ARNm de PKC β II. Este grupo de trabajo reportó que tanto el tratamiento con un inhibidor de PKCs como el silenciamiento de PKC α causaron disminución en la proliferación de dicha línea celular (Adesina et al., 1998).

Además, en biopsias meduloblastoma se ha visto que el gen de la PKC α (PRKCA) se sobreexpresa en los diferentes grupos moleculares (pecan.stjude.cloud) (Fig. 9).

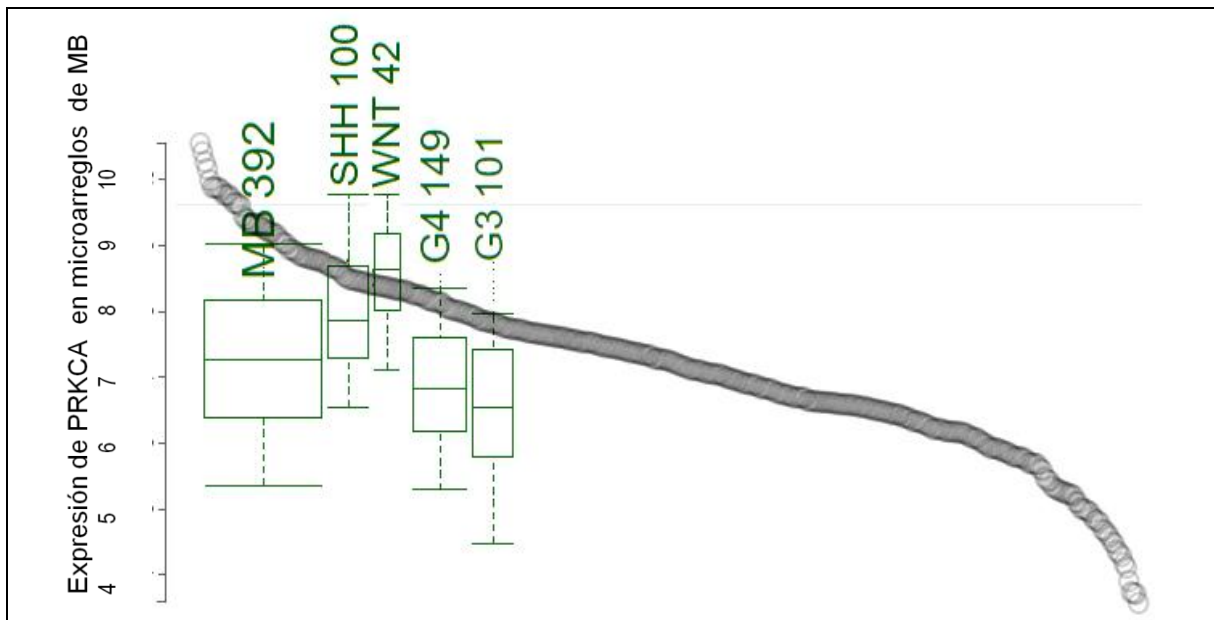


Fig. 9. Expresión relativa del gen de la PKC α (PRKCA) en meduloblastomas de clasificación molecular respecto a la expresión en tejido sano cerebelar. MB: meduloblastoma; WNT: Wingless, SHH: Sonic Hedgehog; G3: grupo 3; G4: grupo 4. Tomada de pecan.stjude.cloud.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque se sabe que el RE β y la PKC α se encuentran expresados en los meduloblastomas, que se asocian basalmente y que la activación de PKCs clásicas y nuevas incrementa el contenido del receptor fosforilado, se desconoce si la interacción entre estas dos proteínas contribuye al desarrollo de estos tumores.

9. HIPÓTESIS

1) Si el RE β y la PKC α favorecen el crecimiento de los meduloblastomas, entonces se observará aumento en la proliferación en la línea celular DAOY cuando sea tratada con un agonista del RE β y/o un activador de PKC α , de manera individual o conjunta; por el contrario, la proliferación disminuirá cuando las células sean tratada con un antagonista del RE β y/o un inhibidor de PKC α .

2) Si la PKC α interactúa con el RE β , entonces estas proteínas colocalizarán en el mismo compartimento celular en la línea celular DAOY, antes o después de la activación de PKC α .

3) Si el RE β y la PKC α están relacionados con el desarrollo y/o mantenimiento de los meduloblastomas, entonces se observará un contenido diferente de estas proteínas en biopsias provenientes de estos tumores respecto al contenido encontrado en muestras de cerebelo sano.

10. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la participación de la interacción entre el RE β y la PKC α en la proliferación de la línea celular DAOY derivada de meduloblastoma humano y el contenido de ambas proteínas en muestras meduloblastoma clásico y desmoplásico, así como la presencia y asociación de otras PKCs con el RE β en las células empleadas.

Objetivos particulares

1) Evaluar la contribución de la activación del RE β y la PKC α en la proliferación y viabilidad de la línea celular DAOY derivada de un meduloblastoma humano.

2) Estudiar la localización del RE β , la PKC α y otras PKCs en la línea celular DAOY.

3) Establecer el nivel de contenido del RE β , la PKC α y otras PKCs en muestras de meduloblastoma clásico y desmoplásico.

11. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Cultivo celular y tratamientos.

La línea celular DAOY derivada de un meduloblastoma desmoplásico (ATCC, VA, E.U.A.) se cultivó en placas de 10 cm, con medio mínimo esencial eagle (In vitro, S. A. México) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (In vitro, S. A. México) y 1 % de antimicótico-antibiótico (In vitro, S. A. México). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y 95% aire. 24 horas antes de cada experimento el medio de cultivo se cambió por medio mínimo esencial eagle sin rojo fenol (In vitro, S. A. México), suplementado con 10% de SFB sin hormonas (Mayimex, S.A. De C.V.). Las células se trataron con los siguientes reactivos: dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), Diarilpropionitrilo (DPN): agonista del RE β (Tocris Bioscience) y 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA): activador de PKCs clásicas y nuevas (Sigma-Aldrich). El tratamiento con 2-fenil-3-(4-hidroxifenil)-5,7-bis(trifluorometil)-pirazol[1,5-a]pirimidina (PHTPP): antagonista del RE β (Tocris Bioscience), Gö 6976: inhibidor de PKC α (Santa-Cruz Biotechnology) y rotlerina; inhibidor selectivo de PKC δ (Santa-Cruz Biotechnology), se realizó 30 minutos antes del tratamiento con DPN y/o TPA. Ver descripción en Tabla IV.

Proliferación.

a) Proliferación celular determinada mediante el método de exclusión con azul tripano.

El ensayo de exclusión con azul de tripano permite diferenciar células vivas y muertas debido a que el colorante no puede ser incorporado por células vivas con membranas celulares intactas, mientras que las células muertas lo incorporan al poseer membranas celulares dañadas.

Para determinar la proliferación celular, se sembraron cajas de 12 pozos con 15 000 células cada uno. Las células fueron contadas a 0, 24, 48 y 72 horas después de la adición de los tratamientos. Para esto, las células fueron despegadas utilizando PBS-EDTA (NaCl 137 mM (Baker), KCl 2.7 mM (Reasol), Na₂HPO₄ 8 mM (Sigma-Aldrich), KH₂PO₄ 2 mM (Sigma-Aldrich), EDTA 10 mM

(Promega), pH 7.4), se colocaron 40 μ L de azul de tripano al 0.4% en PBS por mL de suspensión de células y se utilizó la cámara de Neubauer para realizar el conteo. La proliferación celular se determinó contando el número de células vivas a los diferentes tiempos evaluados entre el número de células vivas al tiempo 0. Los resultados expresan el cambio relativo en el número de células \pm el error estándar de la media (EEM). El control del experimento consistió en células sin tratamiento, mientras que el tratamiento vehículo consistió en DMSO al 0.1%.

b) Proliferación celular determinada por el ensayo de incorporación de BrdU.

La 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que puede ser incorporada en lugar de esta en el ADN nuevo sintetizado por las células proliferantes. Los anticuerpos contra la BrdU permiten identificar a las células que se encuentran proliferando, pues pueden ser reconocidos por anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos o a enzimas que facilitan la visualización.

Para realizar este ensayo, 8000 células se cultivaron en cajas de cultivo deslizadoras de 4 pozos. La incorporación de BrdU fue analizada después de 72 horas de la adición de los tratamientos, para lo cual se utilizó el kit de detección y marcaje de 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (Roche). La incorporación de BrdU se detectó con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU y el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 594. Las células positivas para BrdU se contaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus Bx43, PA, USA) y el programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated). Los resultados expresan el cambio relativo en el número de células \pm EEM. El control del experimento consistió en células sin tratamiento, mientras que el tratamiento vehículo consistió en DMSO al 0.1%.

Viabilidad celular

El método de exclusión por azul de tripano se utilizó para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo sobre la viabilidad celular de los cultivos. Este estudio es relevante para confirmar que los compuestos utilizados no inducen muerte celular y que por lo tanto, los cambios observados se deben a la proliferación celular. La viabilidad celular se determinó como el número de células muertas entre el número total de células (vivas y muertas) a un tiempo determinado, expresado en porcentaje. Los resultados se expresan como % de viabilidad celular \pm EEM. El control del experimento consistió en células sin tratamiento, mientras que el tratamiento vehículo consistió en DMSO al 0.1%.

Tabla IV. Compuestos utilizados en los tratamientos celulares.

Nombre del compuesto	Función	Concentración utilizada	Referencias
DPN	Agonista selectivo del RE β (EC ₅₀ : 0.85 nM), con una selectividad 70 veces mayor sobre este receptor respecto al RE α (EC ₅₀ : 66 nM).	0.1, 1, 10 nM	Meyer et al., 2001
PHTPP	Antagonista selectivo del RE β , 36 veces más selectivo sobre este respecto al RE α .	1, 10, 100 nM	Dennis et al., 2004
TPA	Activador de PKCs clásicas y nuevas. Ha sido utilizado a concentraciones de 10 nM a 1 μ M.	1 μ M	Castagna et al., 1982
Gö 6976	Inhibidor selectivo de PKC α (IC ₅₀ : 2.3 nM) y PKC β 1 (IC ₅₀ : 6.2 nM). Además inhibe a TrkA (IC ₅₀ : 5 nM), TrkB (IC ₅₀ : 30 nM), JAK 2 (IC ₅₀ : 130 nM), JAK 3 (IC ₅₀ : 370 nM), CHK1/2 y RPS6KA3.	1 μ M	Martiny-Baron et al., 1993; Rennecke et al., 1996; Behrens et al., 1999; Grandage et al., 2006; Stolz et al., 2009.
Rotlerina	Inhibidor de PKC δ (IC ₅₀ : 3-6 μ M). Además inhibe A CaMKIII y MAPKAP-K2 (IC ₅₀ : 3-6 μ M), PKC α , β y γ (IC ₅₀ : 30-42 μ M), PKC ϵ , η y ζ (IC ₅₀ : 80-100 μ M),	1 μ M	Tuorkey 2015; Davies et al., 2000; Gschwendt et al., 1994

EC₅₀: concentración efectiva 50; IC₅₀: concentración inhibitoria 50; PKC: proteína cinasa C; Trk: cinasa relacionada con tropomiosina; JAK: cinasa de Janus; CHK: cinasas de control; RPS6KA3: proteína cinasa S6 ribosomal A3; CaMK: cinasa dependiente de calcio/calmodulina; MAPKAP-K2: proteína cinasa 2 activada por la proteína cinasa activada por mitógenos.

Inmunoprecipitación

Para determinar la interacción entre el RE β y la PKC α , se realizó la inmunoprecipitación del primero para posteriormente identificar mediante western blot a la segunda proteína. En este caso las células fueron cultivadas y mantenidas según las condiciones descritas en el apartado *cultivo*

celular y tratamientos. Después del tratamiento, las células fueron lisadas con buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas (5 mM EDTA, 2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL aprotinina y 1 mM PMSF, p-serine, p-threonine and p-tyrosine (1mM) e incubadas durante 1 hora en hielo. Los lisados celulares fueron centrifugados a 14 000 rpm por 15 minutos y la cantidad de proteína fue cuantificada utilizando un Nano Drop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). 1 mg de proteína total se incubó con 2 µg de anticuerpo contra el REβ (sc-53494, Santa Cruz Biotechnology) y 50 µL de proteína A-agarosa (sc-2001; Santa Cruz Biotechnology) a 4° C toda la noche en agitación constante. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 8 000 rpm por 5 minutos y el pellet se resuspendió en buffer laemmli (60 mM Tris HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β-mercaptoetanol and 0.01 % azul de bromofenol). Estas muestras se desnaturalizaron mediante calor y se centrifugaron a 15 000 rpm / 15 minutos. Finalmente, se separaron en SDS-page al 7,5% como se describe en el apartado Western blot para detectar a la PKCδ o al REβ fosforilado, utilizando el contenido del REβ total como control de carga.

Western blot

La técnica de western blot se utilizó para identificar las proteínas de interés a partir de cultivos celulares de la línea celular Daoy, entre las que se incluyeron: el REβ, el REβ fosforilado, las PKCα, δ y ε y la α-tubulina. Para este fin, los cultivos fueron lisados por raspado de placa con buffer leamli (Tris HCl 0.5 M (Sigma-Aldrich) pH 6.8, SDS 10% (Sigma-Aldrich), azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), Glicerol 10% (Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol 10% (Sigma-Aldrich), Amortiguador Tris (TBS), Tris base 0.05 M (Sigma-Aldrich), NaCl 0.15 M (Baker). Las muestras obtenidas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia (BioRad) a 60 mA/ membrana durante 2 horas. Éstas fueron bloqueadas toda la noche a 4°C con una solución de leche descremada 5% y albúmina 2% (In vitro, S. A. México) en TBS-Tween 0.1% (TrisBase 50 mM (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM (Baker), pH 7.4 + 0.1% Tween (Sigma-Aldrich)). Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas se incubaron 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario contra el REβ (ab3576, Abcam) a concentración de 2 µg/mL, contra PKCε (sc-56944, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:500, o bien con el anticuerpo contra PKCα (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology) o PKCδ (sc-213, Santa Cruz Biotechnology) a concentración de 0.4 µg/mL. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween 0.1% durante 5 minutos. Anticuerpos secundarios contra ratón (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) o contra conejo (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) fueron utilizados a concentración de 0.04 µg/mL

durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados con TBS durante 5 minutos.

La cantidad de proteína detectada se normalizó con el contenido de la α -tubulina o el RE β total en el caso de las inmunoprecipitaciones. Para lo anterior, las membranas se trataron con glicina ácida (glicina 0.1M (Sigma-Aldrich), 10% SDS (Sigma-Aldrich), pH 2.5) toda la noche a 4°C. Posteriormente las membranas fueron lavadas con TBS 3 veces durante 5 minutos. El anticuerpo primario contra α tubulina se utilizó a concentración de 0.8 μ g/mL (sc-398103, Santa Cruz Biotechnology) o contra el RE β (sc-53594) a concentración de 0.8 μ g/mL y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% durante 5 minutos y se colocó el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa (sc-2005) durante 45 minutos a temperatura ambiente en concentración de 0.04 μ g/mL. Las proteínas se visualizaron utilizando un kit de detección basada en quimioluminiscencia (ECL kit; Amersham Corp.). Las placas obtenidas se sometieron a un análisis densitométrico empleando el programa ImageJ (ImageJ, U. S. National Institutes of Health) para semicuantificar la intensidad de las bandas de las proteínas. Los resultados se expresan en unidades relativas de densitometría de las proteínas de interés \pm EEM.

Determinación de la localización del RE β , la PKC α y δ en la línea celular DAOY mediante Inmunofluorescencia.

Para determinar si las proteínas de interés colocalizaban el mismo compartimento celular, estas fueron detectadas mediante inmunofluorescencia. Para este fin se sembraron 8 000 células por pozo en portaobjetos Millicell de 4 pozos. Éstas fueron tratadas con TPA 1 μ M durante 5, 15, 30 y 60 minutos. Posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar 3 lavados con buffer de fosfatos (PBS) (NaCl 137 mM (Baker), KCl 2.7 mM (Reasol), Na₂HPO₄ 8 mM (Sigma-Aldrich), KH₂PO₄ 2 mM (Sigma-Aldrich), pH 7.4), las células se permeabilizaron con metanol al 100% (J.T.Baker) durante 6 minutos a -20°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (ASB) (Biowest) al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de bloqueo se colocaron los anticuerpos primarios contra el RE β (ab6789, Abcam) a concentración de 10 μ g/mL, contra PKC α (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology) o contra PKC δ (sc-213, Santa Cruz Biotechnology) a concentración de 4 μ g/mL en ASB al 0.5%, y se dejaron incubando 24 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se colocaron los anticuerpos secundarios contra conejo y contra ratón acoplado a AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Scientific) y a AlexaFluor 594 (Thermo Fisher Scientific) respectivamente, a una dilución de 1:100, incubándose 40 min a temperatura

ambiente; a partir de este paso el procedimiento fue realizado en oscuridad. Para teñir los núcleos se realizaron 3 lavados con PBS y se colocó el marcador Hoechst 33342 (H3569: Thermo Fisher Scientific) a concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 7 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados 3 veces con agua y se montaron con medio de montaje no fluorescente (Biocare medical). La fluorescencia de Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 y Hoechst se detectó utilizando diferentes láseres para excitar los fluorocromos y se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus Bx43, PA, USA).

Evaluación del contenido del RE β , la PKC α y δ en muestras de meduloblastoma mediante Inmunofluorescencia.

Las muestras fueron donadas por la Dra. María de Lourdes Álvarez y el Dr. Pedro Francisco Valencia Mayoral (Hospital Infantil de México, Federico Gómez) (Tabla V). Los cortes se desparafinaron mediante calor e inmersión de las muestras en gradientes de solventes orgánicos. El desenmascaramiento de los antígenos se realizó mediante la inmersión de las muestras en citrato de sodio hirviendo durante 30 minutos. Estas muestras se bloquearon con ASB al 5% en TBS-Tween 0.1% durante 2 horas y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios contra el RE β (ab6789, Abcam, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y contra PKC α (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en ASB al 2.5%, durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween 0.1% y se incubaron en la oscuridad durante 40 minutos con anticuerpos secundarios contra conejo y ratón, acoplado a AlexaFluor 488 y 594 (Thermo Fisher Scientific) respectivamente, a una dilución de 1:100 en ASB al 2.5%. Las muestras se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0.1%, y posteriormente los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342 (H3569: Thermo Fisher Scientific, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en ASB al 2.5%, durante 7 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0.1% y se montaron con medio de montaje no fluorescente (Biocare medical). La fluorescencia de Alexa Fluor 488, 594 y Hoechst se detectó utilizando diferentes láseres para excitar los fluorocromos y se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus Bx43, PA, USA). La fluorescencia relativa de las fotografías tomadas de cada muestra se realizó mediante el programa ImageJ y Adobe Photoshop CS5. Para esto, se tomaron fotografías de por lo menos 17 campos por muestra; la fluorescencia relativa de cada campo se dividió entre el número total de células en el mismo y se obtuvo la fluorescencia por cada 100 células contadas. Posteriormente se realizó el promedio de estos valores para obtener un valor único por paciente. La gráfica reportada representa el valor promedio de la fluorescencia de cada paciente \pm la desviación estándar (DE). El control negativo consistió en muestras incubadas sin anticuerpo primario.

Tabla V. Características clinicopatológicas de las biopsias analizadas. A) Muestras de meduloblastoma desmoplásico, **B)** clásico y **C)** tejido cerebelar sano. H: hombre, M: mujer. –Datos desconocidos.

A	Muestra	Sexo	Edad	B	Muestra	Sexo	Edad	C	Muestra	Sexo	Edad
	Q11-111-2	H	2		Q91-1490-2	H	5		Q11-23-C7	M	13
	Q05-1921-2	M	1		Q14-1728-5	H	8		A16-43-C10	H	2
	Q13-187-4	H	3		98-1097-1	M	7		A16-24-C12	M	2
	Q13-1536-4	H	4		Q14-743-2	H	5		C1510-19	-	-
	Q16-305-2	H	9		Q03-1918-2	M	3				
	Q01-2196-3	H	4		Q01-790-2	H	3				
	94-1381-1	H	8		Q13-1623-1	H	10				
	Q03-108-1	M	1		Q11-1936-2	H	2				
	Q03-472-3	H	7		Q08-1792	H	7				
	Q98-477	M	1		Q95-1558-C	H	4				

Correlación de Spearman del contenido de las proteínas RE β -PKC α y RE β -PKC δ en muestras de meduloblastoma.

Los valores de fluorescencia de las muestras analizadas fueron utilizados para obtener el coeficiente de correlación de Spearman mediante el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos de las curvas de proliferación, así como los obtenidos en los ensayos de BrdU y el contenido del RE β en células estimuladas con DPN a 72 horas, se analizaron por ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey o Dunnet. El contenido de PKC α y PKC δ inmunoprecipitado con el RE β , así como el del RE β fosforilado se analizaron por ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. El contenido del RE β en células estimuladas con DPN a 72 horas, el de PKC α y PKC δ tras la estimulación con TPA a 72 horas, así como los valores de fluorescencia relativa obtenidos de las biopsias de meduloblastoma se analizaron mediante la prueba t de student. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos. Las gráficas mostradas representan la media \pm EEM o DE en el caso de las biopsias.

12. RESULTADOS

Evaluación del papel del RE β en la proliferación de la línea celular DAOY.

Para evaluar la función del RE β en la proliferación de la línea celular DAOY, los cultivos celulares se estimularon con el agonista del RE β DPN (0.1 nM, 1 nM y 10 nM). Mediante el método de exclusión con azul de tripano se observó que el vehículo no modificó el número celular ni la incorporación de BrdU respecto al control (Figs. 10A, 11B). Los tratamientos con DPN 0.1 nM y 1 nM provocaron aumento significativo en el número de células a 72 horas de tratamiento respecto al control y al vehículo (Fig. 10A). Durante la realización del experimento no se observaron diferencias en la viabilidad celular (Fig. 10B). Adicionalmente, el tratamiento con DPN 1 nM aumentó el contenido del RE β a 72 horas (Fig. 10C). Utilizando el método de incorporación de BrdU se observó aumento significativo en el número de células positivas a BrdU a las 72 horas de tratamiento con DPN 1 nM respecto al control y al vehículo (Figs. 11A y 11B). Ya que no se observaron diferencias entre el control y el tratamiento vehículo, los siguientes experimentos de proliferación y viabilidad celular se analizaron únicamente respecto al vehículo.

Para determinar la concentración a la cual el PHTPP contrarresta el aumento en la proliferación celular inducido por el DPN 1 nM en la línea celular evaluada, se realizaron ensayos de proliferación y viabilidad celular empleando el antagonista del RE β a 1, 10 y 100 nM, seguido del DPN 1 nM. Tanto el ensayo de exclusión con azul de tripano como el de incorporación de BrdU indicaron que el PHTPP 10 nM inhibe el efecto inducido por el DPN 1 nM (Figs. 12A, C, D). Durante la realización del experimento no se observaron cambios en la viabilidad celular (Fig. 12B). Estos resultados indican que la activación del RE β está involucrada en la promoción de la proliferación celular en la línea celular DAOY, además de que retroalimenta positivamente su expresión.

Contenido del RE β en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico.

Con el objetivo de evaluar el contenido del RE β en biopsias de meduloblastoma, 10 biopsias de meduloblastoma desmoplásico, 10 de clásico y 4 muestras de cerebelo sano se analizaron mediante inmunofluorescencia. A pesar de que la mayoría de las muestras desmoplásicas presentaron niveles de fluorescencia mayores al cerebelo sano, no se encontró diferencia significativa entre estos grupos (Fig. 13). En cambio, el grupo clásico presentó fluorescencia relativa significativamente mayor respecto al cerebelo sano, lo cual sugiere que el RE β participa en la regulación de la proliferación celular de los meduloblastomas de este tipo.

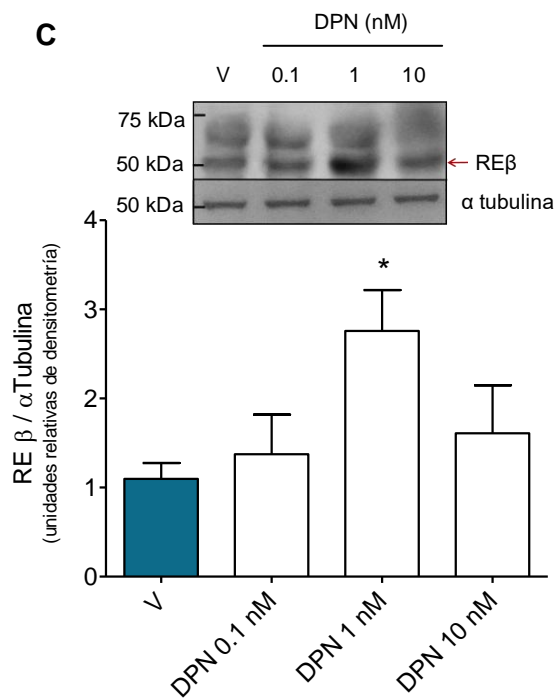
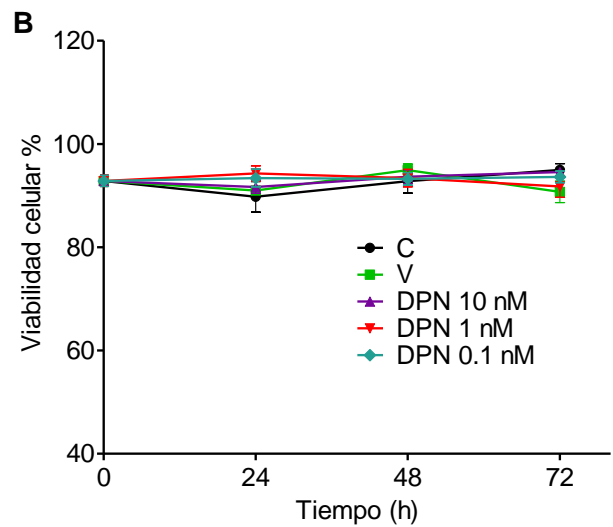
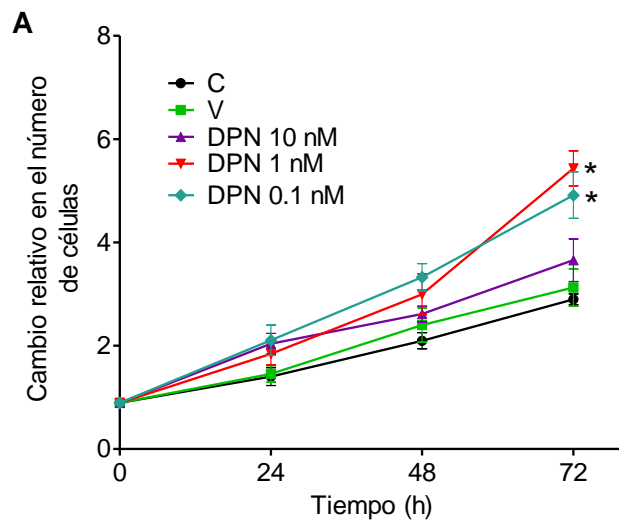


Fig. 10. El agonista del REβ, DPN, incrementa significativamente el número celular y el contenido del REβ en la línea celular DAOY. A) Determinación del cambio relativo en el número de células por el método de exclusión con azul tripano en cultivos celulares sin tratamiento, estimulados con el vehículo y con DPN 0.1, 1 y 10 nM. Los tratamientos se colocaron al tiempo 0. **B)** Viabilidad celular de los cultivos celulares sin tratamiento, estimulados con el vehículo y con DPN a diferentes concentraciones, determinada por el método de exclusión con azul de tripano; tiempo 0: viabilidad celular de células control. Las gráficas representan la media ± EEM de al menos 3 experimentos independientes. *P<0.05 respecto al control y al vehículo. C: control (células sin tratamiento); V: vehículo (DMSO 0.1%). **C)** Evaluación del contenido del REβ en cultivos celulares tratados con el vehículo y con DPN 0.1, 1 y 10 nM después de 72 horas. La gráfica representa la media ± EEM de al menos 3 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (C=1). *P<0.05 respecto al vehículo.

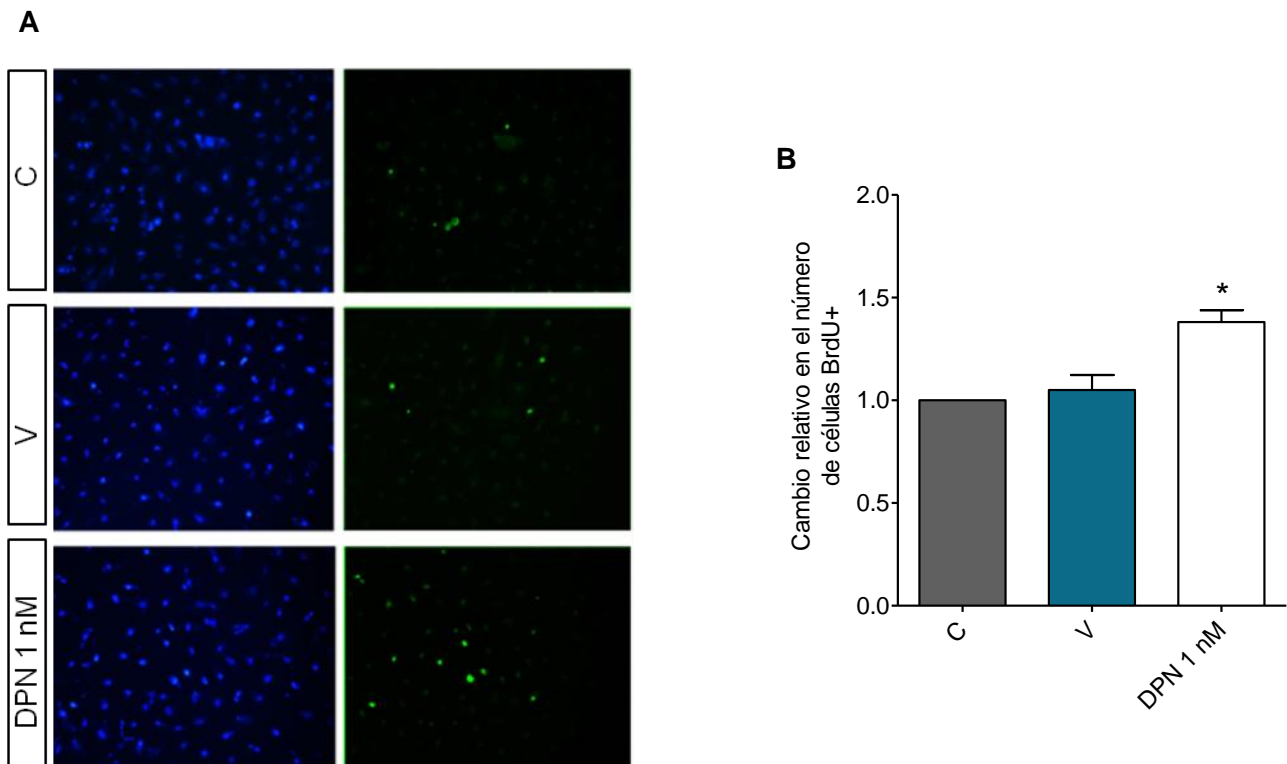


Fig. 11. El agonista del RE β , DPN 1 nM, incrementa significativamente la incorporación de BrdU en la línea celular DAOY. A) Imagen representativa de la incorporación de BrdU en células DAOY sin tratamiento, tratadas con vehículo o con DPN 1 nM después de 72 horas, x200. **B)** Cuantificación de la incorporación de BrdU como indicador de la proliferación celular en células sin tratamiento, tratadas con vehículo o con DPN después de 72 horas, x200. La gráfica representa la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes.* $P < 0.05$ respecto al vehículo. C: control (células sin tratamiento); V: vehículo (DMSO 0.1%).

Determinación de la localización subcelular del RE β y de la PKC α tras la activación de PKCs clásicas y nuevas en la línea celular DAOY.

Se ha reportado que la actividad transcripcional de los RE puede ser regulada por fosforilación; de acuerdo con los resultados encontrados en ensayos *in silico* utilizando los programas KinasePhos 0.1, NetPhos 2.0 y GPS 2.0, existe elevada probabilidad de que la PKC α fosforile al RE β .

Para evaluar la posible interacción entre el RE β y la PKC α en la línea celular DAOY, los cultivos celulares fueron estimulados con el activador de PKCs clásicas y nuevas, TPA 1 μ M, durante 5, 15, 30 y 60 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la localización de estas proteínas mediante inmunofluorescencia. De manera basal, la línea celular DAOY presentó abundante expresión de PKC α localizada principalmente en el citoplasma, mientras que el RE β se observó localizado principalmente en el núcleo (Fig. 14).

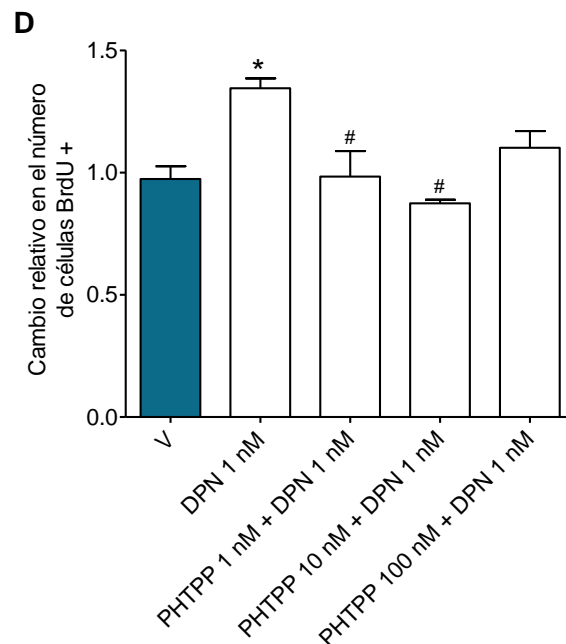
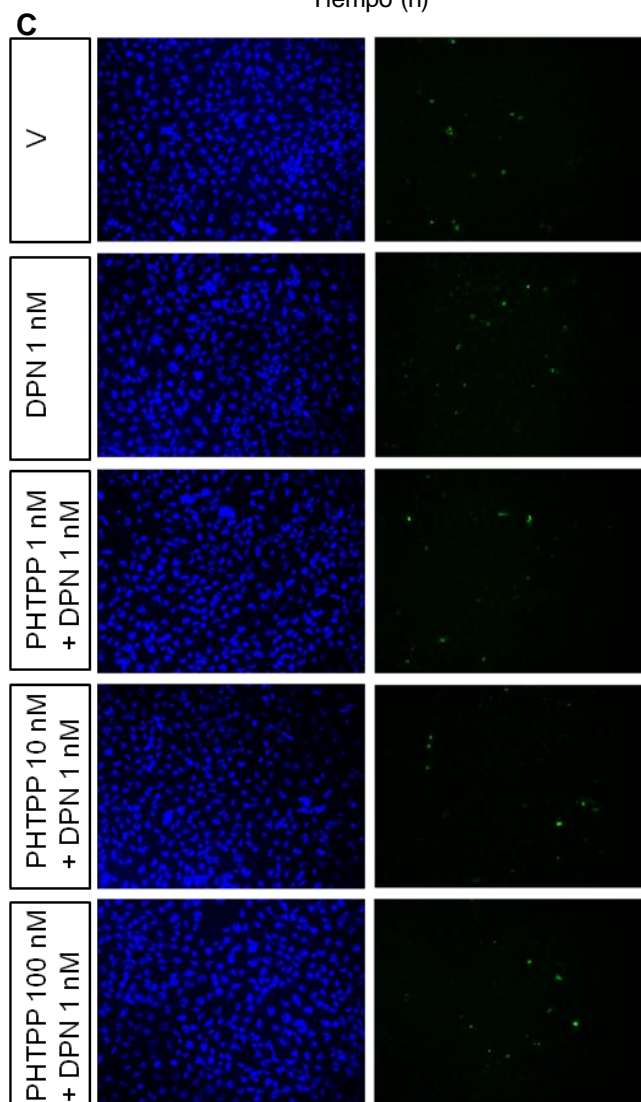
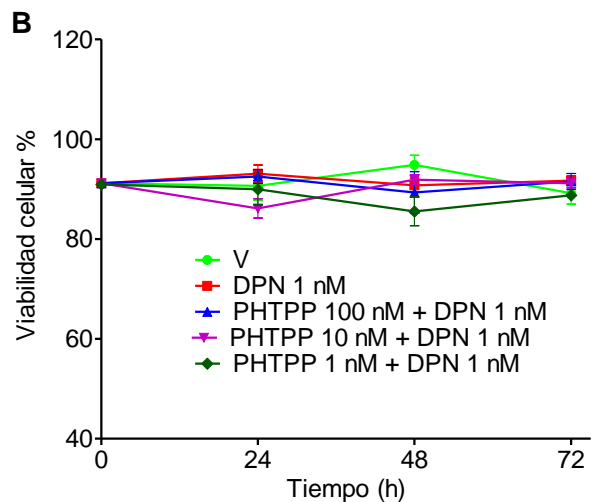
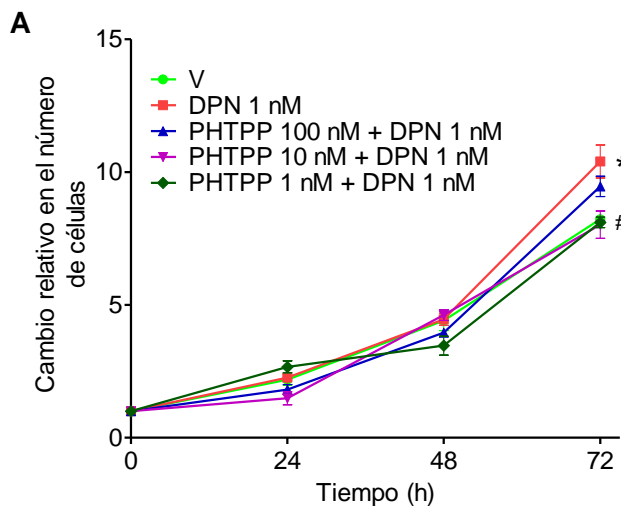


Fig. 12. El antagonista del RE β , PHTPP 1 y 10 nM, bloquea el incremento en la proliferación inducido por el DPN. A) Determinación del cambio relativo en el número de células por el método de exclusión con azul tripano en cultivos celulares estimulados con el vehículo, con DPN 1 nM y PHTPP a 1, 10 y 100 nM + DPN 1 nM. **B)** Viabilidad celular de los cultivos celulares estimulados como se mencionó en A; tiempo 0: viabilidad de células control. Las gráficas representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ respecto al vehículo, # $P < 0.05$ respecto a DPN 1 nM. V: vehículo (DMSO 0.1%). **C)** Imagen representativa de la incorporación de BrdU en las células estimuladas con el vehículo, DPN 1 nM y PHTPP a 1, 10 y 100 nM + DPN 1 nM a 72 horas, $\times 200$. **D)** Cuantificación de la incorporación de BrdU como indicador de la proliferación en células tratadas como se indicó en C. La gráfica representa la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (C=1). * $P < 0.05$ respecto al vehículo, # $P < 0.05$ respecto a DPN 1 nM. V: vehículo (DMSO 0.1%).

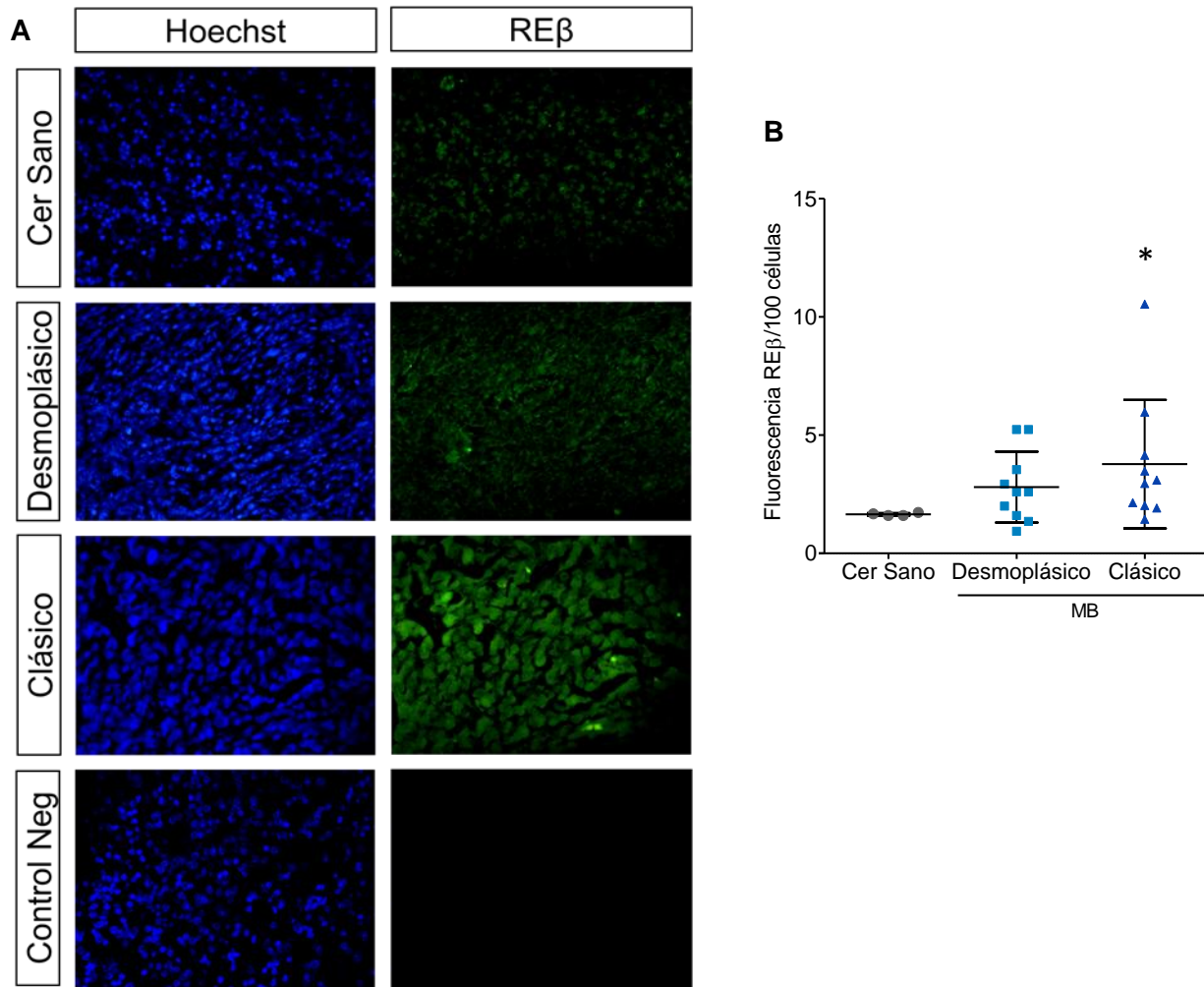


Fig. 13. Las muestras de meduloblastoma clásico presentan contenido del RE β significativamente mayor que el cerebelo sano. A) Imágenes representativas del contenido de RE β en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico. Se muestra la fluorescencia de Hoechst (azul) y AlexaFluor488 (verde), x600. **B)** Cuantificación de la fluorescencia relativa del anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor488 que reconoce al anticuerpo contra el RE β por cada 100 células en las muestras de cerebelo sano y meduloblastoma desmoplásico y clásico. La gráfica representa la media \pm DE. Cada punto representa el promedio de por lo menos 17 campos por individuo. *P<0.05 respecto al cerebelo sano. Cer: cerebelo; Neg: negativo; MB: meduloblastoma.

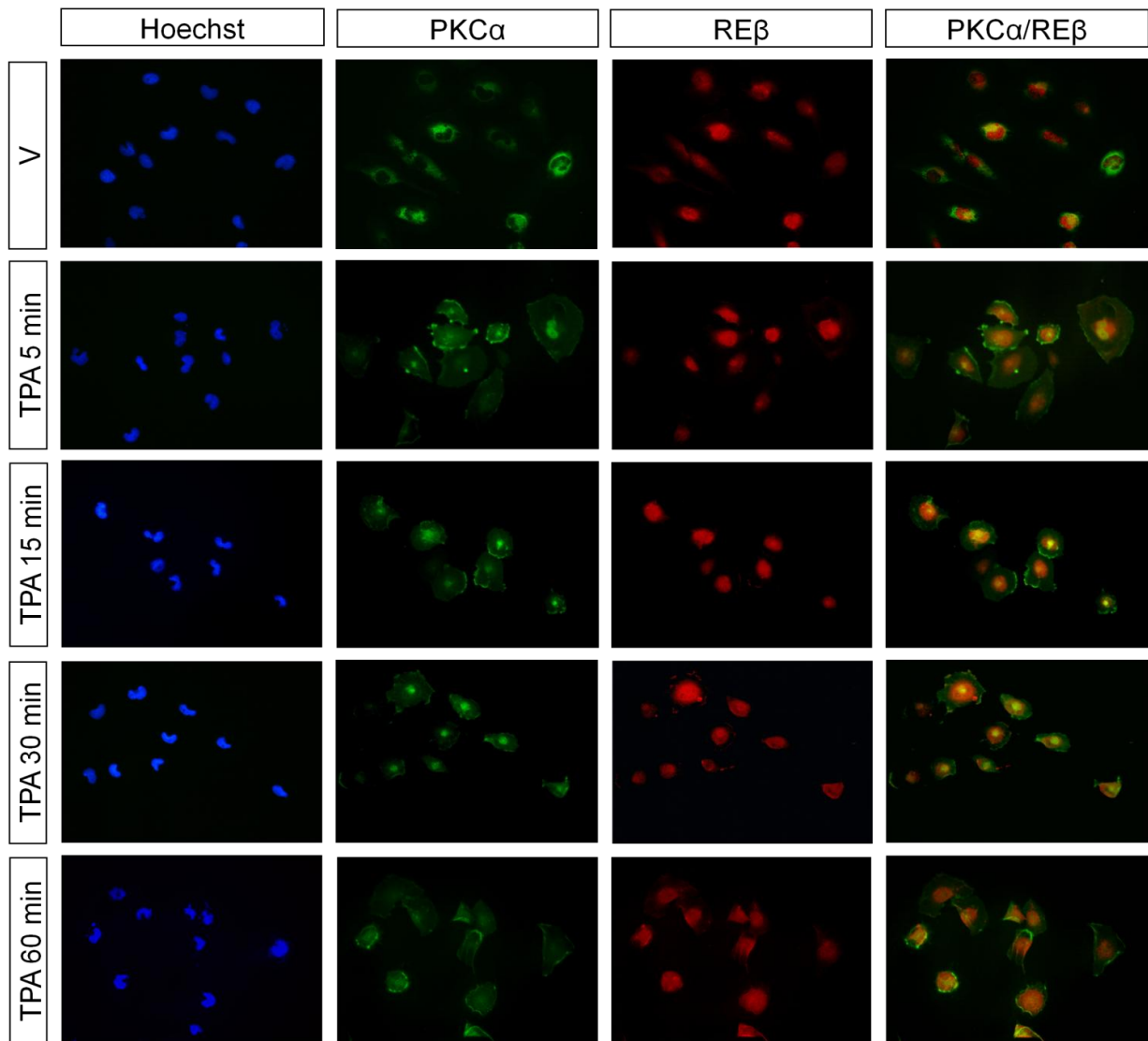


Fig. 14. El tratamiento con TPA induce la translocación de la PKC α al núcleo en células DAOY. Inmunofluorescencia de células DAOY tratadas con TPA 1 μ M marcadas con anticuerpos contra PKC α y contra RE β . Se muestra la fluorescencia de Hoechst (azul), AlexaFluor488 (verde) y Alexa Fluor 594 (rojo), x600. V: vehículo (DMSO 0.1%).

Al estimular los cultivos celulares con TPA, se observó la translocación de PKC α hacia el núcleo y membrana citoplasmática desde los 5 y hasta los 60 minutos de tratamiento, por lo que se observó colocalización de las proteínas en el núcleo celular (Fig. 14). Estos resultados sugieren que la PKC α interactúa con el RE β .

Evaluación del efecto de la activación de PKCs clásicas y nuevas sobre la proliferación de la línea celular DAOY.

Con la finalidad de determinar el efecto de la activación de las PKCs clásicas y nuevas sobre la proliferación de la línea celular DAOY, los cultivos celulares fueron estimulados con TPA 1 μ M (Fig.

15). La estimulación con DPN 1 nM se utilizó como control positivo de la proliferación. Mediante el método de exclusión por azul de tripano, se observó que el tratamiento con TPA 1 μ M disminuyó significativamente la proliferación celular después de 72 horas respecto al vehículo (Fig. 15A). Para estudiar si el RE β estaba involucrado en el mecanismo a través del cual las PKCs disminuyen la proliferación celular, se realizó la estimulación de los cultivos con TPA 1 μ M + DPN 1 nM, así como con PHTPP 10 nM + TPA 1 μ M. Los resultados mostraron que después de 72 horas de tratamiento, el TPA 1 μ M bloqueó el incremento en la proliferación inducido por el DPN 1 nM (Fig. 15A). Además, el tratamiento conjunto con PHTPP 10 nM + TPA 1 μ M decrementó significativamente la proliferación respecto al tratamiento únicamente con TPA 1 μ M después de 48 horas, con tendencia a la disminución después de 72 horas, potenciando el decremento en la proliferación inducido por el TPA (Fig. 15A). El tratamiento con PHTPP de manera individual no provocó diferencias en la proliferación celular respecto al vehículo. Los diferentes tratamientos no provocaron cambios en la viabilidad celular a lo largo del experimento (Fig. 15B).

Utilizando el método de incorporación de BrdU se observó que los tratamientos con TPA 1 μ M, TPA 1 μ M + PHTPP 10 nM y PHTPP 10 nM disminuyeron significativamente el número de células que incorporaron BrdU respecto al vehículo después de 72 horas de tratamiento. Además, se observó que el tratamiento con TPA 1 μ M bloqueó el efecto inducido por el DPN 1 nM después de 72 horas, lo cual coincide con los resultados observados con el método de exclusión con azul de tripano. Estos resultados indican que la activación de las PKCs clásicas y nuevas disminuye la proliferación celular a través de un mecanismo que involucra al RE β .

Ya que el TPA activa tanto a las PKCs clásicas como a las nuevas y no es selectivo para PKC α , se utilizó Gö 6976 1 μ M, un inhibidor selectivo de la misma, para tratar de elucidar la participación de esta cinasa en la disminución de la proliferación celular provocada por la activación de las PKCs clásicas y nuevas. Mediante el método de exclusión con azul de tripano se observó que el tratamiento con este compuesto bloqueó la proliferación celular cuando se colocó individualmente o de manera conjunta con TPA 1 μ M o con DPN 1 nM (Fig. 16A). Los tratamientos no afectaron la viabilidad celular a lo largo del experimento (Fig. 16B). Además, mediante el método de incorporación de BrdU se observó que el hecho de tratar a los cultivos celulares con Gö 6976 1 μ M disminuyó significativamente el número de células BrdU positivas respecto al vehículo después de 72 horas, sin importar si fueron tratadas solo con este fármaco o de manera conjunta con TPA y/o DPN (Fig. 16C), lo cual concuerda con los resultados observados por el método de exclusión por azul de tripano. El bloqueo en la proliferación celular provocado por el Gö 6976 1 μ M puede deberse a los múltiples blancos que inhibe además de la PKC α , por lo que no fue posible evaluar la

participación de la cinasa de interés en la proliferación celular mediante este ensayo. Para este fin, es necesario realizar ensayos que permitan inhibir o silenciar específicamente a la PKC α .

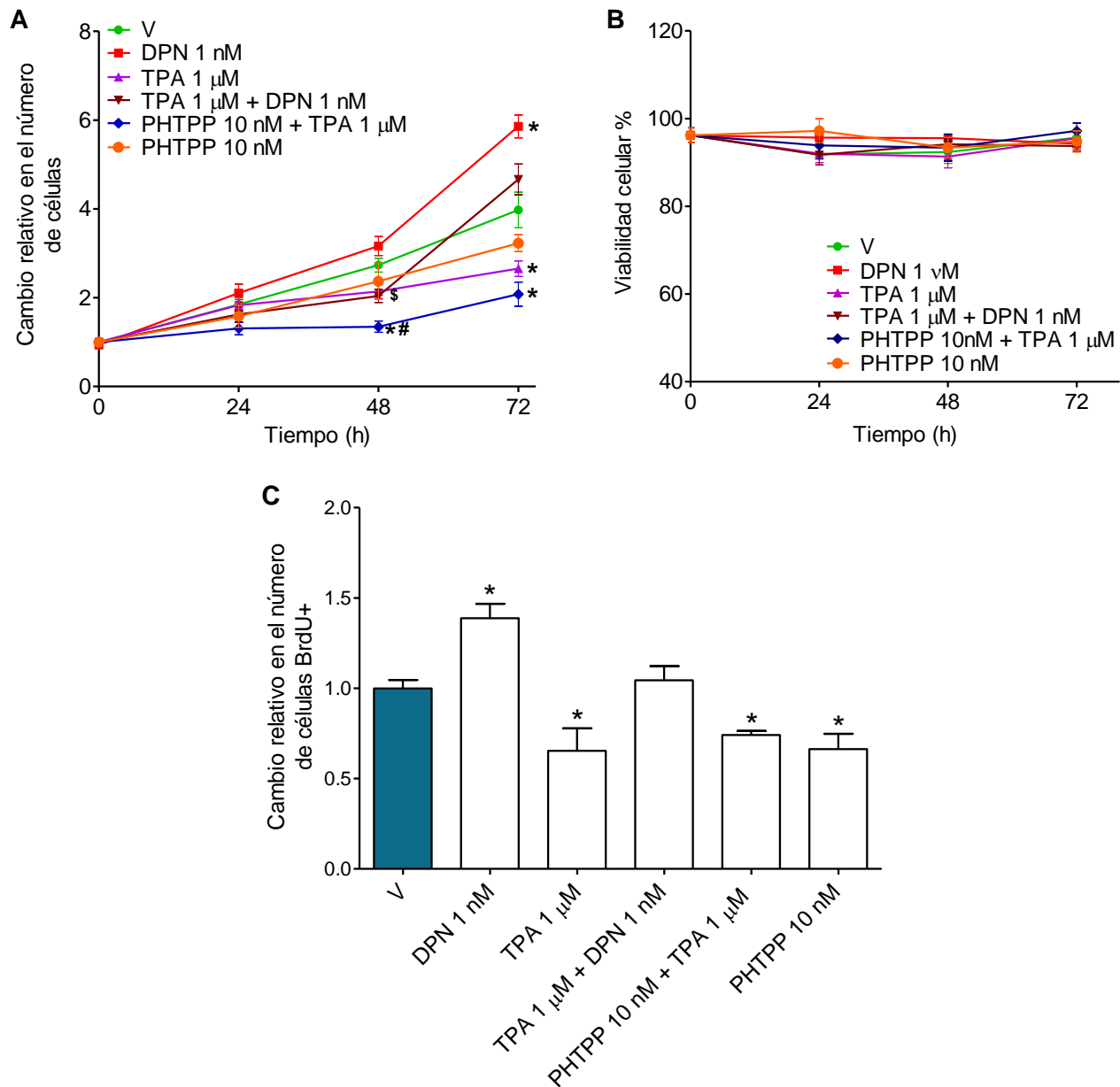


Fig. 15. El tratamiento con TPA disminuye significativamente la proliferación de la línea celular DAOY. A) Determinación del cambio relativo en el número de células por el método de exclusión con azul tripano en cultivos celulares estimulados con vehículo, DPN, TPA, TPA + DPN, PHTPP + TPA y PHTPP. **B)** Viabilidad celular de los cultivos celulares con los diferentes tratamientos descritos en A; tiempo 0: viabilidad celular de células control. Las gráficas representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ respecto al vehículo. # $P < 0.05$ respecto a TPA 1 μ M, \$ $P < 0.05$ respecto a DPN 1 nM. V: vehículo (DMSO 0.1%). **C)** Cuantificación de la incorporación de BrdU como indicador de la proliferación de los cultivos tratados con el vehículo, DPN, TPA, TPA + DPN, PHTPP + TPA y PHTPP durante 72 horas. La gráfica representa la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (C=1). * $P < 0.05$ respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%).

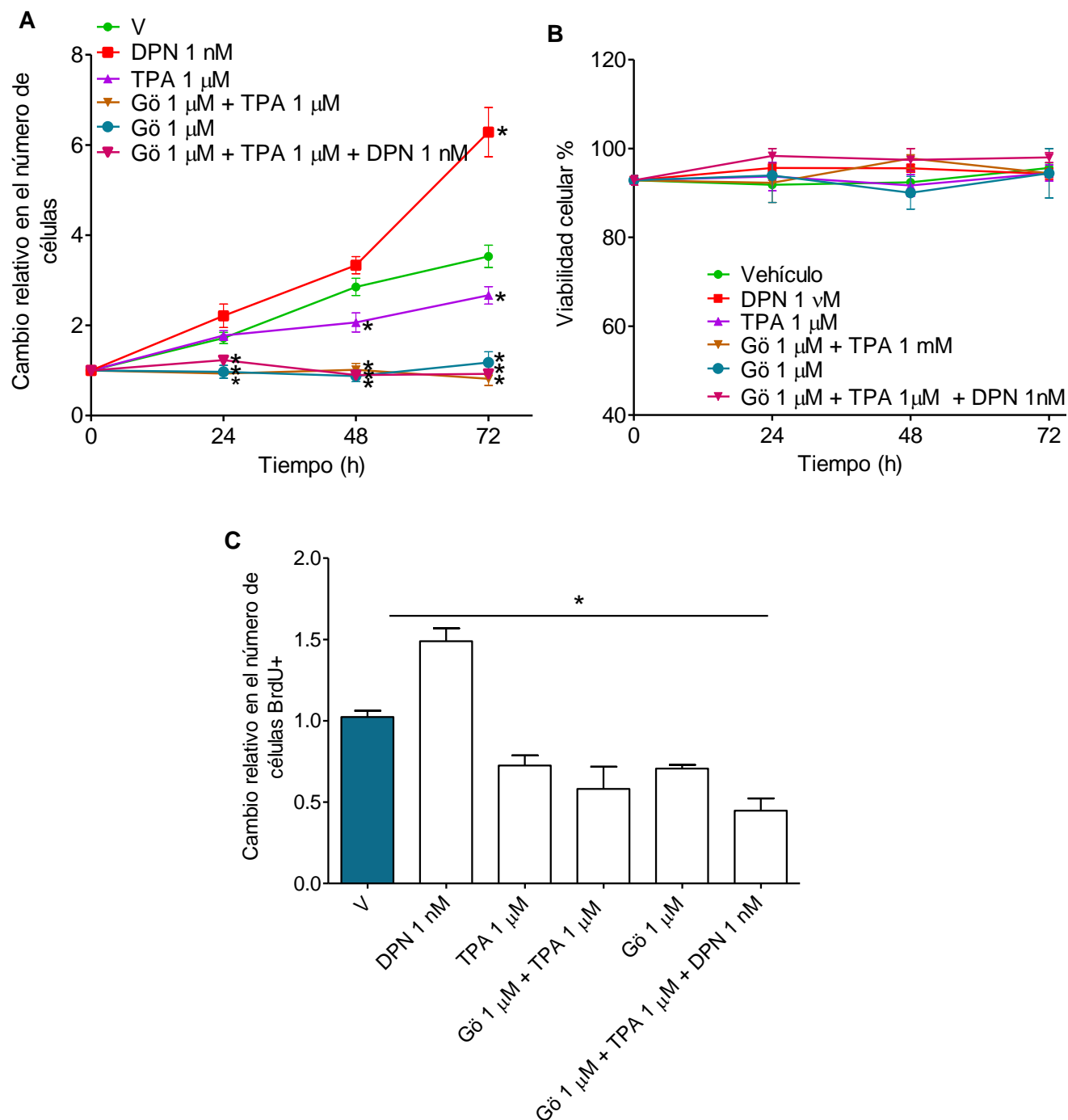


Fig. 16. El tratamiento con Gö 6976 1 μ M bloquea la proliferación de la línea celular DAOK. A) Determinación del cambio relativo en el número de células por el método de exclusión con azul tripano en cultivos celulares estimulados con vehículo, DPN, TPA, TPA + Gö, Gö y Gö + TPA + DPN. **B)** Viabilidad celular de los cultivos celulares con los diferentes tratamientos descritos en A; tiempo 0: viabilidad celular de células control. Las gráficas representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%). **C)** Cuantificación de la incorporación de BrdU como indicador de la proliferación de los cultivos tratados con el vehículo, DPN, TPA, TPA + Gö, Gö y Gö + TPA + DPN durante 72 horas. La gráfica representa la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (C=1). * $P < 0.05$ respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%).

Posteriormente, se decidió estudiar la posible participación de otras PKCs en la disminución de la proliferación de la línea celular DAOY provocada por el TPA. Antes que nada, se estudió la presencia de PKC δ en la línea celular DAOY, ya que se ha reportado ampliamente que induce señales antiproliferativas en diversos tipos de cáncer (Martin y Fabbro, 2007; Do Carmo et al., 2013), así como de PKC ϵ , que es considerada la PKC con mayor potencial carcinogénico (Do Carmo et al., 2013). Contrario a lo que había sido reportado por Adesina y colaboradores en 1998, se encontró que la línea celular DAOY expresa abundantemente PKC δ (Fig. 17A, panel superior), mientras que no se encontró contenido de la PKC ϵ . El panel inferior de la figura 17A muestra el control positivo de las proteínas PKC α , PKC δ y PKC ϵ utilizando la línea celular U251 de glioblastoma humano, pues ya se ha reportado el contenido de las cinasas en esta línea celular (Marquina-Sánchez et al., 2017; González-Arenas et al., 2015). Posteriormente, para tratar de evaluar el papel de la PKC δ en la disminución de la proliferación celular inducida por el TPA 1 μ M en la línea celular evaluada, se utilizó el inhibidor de esta cinasa, rottlerina. Mediante el método de exclusión por azul de tripano se observó que el tratamiento con este compuesto impidió la proliferación celular a todos los tiempos evaluados, misma que no pudo ser recuperada a pesar de la adición de DPN y/o TPA (Fig 17B). Los diferentes tratamientos no provocaron cambios en la viabilidad celular (Fig. 17C). Además de esto, mediante el método de incorporación de BrdU fue posible observar que el tratamiento con rottlerina de manera individual o en conjunto con TPA o TPA + DPN disminuyó el número de células BrdU positivas respecto al vehículo a 72 horas (Fig. 17D), lo cual correlaciona con los resultados observados mediante el método de exclusión por azul de tripano. Se ha reportado que la rottlerina es capaz de inhibir a otras cinasas además de las PKC δ lo cual podría explicar el bloqueo que causa en la proliferación de las células DAOY. Debido a este comportamiento, el uso de rottlerina 1 μ M no permitió evaluar la participación de la PKC δ , por lo que se hace necesario el uso de un sistema específico para PKC δ , que podría ser el silenciamiento de la misma.

Determinación de la localización subcelular del RE β y de la PKC δ tras la activación de PKCs en la línea celular DAOY.

Mediante ensayos *in silico*, nuestro grupo de trabajo encontró que el RE β puede ser fosforilado no solo por PKC α , sino también por PKC δ , por lo que se decidió estudiar si el RE β y PKC δ interactuaban de alguna forma cuando esta cinasa era activada, tal como se había observado con PKC α , por lo que se procedió a realizar experimentos de inmunofluorescencia para analizar la localización subcelular de la PKC δ y del RE β después del tratamiento con TPA 1 μ M, durante 5, 15, 30 y 60 minutos. Los resultados mostraron que la línea celular DAOY presenta contenido basal de

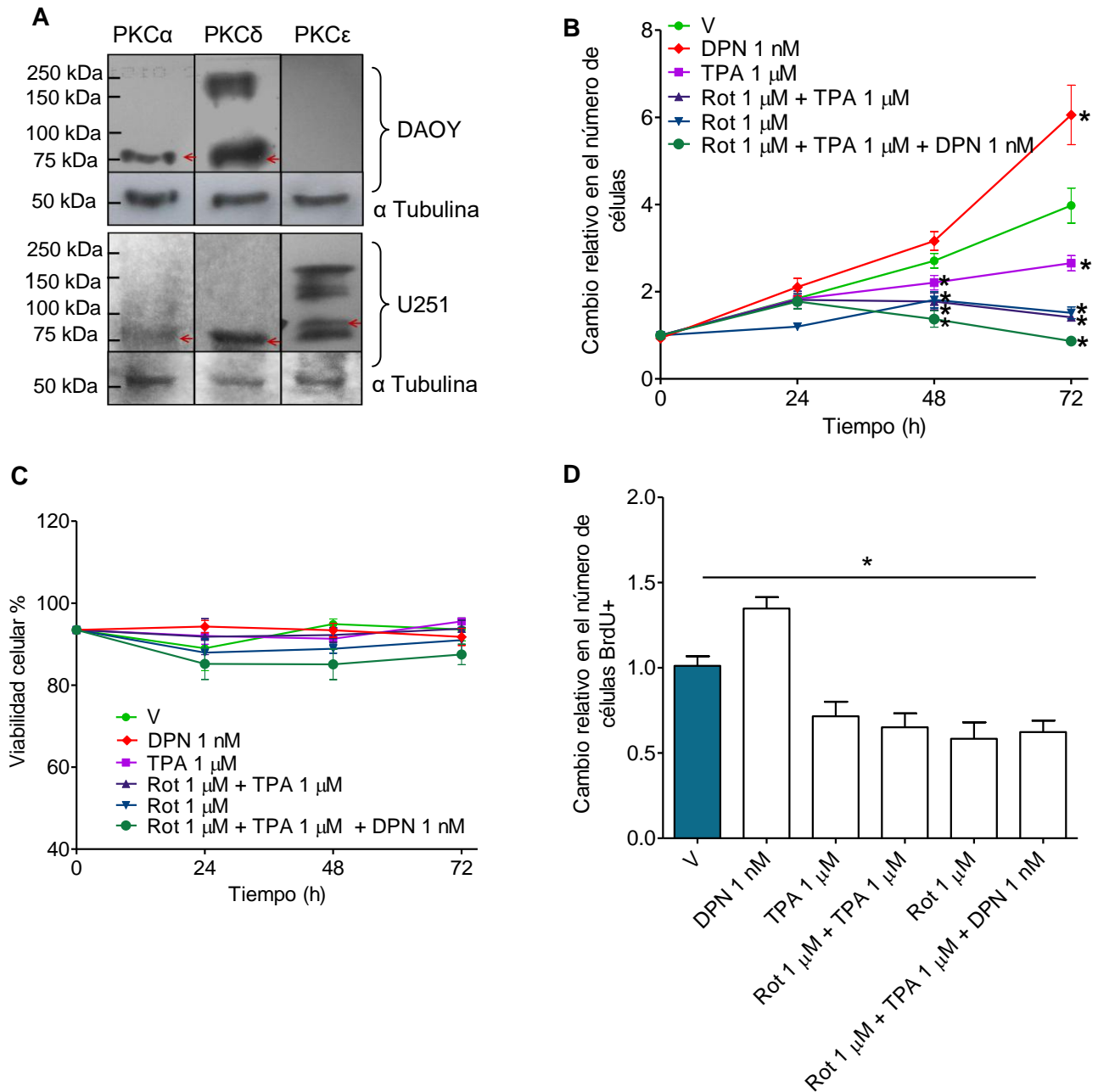


Fig. 17. El tratamiento con Rotenone 1 μM bloquea la proliferación de la línea celular DAOY. A) Detección de PKCα, δ y ε en la línea celular DAOY mediante western blot y en células U251 de meduloblastoma humano como control positivo. **B)** Determinación del cambio relativo en el número de células por el método de exclusión con azul tripano en cultivos celulares estimulados con vehículo, DPN, TPA, Rot + TPA, Rot y Rot + TPA + DPN. **C)** Viabilidad celular de los cultivos estimulados con los diferentes tratamientos descritos en B; tiempo 0: viabilidad celular de células control. Las gráficas representan la media ± EEM de al menos 3 experimentos independientes. *P<0.05 respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%). **D)** Cuantificación de la incorporación de BrdU como indicador de la proliferación de los cultivos tratados con el vehículo, DPN, TPA, Rot + TPA, Rot y Rot + TPA + DPN durante 72 horas. La gráfica representa la media ± EEM de al menos 3 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (C=1). *P<0.05 respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%).

PKC δ localizada principalmente en el citoplasma, y como ya se había visto con anterioridad, el RE β se localiza predominantemente en el núcleo. La estimulación con TPA 1 μ M provocó que PKC δ se translocara al núcleo desde los 5 y hasta los 30 minutos de tratamiento, por lo que se observó la colocalización de esta cinasa con el RE β (Fig. 18). Mediante ensayos de inmunoprecipitación se observó asociación basal entre la PKC δ y el RE β , misma que incrementó significativamente desde 5 minutos y se mantuvo hasta 30 minutos de tratamiento (Fig. 19). Estos resultados sugieren que es probable que PKC δ interactúe con el RE β en el núcleo celular.

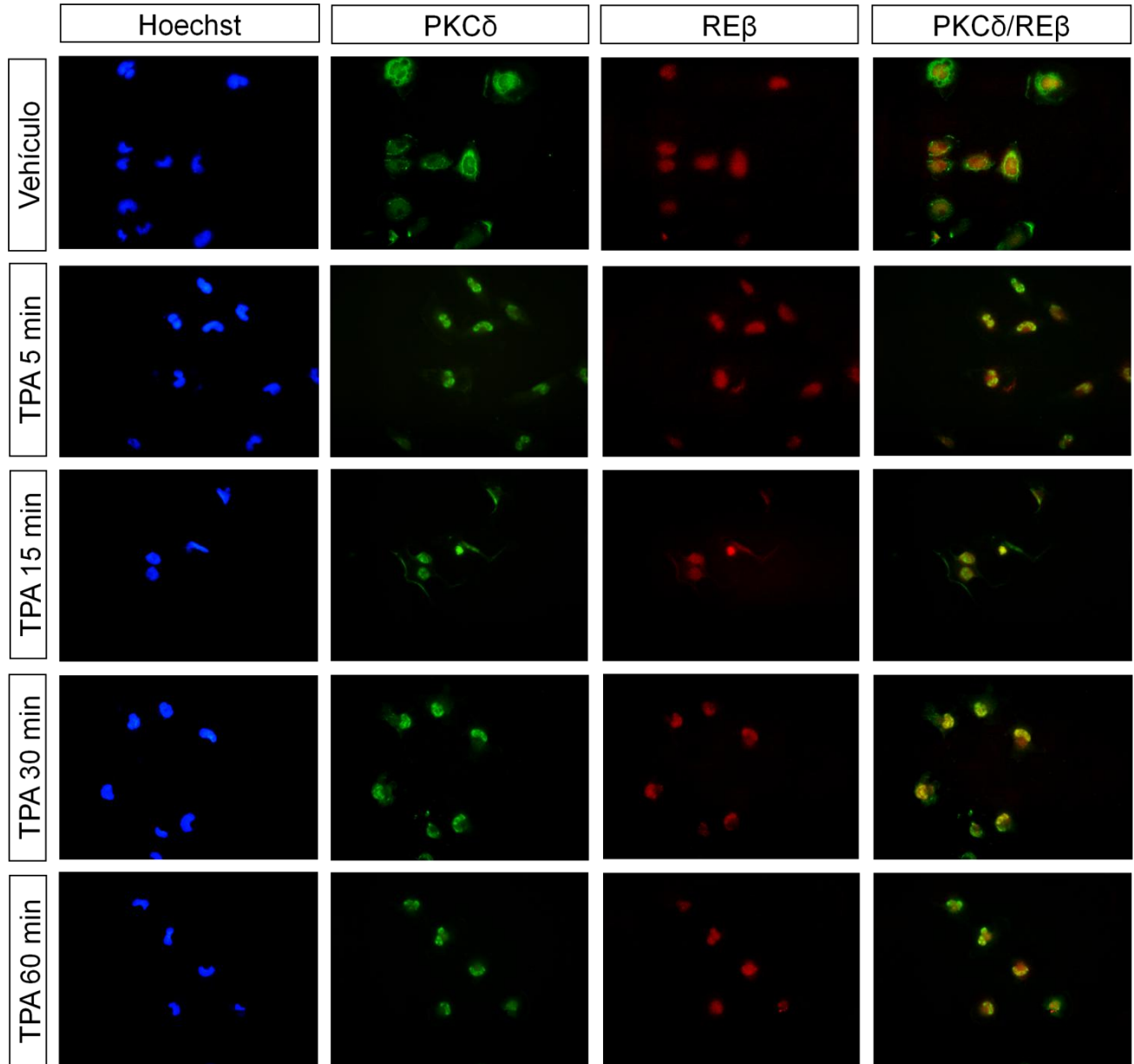


Fig. 18. El tratamiento con TPA induce la translocación de la PKC δ al núcleo de células DAOY. Inmunofluorescencia de células DAOY tratadas con TPA 1 μ M marcadas con anticuerpos contra PKC δ y RE β . Se muestra la fluorescencia de Hoechst (azul), AlexaFluor488 (verde) y Alexa Fluor 594 (rojo), x600.

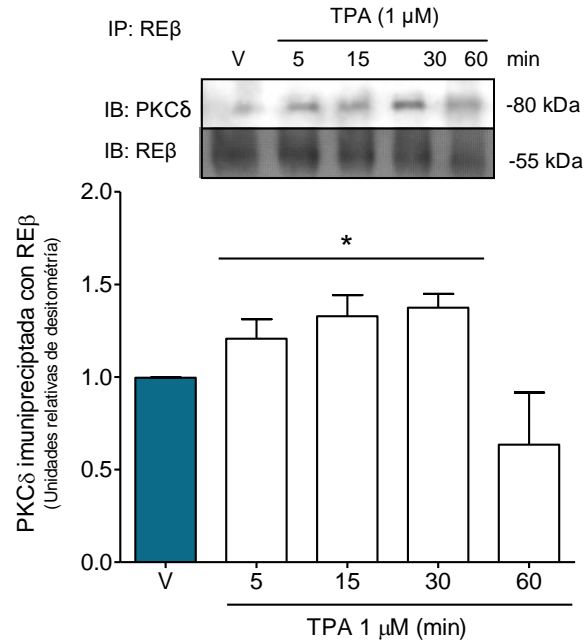


Fig. 19. El tratamiento con TPA incrementa la inmunoprecipitación de la PKC δ con el RE β . Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación del RE β y se detectó la proteína PKC δ mediante western blot. La gráfica representa la media \pm EEM de 2 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (control=1). *P<0.05 respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%), IP: inmunoprecipitación, IB: inmunoblot.

Como control del efecto del TPA sobre PKC α y PKC δ en la línea celular DAOY, se evaluó el contenido de estas después de 72 horas de tratamiento mediante western blot y se encontró, como ya ha sido reportado, que la activación de PKCs clásicas y nuevas por TPA es seguida de una disminución significativa en el contenido de estas (Wang et al., 2016) (Fig. 20A y B).

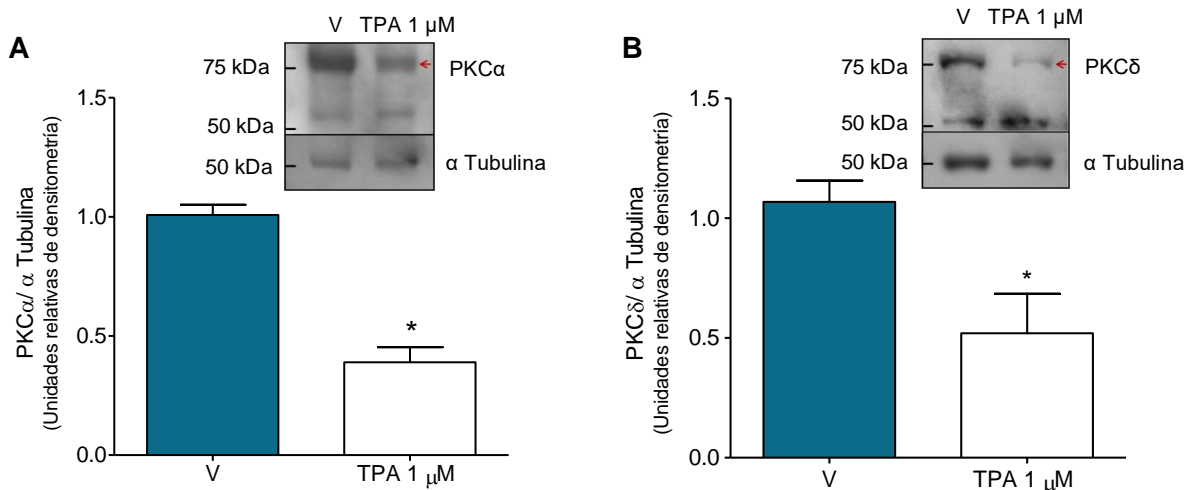


Fig. 20. El tratamiento con TPA disminuye el contenido de las PKC α y δ en la línea celular DAOY. Contenido de **A)** PKC α y **B)** PKC δ en células DAOY estimuladas con TPA 1 μ M durante 72 horas mediante western blot. Las gráficas representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. Valores normalizados respecto al control (control=1). *P<0.05 respecto al vehículo. V: vehículo (DMSO 0.1%).

Contenido de PKC α y PKC δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico.

Mediante inmunofluorescencia, se evaluó el contenido de PKC α y δ en biopsias de meduloblastoma desmoplásico y clásico. Se observó que 4 muestras de cada grupo presentaron contenidos de la PKC α mayores respecto al cerebelo sano, mientras que 6 de ellas mostraron niveles similares o por debajo del mismo (Figs. 21A, B). No se observaron diferencias significativas entre los grupos. En lo referente a PKC δ , 3 muestras de cada grupo histológico presentaron niveles de fluorescencia mayores a los observados en cerebelo sano (Figs. 21C, D), mientras que el resto de las muestras mostraron niveles similares a este. Según las muestras analizadas, el aumento en el contenido de PKC α y PKC δ es poco frecuente dentro los meduloblastomas clásicos y desmoplásicos. Es posible que el aumento de estas proteínas dependa de otros factores como las modificaciones genéticas presentadas en cada paciente. Además de esto, es importante tomar en cuenta que el número de muestras analizadas es reducido.

Correlación de Spearman del contenido de las proteínas RE β -PKC α y RE β -PKC δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico.

Se ha reportado que los meduloblastomas clásico presentan proliferación mayor respecto a los meduloblastomas desmoplásicos, y ya que nuestros resultados indican que el RE β está implicado en la proliferación de la línea celular DAOY derivada de un meduloblastoma y que además este efecto podría ser regulado por las PKCs, se decidió estudiar si existía correlación diferencial entre la expresión de los genes del RE β y los de las PKC α y δ , así como de las proteínas, en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico. Para este fin, se realizó el coeficiente de correlación de Spearman de los genes del RE β (ESR2) y de la PKC α (PRKCA) a partir de los datos proporcionados por el TCGA (The Cancer Genome Atlas por sus siglas en inglés) y PANCAN (Pancreatic Cancer Action Network por sus siglas en inglés) mediante la página Xenabrowser.net. En este sentido, se encontró que no existe correlación en la expresión de estos genes en los meduloblastomas clásicos y desmoplásicos (Fig. 13A). Al realizar la correlación de la fluorescencia de los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos empleados en las muestras de meduloblastoma analizadas para estudiar la correlación a nivel de proteínas, se encontró que no existe correlación entre estas dos variables ni en el tejido de cerebelo sano ni en las biopsias de meduloblastoma desmoplásico y clásico (Figs. 22B, C, D), lo cual coincide con los datos encontrados sobre expresión de genes. De igual forma, se encontró que no existe correlación entre la expresión de los genes que codifican al RE β y a la PKC δ (PRKCD) en los meduloblastomas de acuerdo con los datos proporcionados por Xenabrowser.net (Fig.23A).

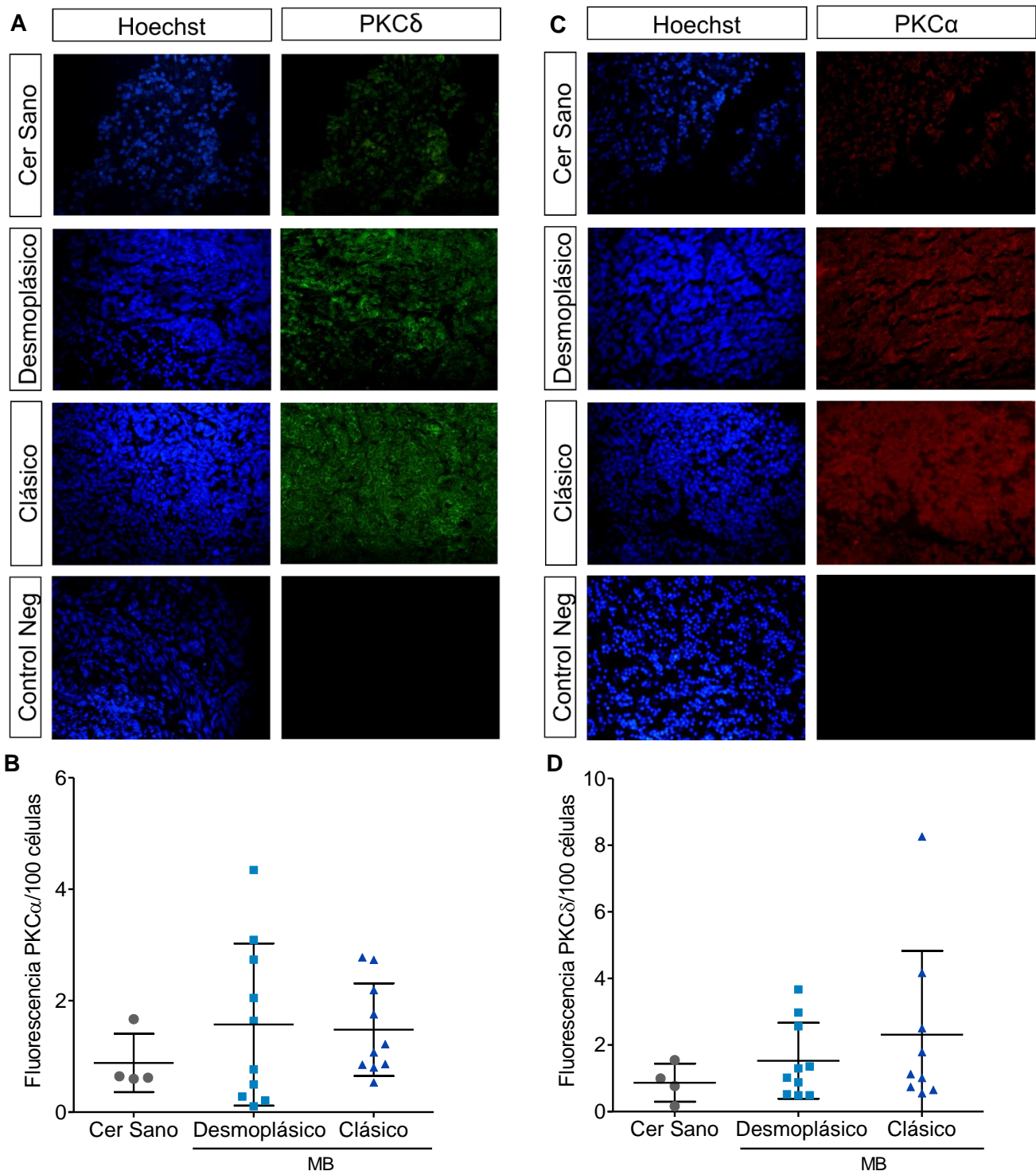


Fig. 21. El incremento en el contenido de PKC α y δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico es poco frecuente. Imágenes representativas del contenido de **A)** PKC α y **C)** PKC δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico. Se muestra la fluorescencia de Hoechst (azul), AlexaFluor488 (verde) y 594 (rojo), x600. Cuantificación de la fluorescencia de los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos que reconocen a **B)** PKC α y **D)** PKC δ en muestras de cerebelo sano y meduloblastomas clásicos y desmoplásicos. Las gráficas representan la media \pm DE. Cada punto representa un individuo. Cer: cerebelo; Neg: negativo; MB: meduloblastoma.

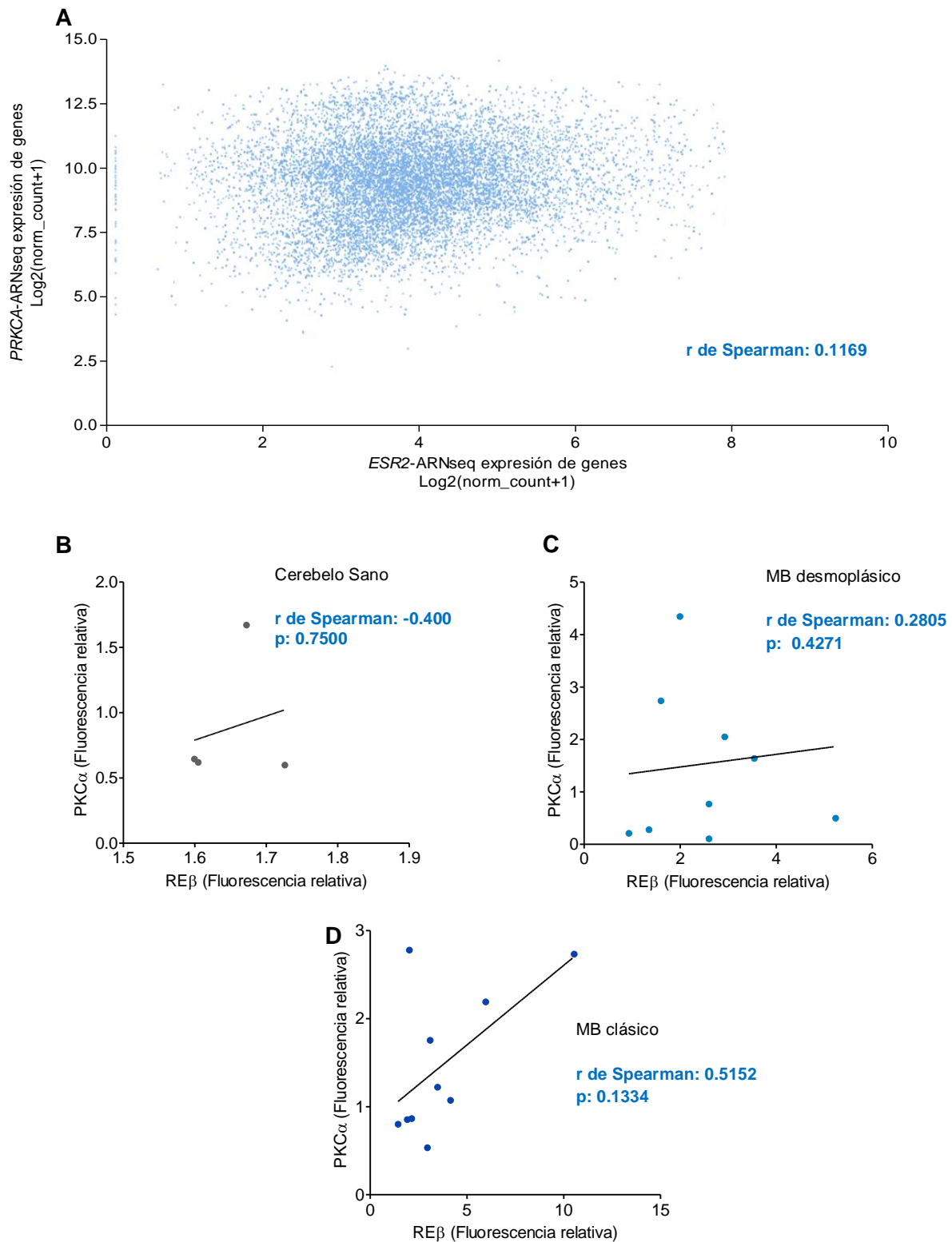


Fig. 22. Coeficiente de correlación de Spearman: RE β -PKC α . **A)** Coeficiente de correlación de Spearman de la expresión del gen *ESR2* (RE β) y *PRKCA* (PKC α) en meduloblastomas de diferentes grupos (bases de datos TCGA y PANCAN en Xenabrowser.net). Coeficiente de correlación de Spearman de la fluorescencia del anticuerpo secundario contra conejo que reconoce el anticuerpo anti RE β y del anticuerpo contra ratón que reconocer el anticuerpo anti PKC α en **B)** cerebelo sano, **C)** MB desmoplásico y **D)** MB clásico. MB: meduloblastoma.

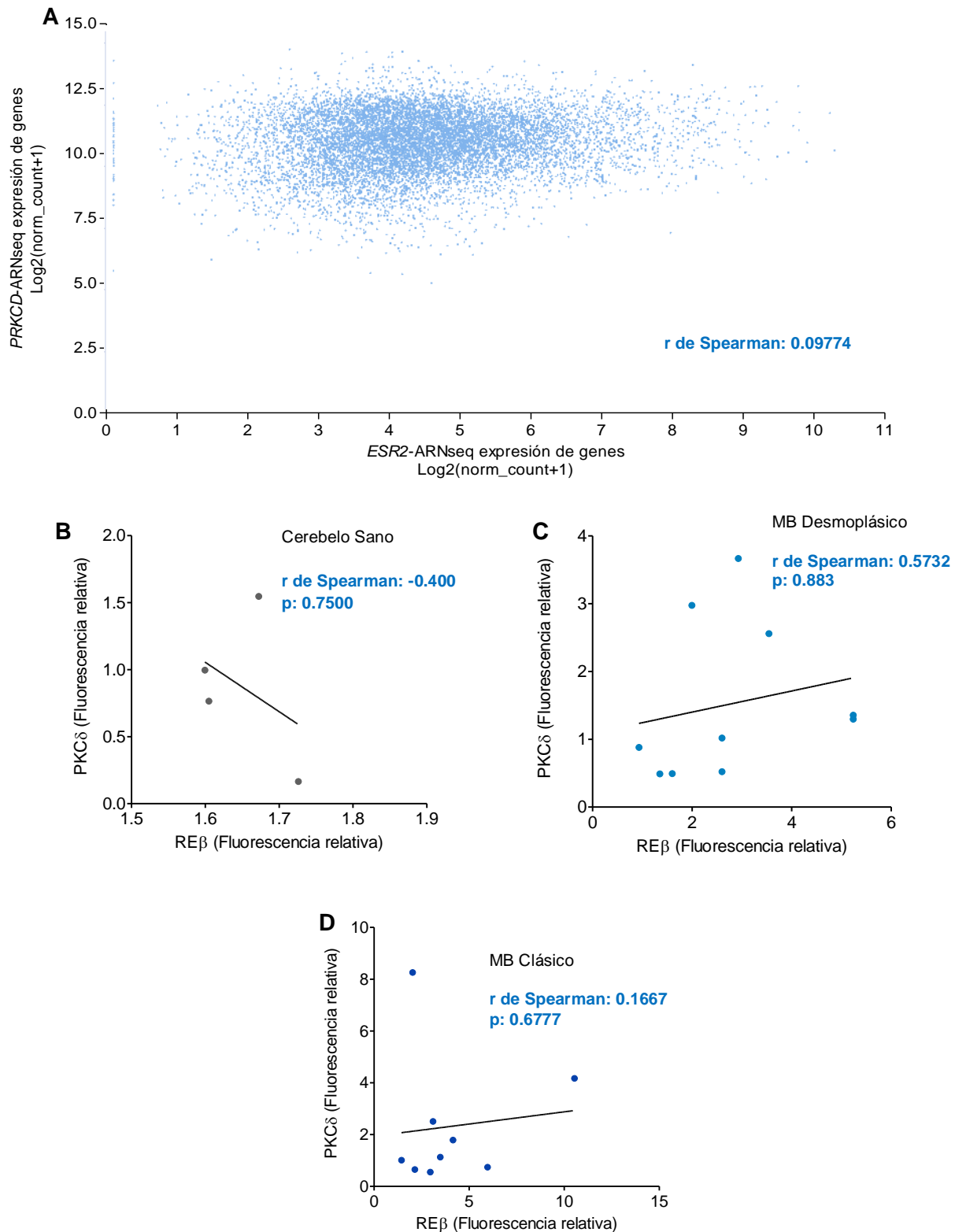


Fig. 23. Coeficiente de correlación de Spearman: RE β -PKC δ . **A)** Coeficiente de correlación de Spearman de la expresión del gen *ESR2* (RE β) y *PRKCD* (PKC δ) en meduloblastomas de diferentes grupos (bases de datos TCGA y PANCAN en Xenabrowser.net). Coeficiente de correlación de Spearman de la fluorescencia del anticuerpo secundario contra el RE β y la PKC δ en **B)** cerebelo sano, **C)** MB desmoplásico y **D)** MB clásico. MB: meduloblastoma.

Cuando se determinó el coeficiente de Spearman de la fluorescencia del RE β contra la fluorescencia de la PKC δ en las muestras de tejido sano, desmoplásico y clásico, se encontró que no hay una correlación significativa entre estas variables (Figs. 23B, C, D). Aunque no existe relación en el contenido de las proteínas estudiadas, no se puede descartar la regulación de las PKCs sobre el RE β .

13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A pesar de que los meduloblastomas son los tumores más frecuentes y agresivos en la población pediátrica, su estudio y caracterización aun es pobre. Por medio de estudios del perfil transcripcional de estos tumores ha sido posible identificar genes que caracterizan a cada grupo de los meduloblastomas y, de igual forma, se ha observado que existen genes que se expresan en todos ellos (Brandes et al., 2014, 2010, Li et al., 2013; De Braganca y Millard, 2015, Remke et al., 2011). Entre estos últimos se encuentra el RE β , que además de expresarse en los diversos grupos, se sabe que juega un papel importante en el desarrollo y maduración de los progenitores de células granulares cerebelares (Belcher et al., 2009). Además de esto, existen estudios que sugieren que la activación del RE β es importante en el desarrollo de estas neoplasias, sin embargo, aun se desconoce el mecanismo por el cual actúa (Zannoni et al., 2016; Belcher et al., 2009).

La activación del RE β se lleva a cabo por diversos mecanismos, entre los cuales figura la fosforilación por cinasas. Por medio de estudios *in silico* fue posible identificar que el RE β puede ser fosforilado por PKC α . Mediante inmunofluorescencia se observó que la activación de PKC α provoca que esta proteína se transloque al núcleo celular, en donde se localiza el RE β y, muy probablemente, su interacción. Además de esto, ensayos de inmunoprecipitación y western blot realizados previamente en nuestro grupo de trabajo mostraron que en la línea celular DAOY el RE β y PKC α interactúan de manera basal, mientras que la activación de PKCs provoca aumento significativo en esta interacción a 5 minutos de tratamiento, así como en el contenido del RE β fosforilado desde 5 y hasta 30 minutos de tratamiento. En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de PKC α potencia su interacción con el RE β y participa en la fosforilación de este, por lo que es probable que regule la actividad del receptor mediante esta modificación postraduccional.

Con la finalidad de estudiar la participación del RE β en la proliferación de la línea celular DAOY, los cultivos celulares se estimularon con el agonista selectivo del RE β , lo que aumentó significativamente la proliferación celular después de 72 horas de tratamiento respecto al vehículo, así como el número de células BrdU positivas, efecto que fue bloqueado por el antagonista del RE β ,

PHTPP 10 nM. De manera interesante, se observó que la activación del RE β con su agonista durante 72 horas aumentó significativamente el contenido de este receptor. Los resultados indican que la activación del RE β promueve la proliferación celular y además retroalimenta positivamente su expresión en la línea celular DAOY. Estos resultados son relevantes debido a que esclarecen las controversias reportadas con anterioridad, ya que Belcher y colaboradores reportaron que el tratamiento con E2 y DPN promovió la proliferación de líneas celulares de meduloblastoma (Belcher et al. 2009), mientras que el grupo de investigación de Gallo reportó que este tratamiento no causó diferencias significativas (Ciucci et al 2014). Aunque en el grupo de Belcher no se indica la cantidad de células sino la concentración celular de la suspensión utilizada, suponiendo que una placa del cultivo de 60 mm puede contener como máximo 5 mL y sabiendo que la suspensión celular tenía una concentración de 3000 células/mL, este grupo de trabajo colocó como máximo 15 000 células/pozo. Por otro lado, el grupo de Gallo utilizó 100 000 células D283-Med y 80 000 células DAOY en placas más pequeñas; para un cultivo celular de células DAOY y analizado a 96 horas esta cantidad de células es muy grande, ya que en nuestro laboratorio hemos observado que cuando se coloca gran cantidad de células rápidamente se alcanza la máxima confluencia, con lo que se observa la inhibición de la proliferación.

Otro tipo de cáncer en el cual el RE β media la proliferación celular en respuesta a E2 es el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Tang et al., 2012), en donde al igual que en los meduloblastomas el RE β es predominante sobre el RE α , ya que en estas neoplasias el RE α no se expresa. Además, en líneas celulares de cáncer de pulmón se observó que la activación del RE β con E2 aumentó el contenido de este (Fan et al., 2017) de manera similar a lo encontrado en nuestros resultados. Estas observaciones sugieren que la participación de cada isotipo de los RE en la promoción tumoral está determinada por el cociente de expresión de los mismos en el tumor en cuestión, pues en cáncer de mama se ha visto que el RE α se encuentra expresado en niveles mayores respecto a la expresión del RE β ; en este caso el RE α induce la proliferación celular, mientras que el RE β posee roles antiproliferativos.

El mecanismo por el cual el RE β regula su expresión positivamente no ha sido reportada, sin embargo, utilizando las bases de datos EPD: eukaryotic promoter database (epd.vital-it.ch/search_EPDnew.php), Jaspar (jaspar.genereg.net) y Algen-promo (alggen.lsi.upc.es) encontramos que el promotor de este receptor posee posibles secuencias correspondientes a elementos de respuesta estrógenos (ERE). Se encontraron 6 probables ERE utilizando el primer software con una $p < 0.01$, utilizando Jaspar se encontraron 7, con una probabilidad del 80% y, utilizando Algen-promo, se encontró 1 probable ERE con una probabilidad del 85%, por lo que es

posible que el RE β regule su expresión mediante este mecanismo. Esta forma de regulación ha sido ampliamente documentada en el RE α , que regula su expresión en diferentes tipos celulares debido a que en su secuencia promotora existen por lo menos 2 ERE (Malikov y Madeira, 2012). Otra forma por la cual el RE β podría regular su expresión es a través de la interacción con factores de transcripción, ya que se sabe que el RE β puede regular la transcripción de genes que no albergan ERE a través de este mecanismo (Ascenzi et al., 2006; Shupnik et al., 2004). Utilizando los softwares mencionados anteriormente, se encontraron sitios de unión a SP1 y Jun/Fos en el promotor del RE β , lo que hace factible este mecanismo. De igual forma, existen factores de transcripción que albergan ERE en sus promotores que además pueden regular directamente la transcripción del RE β , pues este contiene motivos de unión a dichos factores, como es el caso de los ya mencionado Jun/Fos y SP1, así como Gli1 (Medwid, 2018), lo cual fue analizado con los softwares mencionados anteriormente.

En las biopsias de meduloblastoma analizadas mediante inmunofluorescencia se encontró que el contenido del RE β es mayor respecto a las muestras de cerebelo sano en la mayoría de las muestras evaluadas, tanto del grupo desmoplásico como del grupo clásico, aunque únicamente este último grupo presentó contenido significativamente mayor respecto a las muestras de cerebelo sano, lo cual sugiere que el RE β podría estar implicado en la promoción de la proliferación celular de los meduloblastomas clásicos. Ya que el número de muestras analizadas es pequeño, aumentar este número podría definir con claridad si existen diferencias entre los meduloblastomas desmoplásicos y clásicos.

Posteriormente, para estudiar el papel que desempeñan las PKCs en la proliferación de la línea celular DAOY, los cultivos fueron tratados con el activador de PKCs clásicas y nuevas, TPA. Se ha reportado ampliamente que la activación de PKC α promueve la proliferación celular en diversos tipos de tumores (Do Cramo et al., 2013), por lo que se esperaba incremento en la proliferación tras la estimulación, sin embargo, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con TPA provocó una disminución en la proliferación celular después de 72 horas, así como en el número de células BrdU positivas, efecto que se observó potenciado por el uso del antagonista selectivo del RE β , PHTPP a 48 horas. Una explicación posible para el proceso observado es que la fosforilación del RE β por PKC α disminuye la activación del primero, lo cual se refleja en la disminución de la proliferación. Este mecanismo ha sido reportado en el receptor X hepático alfa, en donde la activación de PKCs induce la fosforilación y disminución en la transactivación del mismo (Delvecchio y Capone, 2008).

Para estudiar la participación de la PKC α en la disminución de la proliferación provocada por la activación de las PKCs clásicas y nuevas, se utilizó el inhibidor de esta cinasa, Gö 6976. De manera interesante, se observó que todos los tratamientos que incluían este compuesto bloquearon la proliferación celular a todos los tiempos evaluados. El Gö 6976 es capaz de inhibir a otras cinasas y vías de señalización además de la PKC α ; entre estas han sido reportadas las vías asociadas a las cinasas relacionadas con tropomiosina (Trk) A y B, así como las cinasas de Janus (JAK) 2 y 3, las cinasas de control (CHK) 1 y 2 y la proteína cinasa S6 ribosomal A3 (RPS6KA3), las cuales son importantes en la regulación de la proliferación. Debido a los resultados observados, es posible que el tratamiento con Gö 6976 actúe sobre múltiples blancos que, de manera global, bloquean la proliferación de las células DAOY, por lo que no fue posible estudiar la contribución de la PKC α en este proceso celular mediante estos ensayos. Para esto, se pueden utilizar concentraciones más bajas del compuesto a fin de reducir la inhibición de otras cinasas que no son de interés, además, es posible realizar ensayos de silenciamiento de la PKC α .

A pesar de que se encuentra reportado que la línea celular DAOY expresa únicamente PKC α , PKC ζ y ARNm de PKC β II (Adesina et al., 1998) experimentos de WB permitieron identificar que también expresa PKC δ , por lo que se decidió estudiar si esta cinasa contribuía a la disminución en la proliferación celular provocada por la activación de PKCs con TPA en estas células. Se ha reportado que esta cinasa causa defectos en la proliferación e induce arresto en la fase G1 en células de adenocarcinoma de pulmón (Do Carmo et al., 2013), por lo tanto, se decidió estudiar si mediante estos mecanismos la PKC δ podría participar en los efectos provocados por el TPA. Para este fin se utilizó el inhibidor del PKC δ , rottlerina, y se evaluó la proliferación celular mediante los métodos de exclusión con azul de tripano y de incorporación de BrdU. Al igual que lo observado en el tratamiento con el inhibidor de PKC α , la inhibición de PKC δ bloqueó la proliferación celular desde las 24 y hasta las 72 horas de tratamiento. Se ha reportado que la rottlerina es capaz de inhibir a otras cinasas con igual potencia que a la PKC δ , tales como la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII) y la proteína cinasa 2 activada por la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKAP-A2), lo cual podría explicar el bloqueo que causa en la proliferación de las células DAOY. Debido a este comportamiento, el uso de rottlerina 1 μ M no permitió evaluar la participación de la PKC δ , por lo que se hace necesario el uso de un sistema específico para PKC δ , que podría ser el silenciamiento de esta.

Para estudiar la posible interacción entre el RE β y la PKC δ , mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunoprecipitación fue posible observar que la PKC δ se transloca al núcleo e incrementa su asociación con el RE β tras la estimulación con TPA. A partir de ensayos *in silico* se

identificaron 4 residuos que pueden ser fosforilados tanto por PKC α como por PKC δ , por lo que es altamente probable que el RE β sea fosforilado y regulado por ambas cinasas.

En cuanto a la expresión de PKC α y PKC δ en biopsias de meduloblastoma, se observó que no existe un patrón de expresión en los grupos histológicos clásico y desmoplásico, ni diferencia significativa entre ellos. Ya que la mayoría de las biopsias de ambos grupos histológicos presentaron niveles de fluorescencia similares a los observados en el cerebelo sano, es posible que el aumento de estas proteínas dependa de otros factores como las modificaciones genéticas presentadas en cada paciente, además, es necesario incrementar el número de muestras analizadas.

Adicionalmente, se encontró que en muestras de meduloblastoma, cuyas características se encuentran en bases de datos, no existe correlación de Spearman entre la expresión del gen del RE β (ESR2) y el de la PKC α (PRKCA), ni entre ESR2 y el gen de la PKC δ (PRKCD). Utilizando los datos de fluorescencia obtenidos de las muestras de meduloblastoma y tejido sano se realizaron correlaciones de Spearman y se encontró que no existen correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido del RE β y el de las PKC α y δ , ni en cerebelo sano ni en los grupos de meduloblastoma evaluados. A pesar de que no existe relación en el contenido de las proteínas estudiadas, no se puede descartar la regulación de las PKCs sobre el RE β , determinada por el estado de activación de las mismas.

De manera general, los resultados obtenidos sugieren que el RE β participa en la promoción de la proliferación celular de la línea celular DAOY y de los meduloblastomas clásicos, y que la activación de las PKCs clásicas y nuevas disminuye la proliferación de la línea celular mediante un mecanismo que involucra al RE β . Con estos resultados, así como con los antecedentes realizados en nuestro grupo de trabajo, se sugiere que el RE β es fosforilado por PKC α , y probablemente por PKC δ , lo que induce un cambio conformacional en el receptor que le impide activarse, reduciendo su actividad transcripcional y, consecuentemente, reduciendo la proliferación celular (Fig. 24).

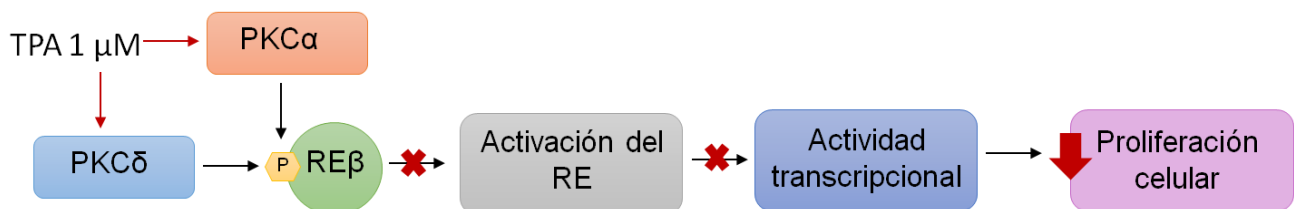


Figura 24. Mecanismo por el cual PKC α y PKC δ median la disminución en la proliferación de la línea celular DAOY.

14. CONCLUSIONES

La activación del RE β con DPN 1 nM promueve la proliferación en la línea celular DAOY.

Los meduloblastomas clásicos presentan un contenido mayor de RE β respecto a las biopsias de cerebelo sano.

La activación de PKC α y δ con TPA 1 μ M incrementa la interacción de estas con el RE β en células DAOY.

La activación de PKCs con TPA 1 μ M provoca una disminución significativa en la proliferación de la línea celular DAOY.

El tratamiento de la línea celular DAOY con Gö 6976 1 μ M y rotlerina 1 μ M bloquea la proliferación celular.

La sobreexpresión de PKC α y δ en muestras de meduloblastoma desmoplásico y clásico fue poco frecuente en las muestras evaluadas.

15. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto del Gö 6976 y de la rotlerina a concentraciones nanomolares sobre la proliferación de la línea celular DAOY.

Estudiar el efecto del silenciamiento de PKC α y δ en la proliferación de la línea celular mencionada.

Evaluar el contenido del RE β , PKC α y δ en un número mayor de muestras provenientes de pacientes con meduloblastoma.

16. REFERENCIAS

- Adesina A., et al. (1998) Differential role for protein kinase C-mediated signaling in the proliferation of medulloblastoma cell lines. *International Journal of Oncology* 12 (4): 759-768.
- Arora A. y Scholar E. (2005) Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (3) :971-979.
- Ascenzi P., Bocedi A., Marino M. (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine* 27(4): 299-402
- Azzarelli R., et al. (2018) The developmental origin of brain tumours: a cellular and molecular framework. *Development* 145 (10). doi: 10.1242/dev.162693.
- Backes F., et al. (2016) Estrogen receptor- α as a predictive biomarker in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 141 (2): 312–317.
- Barletta F., et al. (2004) Characterization of the Interactions of Estrogen Receptor and MNAR in the Activation of cSrc. *Molecular Endocrinology* 18 (5): 1096-1108
- Belcher S. (2009) Rapid Signaling Mechanisms of Estrogens in the Developing Cerebellum. *Brain Research Reviews* 57 (2): 481–492.
- Belcher, S., et al. (2009) Blockade of Estrogen Receptor Signaling Inhibits Growth and Migration of Medulloblastoma. *Endocrinology* 150 (3): 1112–1121.
- Behrens M. et al. (1999) Go 6976 is a potent inhibitor of neurotrophin-receptor intrinsic tyrosine kinase. *Journal of Biochemistry* 73 (3): 919-924
- Bihannic L., et al. (2015) Insights into cerebellar development and and medulloblastoma. *Bulletin du Cancer* 103 (1): 30-40.
- Bloom N., et al. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* 294 (5):1351–1362.
- Bothelo M., et al. (2015) The Role of estrogens and estrogen receptor signaling pathways in cancer and infertility: the case of schistosomes. *CellPress* 31 (6): 246251.
- Brandes A., et al. (2009) Adult neuroectodermal tumors of posterior fossa (medulloblastoma) and of supratentorial sites (stPNET). *Oncology Hematology* 71 (2): 165-179.
- Brandes A., et al. (2014) New perspectives in the treatment of adult medulloblastoma in the era of molecular oncology. *Oncology Hematology* 94 (3): 348-359.

Castagna M. et al. (1982) Direct Activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by Tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry* 257(13): 7847-7851

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

Cavalli F., et al (2017). Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell* 31(6): 737-754.

Chakkat et al., (2015) Alkylation and Carbamylation Effects of Lomustine and Its Major Metabolites and MGMT Expression in Canine Cells. *Veterinary Sciences* 2(2): 52-58.

Chan K., et al. (2017) Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC Cancer* 17(1): doi: 10.1186/s12885-017-3601-1.

Cheskis B., et al. (2008) MNAR plays an important role in ER α activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids* 73 (9-10): 901-905.

Ciucci A., et al. (2014) Gender effects in experimental models of human medulloblastoma: Does Estrogen Receptor β Signalling Play a Role? *Plos One* 9(7): 1-12.

Cookman C. y Belcher S., (2015) Estrogen Receptor- β Up-Regulates IGF1R Expression and Activity to Inhibit Apoptosis and Increase Growth of Medulloblastoma. *Endocrinology* 156(7): 2395–2408.

Craig J. y Timm S. (2004) The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50 (1): 3-22.

Davies S. et al. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemistry Journal* 351: 95-105

De Braganca C y Millard N. (2015) Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology* 31(12): 1341-1353.

Del Valle L., et al., (2002) Insulin-like Growth Factor I Receptor Activity in Human medulloblastoma. *Clinical Cancer Research* 8(6): 1822-30.

Delvecchio CJ y Capone JP (2008) Protein kinase C α modulates liver X receptor α transactivation. *Journal of Endocrinology* 197(1): 121-30.

Dennis R., et al. (2004) Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Estrogen Receptor Ligands Possessing Estrogen Receptor α Antagonist Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 47(24): 5873-5893

- Dey P., et al. (2012) Estrogen receptors beta1 and beta2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cell line PC3. *Molecular Endocrinology* 26 (12): 1991–2003.
- Djuzenova C., et al., (2016) Dual PI3K- and mTOR-inhibitor PI-103 can either enhance or reduce the radiosensitizing effect of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in tumor cells: The role of drug-irradiation schedule. *Oncotarget* 7(25): 38191–38209
- Do Carmo A., et al. (2013) PKC signalling in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy* 14(4): 287-294.
- Ellison D. (2010) Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathologica* 120 (3): 305-316.
- Ellison D., et al. (2011) Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathologica* 121 (3):381–96.
- Fan S. et al., (2017) Estrogen promotes tumor metastasis via estrogen receptor beta-mediated regulation of matrix-metalloproteinase-2 in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 8 (34): 56443-56459.
- Fujimura T., et al. (2018) Estrogen and Androgen Blockade for Advanced Prostate Cancer in the Era of Precision Medicine. *Cancers* 10(2): doi:10.3390/cancers10020029
- Gerber N., et al. (2013) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treatment Review* 40(3): 356-365.
- Giagaspero F., et al. (1999) Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *Journal of Neurosurgery* 91(6): 971-7.
- González-Arenas A., et al. (2015) PKC α and PKC δ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology* 156(3): 1010-1022.
- Grandage V. et al. (2006) Go6976 is a potent inhibitor of JAK2 and FLT3 tyrosine kinases with significant activity in primary acute myeloid leukaemia cells. *British Journal of Haematology* 135 (3): 303-316.
- Griner y Kazanietz, (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Review Cancer* 7(4): 281-194.
- Gupta T., et al., (2017) Indian Society of Neuro-Oncology consensus guidelines for the contemporary management of medulloblastoma. *Neurology India* 65(2): 315-332

- Gschwendt M. et al. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 93–98
- Hall J. y McDonnell D. (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ER beta) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140(12):5566–78.
- Hamilton-Burke W., et al. (2010) Phosphorylation of estrogen receptor beta at serine 105 is associated with good prognosis in breast cancer. *The American Journal of Pathology* 177(3): 1079-86.
- Hartmann W., et al., (2005) Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *American Journal of Pathology* 166(4): 1153-62.
- Hsu L. et al., (2017) Estrogen, estrogen receptor and lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1713- 1721.
- Hu J., et al. (2010) Activation of PKC- α is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 70 (3):239-245.
- Huang H., et al. (2005) KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research* 1 (33): 226–229.
- Jakab R., et al., (2001) Estrogen receptor beta immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum. *Journal of Comparative Neurology* 430: 396–409.
- Jia M., et al., (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29(4): 557-568.
- Kang J., Toita R., Kin C., et al. (2012) Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnology Advances* 30: 1662-1672
- Kieran M., et al., (2010) Brain tumors: from childhood through adolescence into adulthood. *Journal of Clinical Oncology* 28 (32): 4783–4789.
- Kijima N. y Kanemura Y. (2016) Molecular classification of medulloblastoma. *Neurol Med Chir* 56(11):687-697.
- Klinge C. (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65 (5):227-251

- Koide A., et al. (2006) Identification of Regions within the F Domain of the Human Estrogen Receptor α that Are Important for Modulating Transactivation and Protein-Protein Interactions. *Molecular Endocrinology* 21(4): 829-842.
- Kool M., et al. (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, group 3, and group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathologica* 123 (4): 473-484.
- Kuiper G., (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS* 93 (12): 5925–3590.
- Kuiper G., et al. (1997) Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology* 138 (3): 863-870.
- Kushner P., et al. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74 (5): 311-317.
- Lam S., (2016) Modern management of medulloblastoma: Molecular classification, outcomes, and the role of surgery. *Surgical Neurology International* 7(44): 1135-1141.
- Lam, H., et al (2012). Phosphorylation of human estrogen receptor-beta at serine 105 inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Molecular and Cellular Endocrinology* 358(1): 27–35.
- Leung Y., et al. (2006) Estrogen Receptor (ER)- β isoforms: A key to understanding ER- β signaling. *PNAS* 103 (35): 13162-13167
- Lewandowsky S., et al (2002) Estrogen receptor β ; potential function significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS letter* 524: 1-5
- Li K., et al. (2013) Signaling pathway and molecular subgroups of medulloblastoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6(7): 1211-1222.
- Lin, C., et al. (2016) Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature* 530 (7588): 57–62.
- Louis D., et al. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114 (2): 97-109.
- Malikov V y Madeira M., (2013) Regulation of ER α protein expression by 17 β -estradiol in cultured neurons of hypothalamic ventromedial nucleus. *Neurochemical Research* 38(1): 82-89.
- Mancuso M. et al. (2010) Protective role of 17 β -estradiol on medulloblastoma development in Patched 1 heterozygous mice. *International Journal of Cancer*, 127 (12): 2749-2757

- Marquina-Sánchez B., et al. (2017) The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells. *The Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 172: 198-206.
- Martínez L. (2011) Meduloblastoma pediátrico, revisión y puesta al día. *Radiología* 53(2): 134-145.
- Martiny-Baron et al. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *Journal of Biological Chemistry* 268 (13): 9194-9197
- Martiny G. y Fabbro D. (2007) Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacological Research* 55(6): 477-86.
- McKenna N., et al. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrinology Reviews* 20 (3): 321-44.
- Medwid S., et al. (2018) Bisphenol A stimulates adrenal cortical cell proliferation via ER β -mediated activation of the sonic hedgehog signalling pathway. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 178: 254-262.
- Meyer MJ., et al. (2001) Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 44(24): 4230-4251
- Migliaccio A., et al. (1999) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO Journal* 15(6): 1292-1300
- Mishra S., et al. (2015) Estrogen and estrogen receptor alpha promotes malignancy and osteoblastic tumorigenesis in prostate cancer. *Oncotarget* 6(27): 44388-44402.
- Mukherjee T., et al. (2010) Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800 (10): 1127-1135.
- Newton A., et al., (2016) Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling. *Clinical Science* 130(17): 1499-1510.
- Northcott P., et al. (2012) Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nature Reviews Cancer* 12(12):818-34.
- Ogawa S., et al. (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243(1): 122-126.

Paech K., et al. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP-1 sites. *Science* 277 (5331): 1508-1510.

Perreault S., et al. (2014) MRI surrogates for molecular subgroups of medulloblastoma. *American Journal of Neuroradiology* 35 (7):1263-1269.

Pinceti E., et al. (2015). Phosphorylation alters Oestrogen Receptor β -mediated transcription in neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(12): 861–871.

Remke M., et al. (2011) Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *Journal of Clinical Oncology* 29(19): 2717–2723.

Rennecke J. et al. (1996) Immunological demonstration of protein kinase C μ in murine tissues and various cell lines. *European Journal of Biochemistry* 242 (2): 428-432

Rivera-Luna, et al., (2007) Medulloblastoma en pediatría. Diagnóstico y tratamiento en la actualidad. *Gaceta Médica de México* 143(5): 415-420.

Rouzbeh y Hartmann, (2017) The new WHO 2016 classification of brain tumors-what neurosurgeons need to know. *Acta Neurochirurgica* 159(3): 403–418.

Rutkowsky S., et al. (2005) Treatment of Early Childhood Medulloblastoma by Postoperative Chemotherapy Alone. *The New England Journal of Medicine* 352(10): 978-986.

Skrzypczak M., et al. (2013) Nuclear Estrogen Receptors Co-activation Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry* 20 (27): 3317-3338.

Sánchez M., et al. (2010) Challenging estrogen receptor β with Phosphorylation. *Trends Endocrinology Metabolism* 21(2): 104-110.

Shupnik M. (2004) Crosstalk between steroid receptor and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogen* 23(48): 7979-7989.

Silverman J. y Deitcher S., (2013) Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71(3): 555–564.

Smoll N. y Drummond K. (2012) The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. *Journal of Clinical Neuroscience* 19 (11): 1541-1544.

Singh R., et al., (2017) Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses. *Biomolecular Concepts* 8(3-4): 143-153.

- Steinberg S. (2008) Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews* 88(4): 1341-1378.
- Stolz A. et al. (2009) Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Research* 69(9): 3874-3883
- Svalina, M., et al., (2016) IGF1R as a Key Target in High Risk, Metastatic Medulloblastoma. *Scientific Reports*, 6 (27012). <http://doi.org/10.1038/srep27012>
- Tang H., et al., (2012) Estrogen upregulates the IGF-1 signaling pathway in lung cancer through estrogen receptor- β . *Medical Oncology* 29(4): 2640-2648.
- Tarafdar A. y Michie A., (2014) Protein kinase C in cellular transformation: a valid target for therapy? *Biochemical Society Transactions* 42(6): 1556-1562.
- Taylor M., et al., (2014) Cytogenetic Prognostication within Medulloblastoma Subgroups. *Journal of Clinical Oncology* 32(9): 886-896.
- Thomas et al., (2015) Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PLoS One* 10(7) e0130078. doi: 10.1371/journal.pone.0130078.
- Tuorkey MJ (2015) Cancer therapy with phytochemicals: present and future perspectives. *Biomed Environ Sci* 28 (11): 808-819
- Urbanska K., Pannizzo P., Lassak A., et al. (2009) Estrogen receptor beta-mediated nuclear interaction between IRS-1 and Rad51 inhibits homologous recombination directed DNA repair in medulloblastoma. *Journal of Cellular Physiology* 219: 392–401
- Wang y Wechsler-Reya (2014), The role of stem cells and progenitors in the genesis of medulloblastoma. *Experimental Neurology* 260: 69-73.
- Wik E., et al. (2013) Lack of estrogen receptor- α is associated with epithelial mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clinical Cancer Research* 19(5):1094-105.
- Wang Y., et al (2016) Sequential posttranslational modifications regulate PKC degradation. *Molecular Biology of the cell* 27(2): 410-420.
- Wong J., et al., (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell Death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated. *Journal of Neuroscience* 23(12): 4984-95.

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

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

Yasar P., et al. (2016) Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology* 16(1):4-20.

Zannoni F., et al. (2016) Sexual dimorphism in medulloblastoma features. *Histopathology* 68(4): 541-548.

Zhou H., et al. (2011) The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-ADW742 sensitizes medulloblastoma to the effects of chemotherapy. *Oncology Reports* 25(6):1565–1571.