



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DEL RECEPTOR A
PROGESTERONA Y DE LA PROTEÍNA CINASA C ALFA CON EL GRADO DE
MALIGNIDAD DE ASTROCITOMAS HUMANOS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB. DENISSE ITZEL ARCOS MONTOYA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ALIESHA A. GONZÁLEZ ARENAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Greco Hernández Ramírez
Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México. Septiembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1 Tumores cerebrales	8
2.1.1 Astrocitomas	8
a. Astrocitoma Pilocítico (Grado I)	8
b. Astrocitoma Subependimario de Célula Gigantes (Grado I)	9
c. Xantastrocitoma Pleomórfico (Grado II)	9
d. Astrocitoma Difuso (Grado II)	9
e. Astrocitoma Anaplásico (Grado III)	9
f. Glioblastoma (Grado IV)	10
- Histología e inmunohistoquímica	10
- Clasificación molecular	11
- Tratamiento	14
2.2 Receptores nucleares a progesterona	15
- Isoformas del RP nuclear	16
- Regulación de la actividad del RP	17
2.3 Proteína Kinasa C	18
- PKC α	20
2.4 RP y tumores astrocíticos	21
2.5 PKC α y gliomas	22
3. Justificación	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivo general	24
6. Objetivos específicos	24
7. Metodología	25
8. Resultados	27
9. Discusión	42
10. Conclusiones	45
11. Referencias	46

Índice de Figuras

Fig. 1	Clasificación molecular de los GBMs	13
Fig. 2	Receptor a progesterona (RP)	16
Fig. 3	Sitios de fosforilación del RP	18
Fig. 4	Estructura e isotipos de PKC	19
Fig. 5	La presencia de RP y PKC α aumenta con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos	29
Fig. 6	El % de células positivas para RP, PKC α y la colocalización de ambas aumenta con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos	30-31
Fig. 7	El % de células positivas para RP, PKC α y su colocalización no presenta diferencia significativa entre sexos	33-34
Fig. 8	Existe correlación positiva entre el % de células positivas para RP y su colocalización con PKC α con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos	34-35
Fig. 9	No existe correlación entre el % de células positivas para RP, PKC α y su colocalización con respecto a la edad del paciente en muestras de astrocitomas humanos	36-37
Fig. 10	La presencia de la fosforilación en la Ser400 del RP, PKC α y su colocalización aumenta con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos	37
Fig. 11	El % de células positivas para el RP pSer400 es mayor en astrocitomas de grado IV con respecto a tejido no tumoral	38
Fig. 12	La cantidad de mRNA para <i>PGR</i> y <i>PRKCA</i> es menor en astrocitomas de grado I-IV con respecto a tejido no tumoral	39-40
Fig. 13	No existen diferencias a nivel de mRNA para los genes <i>PGR</i> y <i>PRKCA</i> entre sexos en astrocitomas de grados I-IV	41

Índice de Tablas

Tabla 1	Terapias adyuvantes utilizadas actualmente para el tratamiento de glioblastoma	14
Tabla 2	Tratamientos en prueba (fase III)	15
Tabla 3	Efecto de los isotipos de PKC sobre células derivadas de tumores astrocíticos	22
Tabla 4	Características clínico-patológicas de las muestras obtenidas en las bases de datos TCGA y GTEX	27
Tabla 5	Características clínico-patológicas de las muestras de pacientes con astrocitomas	27-28
Tabla 6	Contenido de RP y PKC α analizado mediante intensidad de fluorescencia	30-31

Abreviaturas

AF	<i>Activation Function</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Apaf-1	<i>Apoptosis Protease-Activating Factor-1</i>
ASCL1	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
Bax	<i>BCL2-Associated X protein</i>
Bcl2	<i>B Cell Lymphoma 2</i>
BUS	<i>B-upstream domain</i>
CDK2	<i>Cyclin-Dependent Kinase 2</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
CHI3L1	<i>Chitinase-3-like protein 1 precursor</i>
CK2	<i>Casein Kinase 2</i>
c-KIT	<i>Kit proto-oncogene, Receptor Tyrosine Kinase</i>
DAG	<i>Diglyceride or Diacylglycerol</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DE	<i>Desviación Estándar</i>
DEX	<i>Dexametasona</i>
DLL3	<i>Delta-Like protein 3</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ED	<i>Edad</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGFRvIII	<i>Epidermal Growth Factor Receptor variant III</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
GABRA1	<i>Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha 1 Subunit</i>
GAS1	<i>Growth Arrest Specific 1</i>
GBM	<i>Glioblastoma Multiforme</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GH	<i>Grado Histológico</i>

GI, GII	Astrocitoma grado 1 y 2
GIII	Astrocitoma grado 3
GIV	Astrocitoma grado 4 o glioblastoma
GLI2	<i>Zing finger protein</i>
GSK-3β	<i>Glycogen Synthase Kinase-3 beta</i>
GTEX	<i>The Genotype-Tissue Expression</i>
HBD	<i>Hormone Binding Domain</i>
Hsp90	<i>90 kDa Heat Shock Protein</i>
IDH	<i>Isocitrate Dehydrogenase</i>
IGFBP-3	<i>Insuline-Like Growth Factor Binding Protein 3 Precursor</i>
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LFNG	<i>O-Fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MET	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR)</i>
MGMT	<i>O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase</i>
MKP-1	Protein-Tyrosine-Phosphatase
MMP-2	<i>Matrix Metalloprotease-2</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NEFL	<i>Neurofilament Light</i>
NES	<i>Nestin gene</i>
NF1	<i>Neurofibromin 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of activated B cells</i>
NKX2-2	<i>NK2 Homeobox 2</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NOTCH	<i>Neurogenic Locus Notch Homolog Protein</i>
NRM	Número de Referencia Médica
NT	No tumoral
OLIG2	<i>Oligodendrocyte Linage Transcription Factor 2</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
Par6	<i>Partitioning-defective protein 6</i>

PDGFRA	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>
PDGFR-β	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta</i>
PGR	<i>Progesterone Receptor gene</i>
PIBF	<i>Progesterone Induced Blocking Factor</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PKCα	<i>Proteína Cinasa C alfa</i>
PLCγ	<i>Phospholipase C gamma</i>
PRE	<i>Progesterone Response Elements</i>
PRKCA	<i>Protein Kinase C alpha gene</i>
Raf-1	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RELB	<i>RELB proto-oncogene</i>
RET	<i>Rearranged during Transfection</i>
RP	<i>Receptor a Progesterona</i>
S100	<i>Calcium-binding protein</i>
SLC12A5	<i>Solute Carrier Family 12 Member 5</i>
SMO	<i>Smoothened Frizzled Class Receptor</i>
SMRT	<i>Silencing-Mediator for Retinoid/Thyroid hormone receptors</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso Central</i>
SRC-1	<i>Steroid Receptor Coactivator 1</i>
SYT1	<i>Synaptotagmin-1</i>
TCF4	<i>Transcription Factor 4</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TIE-2	<i>Tyrosine-protein Kinase Receptor 2</i>
TNFRSF1A	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 1A</i>
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>
TPA	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TRADD	<i>TNFR1-Associated death domain protein</i>
TTF	<i>Tumor Treating Fields</i>
VEGF	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endotelial Growth Factor Receptor</i>

Estudio de la relación entre la detección del receptor a progesterona y de la proteína cinasa C alfa con el grado de malignidad de astrocitomas humanos.

1. Introducción

Los astrocitomas son los tumores cerebrales primarios más comunes, representan el 76% de todos los gliomas [1]. Pueden desarrollarse en cualquier parte del encéfalo, sin embargo, se encuentran con mayor frecuencia en la corteza cerebral [2]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a estos tumores en cuatro grupos con base al grado de malignidad, siendo el Grado I el menos agresivo y el Grado IV o glioblastoma el de mayor agresividad [3].

El glioblastoma o “Glioblastoma Multiforme” (GBM), es el tumor cerebral maligno primario más frecuente, representa el 70-75% de los tumores astrocíticos con una incidencia de 4.37 casos nuevos por cada 100 mil personas al año [1][4]. El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) reporta que en México, el 9% de todos los tumores cerebrales tratados son de tipo GBM [5], [6].

El receptor a progesterona (RP) es un factor de transcripción que puede ser activado por ligando o por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación [8], [9]. Anteriormente, nuestro grupo de trabajo demostró que la activación de la proteína cinasa C alfa (PKC α) induce la fosforilación del RP en el sitio Ser400 y ésta modificación del receptor aumenta su actividad transcripcional lo que genera un incremento en la proliferación, migración e invasividad de células derivadas de glioblastomas humanos [7], [10], también se evaluó la activación del RP por unión con su ligando, lo que conllevó al crecimiento e infiltración de astrocitomas grado III, parámetros que disminuyeron después del tratamiento con un antagonista de este receptor [7].

En el presente trabajo, se analizaron 46 biopsias provenientes de pacientes con diagnóstico de astrocitomas (9 de grado I y II, 12 de grado III y 25 grado IV); estas biopsias, presentaron una correlación positiva entre el grado de malignidad y la detección del RP total y fosforilado, de PKC α , así como de la colocalización. Se realizó también, un análisis *in silico* en la plataforma Xenabrowser utilizando las bases de datos TCGA y GTEX se encontró, interesantemente, que la cantidad de mRNA del RP y PKC α es inversamente proporcional al grado tumoral, resultado contrario a lo observado a nivel de la proteína.

2. Antecedentes

2.1 Tumores Cerebrales

Los tumores cerebrales son patologías generadas a partir de alteraciones moleculares en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular [11]. Presentan un índice de mortalidad y una tasa de recurrencia muy altos aún después del tratamiento. Se denominan tumores cerebrales primarios aquellos que tienen como origen el Sistema Nervioso Central (SNC) y tumores secundarios aquellos que se originan fuera y llegan a este gracias al proceso de migración [11]. La incidencia anual-global de los tumores cerebrales primarios es de aproximadamente 3.7 por cada 100 mil hombres, mientras que en el caso de las mujeres, se estima alrededor de 2.6 por cada 100 mil [12].

Los gliomas son neoplasias de tipo primario, se desarrollan en el cerebro o en la médula espinal a partir de células troncales o células gliales. Estos representan alrededor del 26% de todos los tumores cerebrales y el 81% de los malignos [13]. Con base en sus características histológicas y moleculares, los gliomas pueden clasificarse en: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas [14].

2.1.1 Astrocitomas

Los astrocitomas son los tumores cerebrales malignos primarios más comunes, representan el 76% de todos los gliomas [13] y se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, presentándose con mayor frecuencia en adultos entre los 40 y 60 años de edad, siendo más comunes en hombres que en mujeres (3:2) [2]. La OMS (Organización Mundial de la Salud) propuso una escala de clasificación con base al grado de malignidad, siendo el Grado I el menos agresivo y el Grado IV o Glioblastoma el de mayor agresividad [3].

a. Astrocitoma Pilocítico (Grado I)

Los astrocitomas pilocíticos representan aproximadamente del 5-6% de todos los gliomas, con una incidencia anual de 0.37 casos por cada 100 mil personas [15]. Se desarrolla principalmente en adultos jóvenes y niños. Este tipo de astrocitoma se presenta con bordes bien definidos, es de crecimiento lento y no infiltrante. Histopatológicamente se puede identificar mediante la tinción de hematoxilina-eosina ya que se presentan asociados a fibras de Rosenthal (haces eosinofílicos gruesos y alargados en forma de espiral) como consecuencia de la gliosis de larga evolución, se caracterizan por tener un patrón de tejido

bifásico (agregados de astrocitos bipolares alargados) y laxo (astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos) [3].

b. Astrocitoma Subependimario de Células Gigantes (Grado I)

Este tipo de tumor es benigno y de crecimiento lento que por lo general surge en la pared de los ventrículos laterales, se compone por grandes astrocitos ganglioides [3]. Ocurre en aproximadamente 1 de cada 5 mil – 10 mil nacimientos y su aparición es típica en la primera o segunda década de la vida [16]. Es la neoplasia del SNC más frecuente en enfermos con esclerosis tuberosa (enfermedad de Bourneville). El patrón característico va desde células poligonales con citoplasma abundante y esmerilado, hasta células más pequeñas, elongadas con el seno de una matriz fibrilar variable. Hay considerable pleomorfismo nuclear y son frecuentes las células multinucleadas [17].

c. Xantastrocitoma Pleomórfico (Grado II)

Representa menos del 1% de todas las neoplasias astrocíticas. Este tipo de astrocitoma es de favorable prognosis, se encuentra típicamente en niños y adultos jóvenes, son localizados en las meninges. Las características histológicas incluyen; células pleomórficas y lipidizadas, expresión de proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y en ocasiones rodeada de una red de reticulina, así como de cuerpos eosinófilos granulares [3].

d. Astrocitoma Difuso (Grado II)

Comprende del 10% al 15% de todos los tumores cerebrales astrocíticos con una incidencia aproximada de 1.4 casos por cada millón de personas al año. Regularmente afecta a los adultos jóvenes entre 30 y 40 años, presentando afección predominante en hombres. Está caracterizado por tener un alto grado de diferenciación celular y por ser de crecimiento lento. Tiene tendencia intrínseca a progresar a astrocitoma anaplásico e incluso llegar a glioblastoma [3].

e. Astrocitoma Anaplásico (Grado III)

Constituyen el 4% de todos los tumores malignos de SNC y el 10% de todos los gliomas [18]. También es denominado como “Astrocitoma maligno” o “Astrocitoma de alto grado”, presenta una incidencia anual de 0.5 a 0.7 por cada 100 mil personas [19]. Afecta principalmente a adultos entre los 45-69 años y se localiza en los hemisferios cerebrales

pero tiende a infiltrarse en los alrededores sin la destrucción completa del tejido cerebral, lo que conduce a una ampliación de las estructuras invadidas. En este tipo de tumor, son poco comunes los quistes macroscópicos pero con frecuencia se presentan áreas de granularidad, opacidad y consistencia suave [3].

f. Glioblastoma (Grado IV)

El glioblastoma o también denominado “Glioblastoma Multiforme” (GBM), es el tumor cerebral primario más frecuente, representa del 60-75% de los tumores astrocíticos con una incidencia de 3-4 casos nuevos por cada 100 mil personas al año [15]. El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) reporta que en México, el 9% de todos los tumores cerebrales son de tipo GBM, estos representan cerca del 45.7% de todos los gliomas [5] y presentan una incidencia de 3.5 por cada 100 mil habitantes [6]. Afecta principalmente a adultos y es localizado en los hemisferios cerebrales [3]. Es el tipo de tumor de mayor malignidad, se puede manifestar a cualquier edad, sin embargo, se observa un pico de incidencia entre los 45 y 75 años [2]. En particular, la población mexicana presenta una media de diagnóstico de 49 años [6], se observa una media de supervivencia que va de los 14-17 meses después del diagnóstico [4][12][20]. Se encuentra con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, con una prevalencia de 1.6 hombres por cada mujer [3] y es más común en caucásicos que en afro-americanos. Aproximadamente el 5% de los pacientes con gliomas malignos poseen una historia familiar con este padecimiento, algunos de estos, asociados con síndromes genéticos [21]. La mayoría de los pacientes con glioblastoma presentan recurrencia o recaída [20].

Los sitios más afectados son los lóbulos; temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) y occipital (16%), mientras que el cerebelo y la medula espinal son sitios raros para esta neoplasia [3]. En 2016, en México se reportó una prevalencia mayor en el lóbulo frontal (34%), lóbulo temporal (24%), lóbulo parietal (21%), lóbulo occipital (4%) y otras áreas como el tálamo y el cuerpo calloso (17%) [6]. La infiltración más frecuente es hacia la corteza adyacente y a través del cuerpo calloso dentro del hemisferio contralateral lo que conlleva a una imagen bilateral o lesión simétrica (glioma mariposa) [3].

Histología e inmunohistoquímica

En el caso del GBM los tumores son muy grandes al momento de su aparición y pueden ocupar gran parte del lóbulo. La lesión suele ser unilateral pero aquellos que se presentan en tallo cerebral y cuerpo calloso pueden tener crecimiento simétrico bilateral.

Macroscópicamente se observan poco delimitados, se producen masas tumorales de color grisáceo en la periferia con el centro de color amarillento, haciendo notable la necrosis debido a la ruptura de la mielina, esta necrosis central puede ocupar más del 80% de la masa total del tumor [3], además se han observado hemorragias intratumorales muy frecuentes [22].

Histopatológicamente los GBM pueden diferenciarse por la presencia de atipia nuclear, pleomorfismo celular, alta actividad mitótica, trombosis vascular, proliferación microvascular, necrosis [3] y la característica formación de pseudopalisadas; regiones hipóxicas con centros necróticos e hiper celularidad en la periferia, observable con tinción de hematoxilina-eosina [23].

Los marcadores inmunohistoquímicos son muy importantes para la clasificación y el diagnóstico neuropatológico de los gliomas. La herramienta más utilizada en la clínica son los marcadores para GFAP, la cual se encuentra aumentada en plasma, sin embargo, no es un marcador confiable, ya que en algunos tumores la mayor población de células se encuentra desdiferenciada [24] y para OLIG2 (por sus siglas en inglés *Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*) expresado de forma abundante en gliomas difusos y raramente expresado en otras patologías del SNC [11]. Las biopsias de GBM resultan positivas para las proteínas de tipo S100 [22], las cuales se encuentran involucradas en el control del ciclo celular de células nerviosas, gliales y epiteliales [25].

Se ha reportado la existencia de tres variantes histológicas: gliosarcoma, GBM de células gigantes y GBM de células pequeñas, aunque la sobrevida de estas no varía con respecto al GBM típico [26].

Clasificación molecular de los GBM

En la última década, se ha estudiado la heterogeneidad genómica del GBM, Verhaak y colaboradores, mediante el análisis del *Cancer Genome Atlas*, propusieron una clasificación molecular que consta de cuatro subtipos: clásico, mesenquimal, proneural y neural [27], los cuales se resumen en la Figura 1:

- **Clásico:** Asociado a la amplificación del cromosoma 7 y la pérdida del cromosoma 10, presenta amplificación de *EGFR*, sobreexpresión y su variante III (EGFRvIII). Ausencia de mutaciones en *TP53* e *IDH*. Deleción del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*) y sobreexpresión de marcadores de

precursores neuronales y células troncales como son *NES*, *NOTCH* (*JAG1* y *LFNG*) y vías de señalización Sonic hedgehog (*SMO*, *GAS1* y *GLI2*) [27].

- **Mesenquimal:** Asociado a deleciones hemicigóticas en la región 17q11.2 que contienen al gen *NF1* (por sus siglas en inglés *Neurofibromin 1*), que codifica para la proteína neurofibrina la cual es conocida por actuar como supresora tumoral al apagar a Ras, proteína que estimula el crecimiento y la división celular [28], sin embargo, estos tumores presentan poca expresión de este gen. Se les asocia con la expresión de marcadores mesenquimales como son; *CHI3L1*, *MET*, *CD44* y *MERTK*. Sobreexpresión de genes de la vía de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y NF-κB como *TRADD*, *RELB* y *TNFRSF1A* [27].
- **Proneural:** Asociado con sobreexpresión y aumento en el número de copias de *PDGFRA* y mutaciones puntuales del *IDH1*. También se encuentran mutaciones de *TP53* y pérdida de la heterocigocidad. La amplificación del cromosoma 7 junto con la pérdida del cromosoma 10 se encuentra en el 54% de los casos. Se ha demostrado sobreexpresión de genes del desarrollo oligodendrogial como *PDGFRA*, *NKX2-2* y *OLIG2*. La sobreexpresión de *OLIG2* disminuye al supresor tumoral *p21* (*CDKN1A*). Existen otros genes como *SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* y *TCF4* que se asocian a este subgrupo proneural [27].
- **Neural:** Asociado con la expresión de marcadores neuronales como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5* y en algunos casos sobreexpresión de *EGFR* y mutaciones en el gen. Es el subtipo más parecido con el tejido cerebral normal [27].

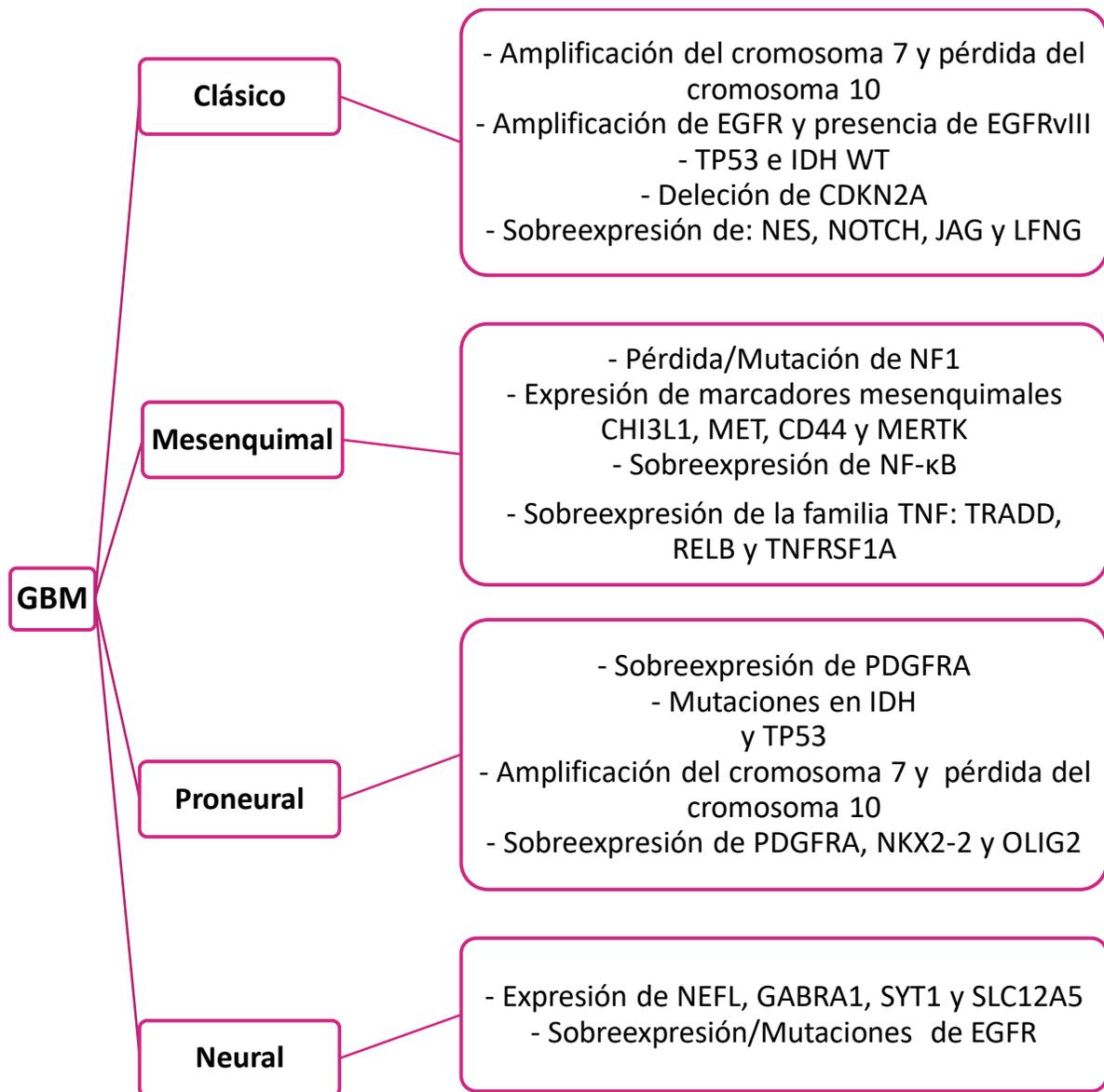


Figura 1. Clasificación molecular de los GBMs. Se muestra la clasificación en cuatro subtipos propuesta por Verhaak y colaboradores: clásico, mesenquimal, proneural y neural. EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFRvIII: Receptor del factor de crecimiento epidérmico variante III, TP53: Proteína tumoral 53, IDH: Isocitrato deshidrogenasa, WT: Wild type, CDKN2A: Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina o p16, NES: Gen que codifica para nestina, JAG1: Jagged (JAG) y participa en la vía de señalización NOTCH, LFNG: O-fucosilpeptido-3-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa, NF1: Neurofibromatosis 1, CHI3L1: Proteína 1 similar a la quitinasa 2 o YKL-40, MET: Transición epitelio-mesenquimal, CD44: Antígeno CD44, MERTK: Tirosina cinasa proto-oncogen Mer, NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células

B activadas, TNF: Factor de necrosis tumoral, TRADD: Factor de necrosis tumoral tipo 1 asociado a dominio de muerte, RELB: Factor de transcripción RelB, TNFRSF1A: Receptor 1A miembro de la super familia de TNF, PDGFRA: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, NKX2-2: Homeobox NKX2-2, OLIG2: Factor de transcripción de oligodendrocitos 2, NEFL: Polipéptido ligero de neurofilamento, GABRA1: Subunidad alfa 1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico tipo A, SYT1: Sinaptogamina 1, SLC12A5: Elemento 5 transportador de cloruro de potasio.

Tratamiento

En México, la Guía Práctica de Tratamiento del Glioma Cerebral de Alto Grado (Grado IV) para adultos (GPC: IMSS-647-13) recomienda como tratamiento de primera línea la resección quirúrgica del mayor volumen tumoral posible, sin embargo, es muy poco probable la extracción por completo debido a la naturaleza difusa de este tumor, por lo tanto, se recomiendan los siguientes tratamientos como adyuvantes post-operatorios:

Tabla 1. Terapias adyuvantes utilizadas actualmente para el tratamiento de glioblastoma.

Terapia adyuvante	Recomendación	Mecanismo de acción	Referencia
Radioterapia fraccionada conformacional 3D	Progresión tumoral	Daño directo al DNA por radiación ionizante	[19]
Temozolamida	Post-operatoria	Alquilación del DNA	[19]
Obleas de Carmustina	Post-operatoria Extirpación total	Alquilación del DNA	[29], [30]
Bevacizumab	No se realizó la prueba para MGMT	Bloqueo de la vía VEGF	[30],
TTF (Tumor Treating Fields)	Glioblastoma recurrente	Desestabilización del complejo de septinas	[31], [32]

La selección y uso de las terapias adyuvantes es dependiente de las características del paciente (edad, índice de Karnofsky, carga tumoral post-quirúrgica), así como de la accesibilidad a ellas por parte de la institución en donde son atendidos [19], [29], [31], [32].

Existen también, tratamientos adyuvantes en prueba, éstos son utilizados solos o en combinación, algunos de ellos se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos en prueba.

Agente (s) en estudio	Enzastaurin	Cediranib + lomustina	Bevacizumab + lomustina	Regorafenib
Blanco terapéutico	Inhibidor de serina/treonina cinasas	Anti pan-VEGFR	Anti VEGF-A	Inhibidor de FGFR, PDGFR- β , VEGFR, TIE-2, c-KIT y RET.
Aumento en la sobrevida	6.6 meses	8 meses	9.1 meses	7.4 meses

Modificado de [20].

Se ha propuesto a la dexametasona (DEX) como tratamiento adyuvante para el edema peritumoral, durante el ensayo clínico, la hiperglicemia y los síntomas psiquiátricos fueron los efectos adversos más comunes. Se observó que la DEX generó una reducción en los linfocitos CD3 y de los granulocitos CD15 en el parénquima tumoral y disminuyó la secreción de MMP-2 y la invasividad por activación de la vía MKP-1 en células de glioma. En ensayos celulares, DEX incrementa la adhesión celular y reorganiza la actina en fibras de estrés resultando en una disminución de la motilidad e invasión observado en neuroesferas de GBM [33].

2.2 Receptores nucleares a progesterona

El receptor a progesterona (RP) es miembro de la familia de reguladores transcripcionales nucleares activados por ligando [34], [35], está compuesto por cinco dominios (Fig. 2) que van de la A a la E; el dominio amino terminal (A/B), participa en la regulación de la transcripción, es el dominio más variable en longitud dependiendo de la isoforma, esta región contiene funciones de activación (AF) que regulan la transcripción de genes blanco. El dominio C posee la región más conservada que participa en la unión al DNA (DBD: *DNA-Binding Domain*), el DBD contiene dos dedos de zinc que participan en la dimerización del receptor y en el reconocimiento del DNA. El dominio D o también denominado bisagra, es una región en forma de horquilla que contiene el péptido de localización nuclear (NLS: *Nuclear Localization Signal*) y los sitios de unión a proteínas de choque térmico (Hsp90), que mantienen al receptor en su estado inactivo. Por último, el dominio E que contiene una función de activación (AF-2) dependiente de ligando y varios sitios de unión a chaperonas y a correguladores [36], [37].

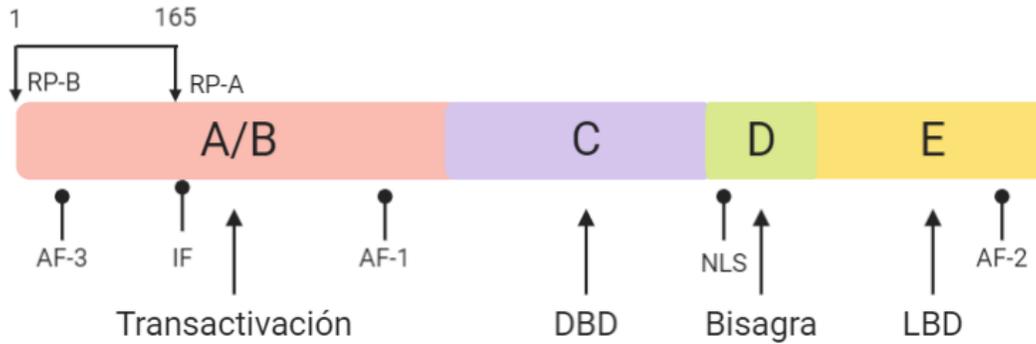


Figura 2. Receptor a progesterona (RP). Se muestra una representación esquemática de las isoformas A y B del RP. El receptor consta de cinco dominios (de la A a la E), la longitud del dominio A/B es dependiente de la isoforma, en este dominio se encuentra presente la función de inactivación (IF), en el caso de B, presenta dos funciones de activación (AF-3 y AF-1) que participan en la regulación de la transcripción y en la isoforma A se observa la AF-1. La región C está conformada por el dominio de unión a DNA (DBD) y el dominio de dimerización. El dominio D contiene a las secuencias de localización nuclear (NLS) en éste dominio se da la de unión a proteínas chaperonas (proteínas de choque térmico como Hsp90). Por último, el dominio E que tiene la región de unión a ligando (LBD), la región de unión a correguladores y una función más de activación (AF-2). (Tomada de [38]).

Isoformas del RP nuclear

En humanos, el RP se ha encontrado en dos isoformas, RP-A (94 KDa) y RP-B (116 KDa) [39]. El gen que codifica para el RP se denomina *PGR*, *PR* o *NR3C3*, éste contiene dos promotores de los cuales diferentes mRNAs son transcritos. RP-B difiere de RP-A en 164 aminoácidos presentes en el segmento amino terminal [40], ambas isoformas son capaces de unirse a DNA y a progesterona [34], sin embargo, dependiendo de la isoforma, el receptor puede funcionar como activador o represor transcripcional [41]–[43]. El dominio específico de RP-B codifica una tercera función de transactivación (AF-3) la cual es ausente para RP-A [44]. Estudios sugieren que este dominio AF-3 contribuye a la actividad transcripcional de RP-B suprimiendo la actividad del dominio con función de inactivación (IF) contenido en común tanto en RP-A y RP-B, ambas isoformas son encontradas en el cerebro y en la espina vertebral [36], [45].

La estructura de las isoformas del RP, la dimerización, las modificaciones postraduccionales y el reclutamiento de distintos coactivadores confieren respuestas tejido específicas y una regulación diferencial de los genes blanco [40], [46], por ejemplo; la unión

diferencial de SMRT (por sus siglas en inglés *Silencing-Mediator for Retinoid/Thyroid hormone receptors*) que actúa como correpresor y SRC-1 (por sus siglas en inglés *Steroid Receptor Coactivator 1*) un coactivador, con las dos isoformas del RP (A y B), han logrado explicar las actividades transcripcionales tan opuestas de estas isoformas [34]; RP-A posee mayor afinidad por SMRT, mientras que RP-B es más afín a SRC-1 [47].

Regulación de la actividad del RP

El RP sufre diferentes modificaciones post-traduccionales, como son, fosforilación, sumoilación, acetilación y ubiquitinación [48]. Su estado de fosforilación influye en la actividad transcripcional, la localización celular, la especificidad de genes blanco, la tasa de recambio y la formación de complejos [49].

El RP humano posee diversos sitios de fosforilación (Fig. 3), existen cinasas capaces de fosforilar al RP: la caseína cinasa 2 (CK2), la cinasa dependiente de ciclina (CDK2), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK-44 y MAPK-42) y la cinasa de la glicógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) [50], [51], [52], [53], se sabe que la progesterona es capaz de inducir la fosforilación del RP en tres sitios: Ser102, Ser294 y Ser345 [50]. Estos sitios, al ser fosforilados, dan lugar a diferentes respuestas, tal es el caso de la Ser294 que al ser fosforilada por la MAPK, marca al RP para su degradación por el proteosoma [34], [54], En nuestro grupo de trabajo se identificó a la PKC α como la cinasa responsable de la fosforilación del RP en el sitio Ser400 en líneas celulares derivadas de glioblastoma [10].

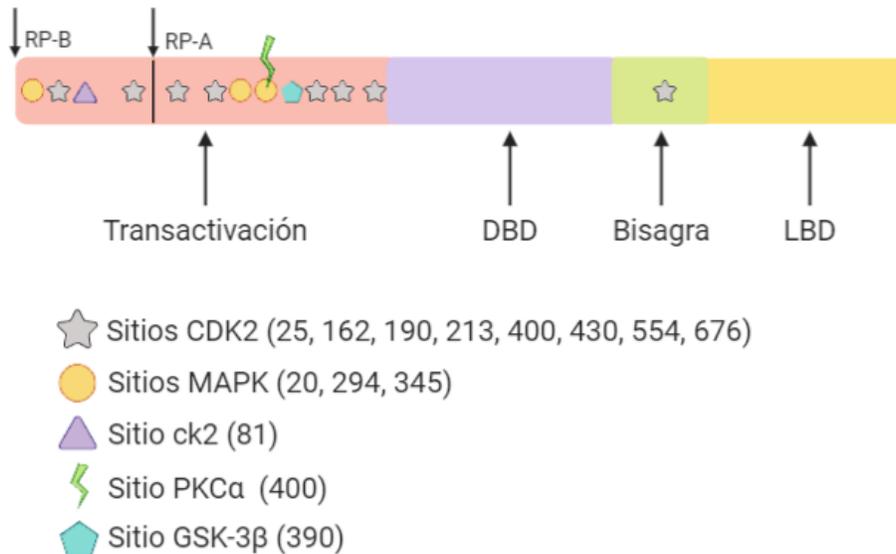


Figura 3. Sitios de fosforilación del RP. Se muestran los dominios con función de transactivación, el dominio de unión al DNA (DBD por sus siglas en inglés *DNA Binding Domain*), la región bisagra y el sitio de unión a ligando (LBD). Se señalan los sitios de fosforilación determinados *in vivo* e *in vitro*, así como las cinasas implicadas en la fosforilación directa del RP. CDK2: Cinasa 2 Dependiente de Ciclina, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, ck2: Caseína Cinasa 2, PKCα: Proteína Cinasa C alfa y GSK-3β: Cinasa de la Glucógeno Sintasa.

Otro caso es el residuo Ser400 que es fosforilado basalmente y en respuesta a mitógenos y esta fosforilación es requerida para la regulación de la actividad independiente de ligando [55]. En nuestro grupo de trabajo se identificó que las proteínas cinasas C son capaces de fosforilar al RP, esto evaluado en dos líneas celulares derivadas de glioblastoma [10].

2.3 Proteína Cinasa C

Las proteínas cinasas C (PKC) (Fig. 4) son una familia de isoenzimas que poseen actividad de Ser/Thr cinasas, forman parte de diversas cascadas de señalización y están implicadas en una amplia gama de respuestas celulares [56]. Fueron las primeras enzimas identificadas como receptoras del diacilglicerol, un lípido generado como producto de la activación de la fosfolipasa C gamma (PLCγ), que es conocida por ser un transductor de señal corriente abajo de diversos receptores [57].

Esta familia consiste en al menos 11 isotipos con diferencias estructurales, en la distribución celular y en sus funciones biológicas [58]. Todos los miembros de esta familia

comparten la misma arquitectura: un dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal unido mediante un dominio bisagra a la región amino terminal, que contiene los sitios regulatorios [59].

Las PKCs pueden ser clasificadas en 3 grupos de acuerdo con su estructura y su función:

1. PKCs clásicas (cPKCs): PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ , que requieren Ca²⁺ y fosfolípidos cargados negativamente, como el diacilglicerol (DAG) y la fosfadil serina.
2. Las PKCs nuevas (nPKCs): PKC ζ , PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ , este grupo es regulado por DAG, sin embargo, no requieren Ca²⁺ para ser activadas.
3. Las PKCs atípicas (aPKCs): PKC ξ y PKC λ son independientes de DAG y de Ca²⁺, son activadas por interacciones proteína-proteína como Par6 (por sus siglas en inglés *Partitioning-defective protein 6*) [60] y por ceramidas [56], [57].

La mayoría de estos isotipos son expresados de manera ubicua y sólo algunos de ellos están restringidos a ciertos órganos o tipos celulares, por ejemplo, PKC γ se expresa únicamente en tejido neuronal y PKC β la podemos encontrar en islotes pancreáticos, monocitos y cerebro [57].

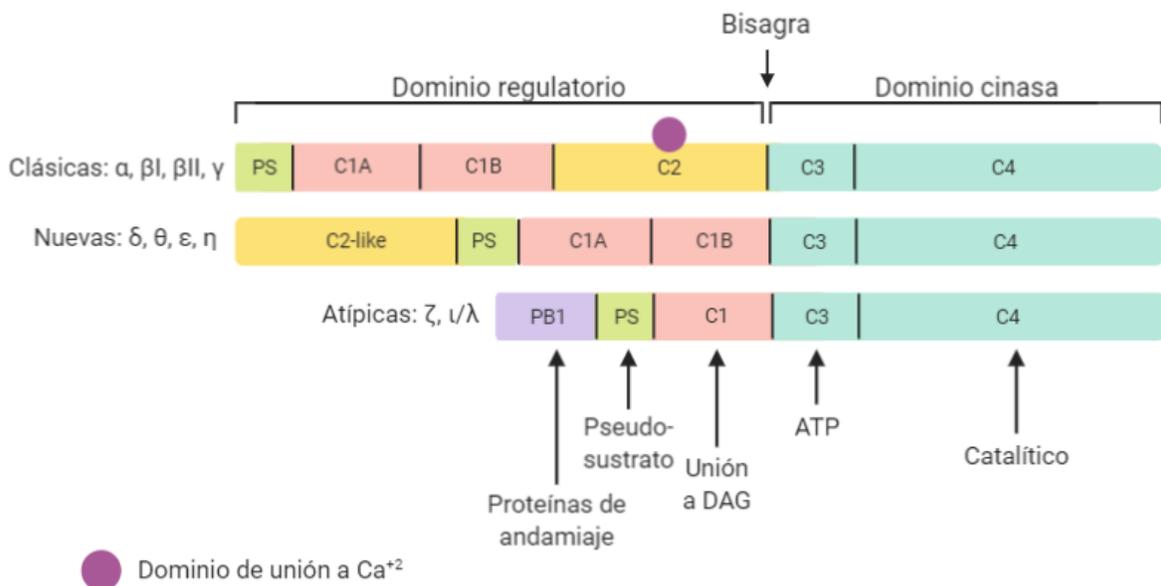


Figura 4. Estructura e isotipos de PKC. Se muestra la familia de PKCs y los grupos que la conforman. Todos los isotipos contienen un dominio regulatorio y un dominio cinasa. El dominio regulatorio consiste en 3 regiones: C1 (rosa) responsable de la unión a diacilglicerol (DAG), C2

(amarillo) que contiene el dominio de unión a Ca^{2+} y una región de unión a pseudosustrato (verde). En el caso del grupo de PKC atípicas, no contienen a la región C2 y poseen una región PB1 (morado) responsable de la unión con proteínas de andamiaje. El dominio cinasa está conformado por una región C3 y C4 (azul), C3 contiene al dominio de unión a ATP y C4 el dominio catalítico, estas regiones contienen sitios de fosforilación que son clave para la maduración y activación de las PKCs.

Las PKCs clásicas están conformadas por 4 dominios que van desde C1 a C4:

- C1: Contiene al dominio de unión al diacilglicerol, es rico en cisteína, en este dominio se encuentra la región de pseudo-sustrato, dominio crucial para la activación de la enzima.
- C2: Dominio de unión Ca^{2+} .
- C3: Es el dominio responsable de la unión a ATP.
- C4: Contiene al dominio catalítico.

Las PKCs clásicas son expresadas como proteínas citosólicas las cuales son reclutadas hacia la membrana plasmática después de su activación, mediante la interacción del dominio C1 y C2 [57]. El tratamiento de las células a tiempos cortos con un éster de forbol como el TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), provoca la activación de PKC clásicas, sin embargo, una exposición prolongada de las células con TPA incrementa su degradación y regula su expresión a la baja [57].

PKC α

Éste isotipo es expresado de manera ubicua en diversos tejidos y tiene un papel importante en el control de funciones celulares como: proliferación celular, apoptosis, migración y diferenciación celular [61]. Su forma inactiva se da a través del dominio de pseudosustrato en donde interactúan el dominio C1 con el dominio C4 previniendo la unión de su sustrato natural [57].

Como se mencionó anteriormente, PKC α además de ser activada por calcio y diacilglicerol, puede ser activada por fosforilación, principalmente en 3 residuos conservados: Thr497, Thr638 y Ser657, este último, utilizado como marcador de la activación [61]. La activación resulta en un aumento en la migración que es asociada con un incremento en la capacidad invasiva, esto observado en modelos de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*, efecto que ha sido revertido al inhibir PKC α [57]. Mediante

inmunohistoquímica se ha detectado que PKC α se encuentra sobre expresada en tejidos cancerosos de próstata, endometrio y de vejiga [57].

Actualmente se sabe que el efecto proliferativo y anti-apoptótico de PKC α parece estar mediado por la activación de la cascada Raf-1/ERK/MAPK [62], su efecto anti-apoptótico se da mediante la fosforilación de la proteína anti-apoptótica Bcl2 [63] y/o mediante el bloqueo de P53 conocida por ser una proteína inductora de señales apoptóticas como son Bax, Apaf-1, caspasas e IGFBP-3 [61].

2.4 RP y tumores astrocíticos

Khalid y colaboradores [64], al analizar 86 biopsias de pacientes por medio de la detección inmunohistoquímica del RP, encontraron que su expresión en tumores astrocíticos aumenta con respecto al grado histológico, los tumores de menor grado (I y II) presentaron una menor expresión de RP con respecto a los de alto grado (III y IV). De la misma forma, un año después Assimakopoulou [65] determinó la expresión de RP en biopsias de pacientes y observó que el porcentaje de inmunoreactividad del RP es proporcional al grado del tumor, teniendo 59% de células positivas para glioblastoma, 45% para tumores anaplásicos y el 24% en los tumores de bajo grado.

Se sabe que la activación del RP, ya sea por medio de su ligando o por una vía alternativa como PKC, induce la proliferación celular en astrocitomas [66], ya que los receptores a progesterona actúan como factores de transcripción sobre genes que contienen promotores con elementos de respuesta a progesterona (PREs: *Progesterone Response Elements*). Hernández-Hernández y colaboradores [67] determinaron que el RP en líneas celulares de astrocitomas (U373 y D54) regulaba a la alta la expresión de VEGF y EGFR después de 12h de su activación con progesterona y este efecto fue bloqueado por el antagonista del RP (RU486).

El PIBF (por sus siglas en inglés, *Progesterone Induced Blocking Factor*) está involucrado en la proliferación celular en astrocitomas y se ha observado que la progesterona induce la expresión de este factor a través de la activación del RP en una línea celular derivada de glioblastoma [68]. En un estudio reciente se observa que la activación de PKC α en la línea celular U251 derivada de un glioblastoma humano, incrementa la actividad transcripcional del RP lo que correlaciona con el incremento en la

expresión del PIBF, sugiriendo que la vía PKC/RP puede inducir la expresión de genes involucrados en la proliferación celular [10], [68].

2.5 PKC y gliomas

La sobre-expresión o hiper-activación de PKC es una característica distinguible de los glioblastomas [69]. Diversos ensayos demuestran que la actividad de PKC se ve incrementada en líneas celulares derivadas de gliomas comparadas con astrocitos y que los inhibidores de PKC reducen su proliferación significativamente[58].

Actualmente se sabe que los isotipos de PKC poseen diferentes efectos sobre el desarrollo tumoral de los astrocitomas, en la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos:

Tabla 3. Efecto de los isotipos de PKC sobre células derivadas de tumores astrocíticos.

Isotipo	Efecto
PKCα	Proliferación, sobrevida, invasión, migración, anti-apoptosis.
PKCϵ	Sobrevida, invasión, migración, anti-apoptosis.
PKCζ	Proliferación, sobrevida, invasión y migración.
PKCι	Proliferación, sobrevida e invasión.
PKCη	Proliferación celular y anti-apoptosis.
PKCδ	Proliferación, invasión y pro/anti-apoptosis.

[Modificado de 67].

Mandil y colaboradores [58] analizaron el patrón de expresión de los diferentes isotipos de PKC en la línea celular U87, la cual expresa PKC α , PKC δ y PKC ϵ , [69] y en biopsias de pacientes, en donde encontraron que ambas presentan un patrón de expresión similar. También realizaron la modificación de la línea celular U87 para sobre-expresar PKC α lo que generó un aumento en la capacidad proliferativa. El inhibidor competitivo de PKC α , Gö6983 disminuye sustancialmente la proliferación de las líneas celulares U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos [69], y cuando se depleta PKC α , se observa una reducción de células en fase S [69].

El mecanismo mediante el cual PKC α ejerce su efecto, ha sido atribuido a la sobre-regulación de la vía de señalización ERK, la inhibición de la cinasa CDC2 y la inducción de p21/walf [69].

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se encontró que en la línea celular U373, derivada de un astrocitoma humano de alto grado, están presentes los isotipos PKC α , PKC δ y PKC ϵ . Los isotipos PKC α y PKC δ aumentaron la fosforilación del RP y ésta fosforilación indujo la actividad transcripcional del receptor lo que correlacionó con un aumento en la proliferación, migración e invasividad de las células de astrocitomas de grado III y IV [10]. Posteriormente, se reportó que existe una interacción entre PKC α y el RP, misma que no se presentó con δ [71].

En la clínica, se han probado inhibidores específicos de PKC α como tratamiento para gliomas, tal es el caso del aprinocarsen, un oligo antisense que al ser probado en la línea celular A172 derivada de un glioblastoma provocó un aumento en los niveles de P53 y un aumento en el arresto del ciclo celular, en cuanto a pruebas en humanos alcanzó la fase III [57], sin embargo, estos protocolos no han progresado debido a que no se observó un efecto benéfico en los pacientes tratados [72].

3. Justificación

Se ha observado, en modelos *in vitro* e *in vivo*, que el RP y la PKC α juegan un papel importante en la proliferación, migración e invasividad de células tumorales astrocíticas, sin embargo, no se ha estudiado la relación entre su detección, colocalización y fosforilación del receptor con respecto al grado de malignidad en muestras de pacientes con diagnóstico de astrocitomas grados I, II, III y IV.

4. Hipótesis

La detección y colocalización del RP y de la PKC α correlacionarán positivamente con el grado de malignidad de los astrocitomas.

La fosforilación del RP en el sitio Ser400 del RP aumentará con respecto al grado de malignidad de los astrocitomas.

5. Objetivo General:

Detectar y localizar al RP total y fosforilado, así como a la PKC α en muestras provenientes de pacientes con diagnóstico de astrocitomas grados I-II, III y IV.

6. Objetivos específicos:

- 1) Detectar la presencia y la colocalización del RP total y fosforilado así como de PKC α en muestras de pacientes con astrocitomas grados I, II, III y IV.
- 2) Evaluar la relación entre la detección del RP total y fosforilado así como de PKC α con el grado de malignidad de los astrocitomas.
- 3) Determinar si la detección y la colocalización del RP y de la PKC α en pacientes con astrocitomas grados I, II, III y IV será distinta entre hombres y mujeres.
- 4) Evaluar la correlación entre el contenido del RP, de la PKC α y la colocalización de estos con respecto a la edad y el grado histológico del tumor.
- 5) Mediante el uso de bases de datos (TCGA y GTEx) evaluar la expresión a nivel de mRNA, para el RP y PKC α en muestras de pacientes.

7. Metodología

Evaluación del contenido del RP, RP pSer400 y de la PKC α en muestras de astrocitomas mediante inmunofluorescencia

Tumores provenientes de 46 pacientes (Tabla 4) fueron colectados durante el procedimiento quirúrgico en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN) de acuerdo con lo establecido en el protocolo N° 67/12 aprobado por el Comité de Bioética del INNN titulado “Identificación de biomarcadores pronósticos clínicos y moleculares en pacientes con astrocitoma. Mediante análisis histopatológico fueron clasificados en astrocitomas de bajo grado (Grado I y II: 9 casos), de Grado III: 12 casos y en glioblastomas o grado IV: 25 casos. Para este estudio se obtuvieron 6 muestras provenientes de mujeres con epilepsia, las cuales fueron utilizadas como controles. Una vez removidos los tumores, los tejidos fueron embebidos en parafina para su posterior corte y montaje en portaobjetos. Las laminillas obtenidas fueron donadas por la Dra. Sonia Mejía Pérez y la Dra. Talía Wegman Ostrosky.

A los cortes obtenidos se les eliminó la parafina en baño seco a 60°C durante 50 minutos, los portaobjetos fueron pasados por los siguientes gradientes; Xilol, Xilol:Etanol (1:1), Etanol (100%), EtOH (96%) y EtOH (90%), incubando durante 5 minutos cada uno. Para la identificación de los antígenos, se expusieron los epítopes con una solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6.0) a ebullición durante 1 hora, posteriormente se bloquearon los antígenos inespecíficos con albúmina al 5% en solución TBS-Tween 0.1% durante toda la noche a 4°C y en cámara húmeda. Se adicionaron los anticuerpos primarios: rabbit anti-RP (sc-7208, Santa Cruz Biotechnology, lote: A1711) y mouse anti-PKC α (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology, lote: 2902) a una concentración de 2 μ g/mL y anti rabbit-phospho S400RP 2 μ g/mL (ab60954, abcam, lote: GR85615-2), se incubaron una noche en refrigeración y cámara húmeda. Posteriormente, se removieron los anticuerpos con 3 lavados con TBS-Tween 0.1% durante 5 minutos en agitación. Se añadieron los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 anti-rabbit 2 μ g/mL y Alexa Fluor 594 anti-mouse 2 μ g/mL, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% e inmediatamente se añadió Hoechst 33342 (H3569, Thermo Fisher Scientific) 0.1 μ g/mL como marcador de núcleos, se incubó durante 7 min y se les hizo un ligero lavado con TBS-Tween 0.1%. Finalmente las laminillas se fijaron en un medio de montaje no fluorescente (Antifade Mounting Medium H-1000, VECTASHIELD®, lote: ZE0625A).

Los cortes histológicos previamente teñidos fueron observados y fotografiados con el microscopio de fluorescencia (Olympus Bx43). Se tomaron 25 campos para cada muestra. Se cuantificó el % de células positivas mediante el programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics), posteriormente se promediaron los valores para tener un valor único por cada paciente. Posteriormente, se evaluó la intensidad de fluorescencia para cada campo, considerada como una medida proporcional de la densidad de células positivas. Los resultados obtenidos fueron divididos de acuerdo con el sexo del paciente (M: masculino y F: femenino) para analizar la relación entre el sexo, la detección y la colocalización del RP y la PKC α mediante el programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics).

Categorización de Resultados

Para establecer categorías de acuerdo con el nivel de expresión de las proteínas evaluadas (bajo, medio o alto), se aplicó la fórmula descrita por Villegas-Pineda y colaboradores [73]:

$$\frac{\text{Valor de intensidad mayor} - \text{Valor de intensidad del control}}{3} = \text{Contenido}$$

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron colectados y expresados como la media \pm la DE del % de células positivas y la intensidad de fluorescencia para cada proteína, así como la colocalización de ambas. Para calcular si existe significancia estadística los resultados fueron analizados mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunett. El análisis fue realizado en GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Valores de p menor o igual a 0.05 fueron considerados significativos. Para el análisis de la relación entre las características clínicas y patológicas del paciente con la edad y el % de positividad del RP, PKC α y la colocalización de ambas proteínas, se evaluará mediante un análisis de correlación de Spearman, en el programa GraphPad Prism 5.0.

Evaluación de los genes PGR y PRKCA

Para la determinación de mRNA de *PGR* y *PRKCA* fue utilizada la plataforma de la Universidad de California, Santa Cruz: UCSC Xena (XenaBrowser.net) y las bases de datos TCGA y GTEX para tejido tumoral y no tumoral, respectivamente. Las muestras utilizadas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 4. Características clínico-patológicas de las muestras obtenidas en las bases de datos TCGA y GTEX.

Características clínico-patológicas	No tumoral	G2	G3	G4
n	283	258	271	166
Edad promedio	-	39.9	45.5	59.4
Tiempo de sobrevida	-	37.6	28.3	14.2

G2: grado II, G3: grado III y G4: grado IV o glioblastoma.

Para el tejido no tumoral, fue utilizada la base de datos de GTEX. Aplicando los filtros necesarios, fueron seleccionadas las muestras provenientes de las áreas más comunes en donde se presentan los astrocitomas, para fines de este análisis se incluyeron: corteza frontal (BA9), corteza del cíngulo anterior (BA24) y corteza, con esto, se obtuvo una N de 283 muestras después de eliminar datos repetidos. En el caso de las muestras tumorales, fue utilizada la base de datos TCGA y después de aplicar los filtros correspondientes, se obtuvieron datos para astrocitomas de grado II (G2), grado III (G3) y grado IV (G4), posterior al eliminar muestras replicadas obtuvimos G2: 258, G3: 271 y G4: 166. Los datos de expresión a nivel de mRNA para *PGR* y *PRKCA* fueron extraídos y posteriormente graficados en GraphPad Prism 5.0. Se utilizó como control positivo al *EGFR*.

8. Resultados

Se utilizaron muestras provenientes de pacientes tratados del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, con diagnóstico de astrocitoma de grado I-II, III y IV. En la Tabla 5 se muestran los datos clínicos y patológicos de los pacientes.

Tabla 5. Características clínicas y patológicas de los pacientes con astrocitomas.

NRM	ED	GH	Total de muestras	Sexo				
IC12-3208	17	1-2	Bajo Grado 9	M	B08-802	66	3	M
IC13-6917	18	1-2		F	B13-216	48	3	F
IC13-133861	26	1-2		F	B13-276	55	3	M
B13-573	22	1		F	B13-422	38	3	F
B13-929	40	1		F	B13-766	65	3	F
B13-644	25	2		M	B14-81	48	3	F
B13-660	34	2		F	B14-225	66	3	M
B13-662	56	2		M	IC12-668	27	3	F
B13-789	35	2		M	IC14-5806	32	3	F
B07-348	30	3		M	B05-225	16	4	F
B07-555	73	3		M	B06-04	23	4	M
B07-726	68	3		M	B06-641	50	4	M
					B06-97	55	4	F
				B07-245	27	4	M	

B07-608	48	4	Grado IV 25	M
B07-870	43	4		F
B08-313	74	4		F
B08-731	27	4		M
B08-923	39	4		M
B09-226	66	4		M
B09-496		4		M
B09-539	41	4		M
B12-01	52	4		F
B13-581	29	4		M
B13-617	44	4		M
B13-665	70	4		F
B13-678	48	4		F
B13-680	56	4		M
B13-686	61	4		F

B13-737	46	4		F
B14-03	79	4		M
B14-05	56	4		M
IC13-1993	21	4		F
IC14-5561	49	4		F
No Tumoral				
B14-444	-	-	No Tumoral 6	F
B14-495	-	-		F
B14-518	-	-		F
B14-605	-	-		F
B14-696	-	-		F
B14-791	-	-		F

NRM: Número de referencia médica, ED: Edad,
GH: Grado histológico

Para el análisis de las muestras, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para las proteínas RP, PKC α y pSer400 del RP. En la Figura 5 se observan campos representativos de cada grado de astrocitoma (I-IV) y del control. En el panel se observan los núcleos en azul teñidos con Hoechst, en verde la PKC α , en rojo el RP y en la línea inferior se presenta el sobrelape correspondiente a todos los canales.

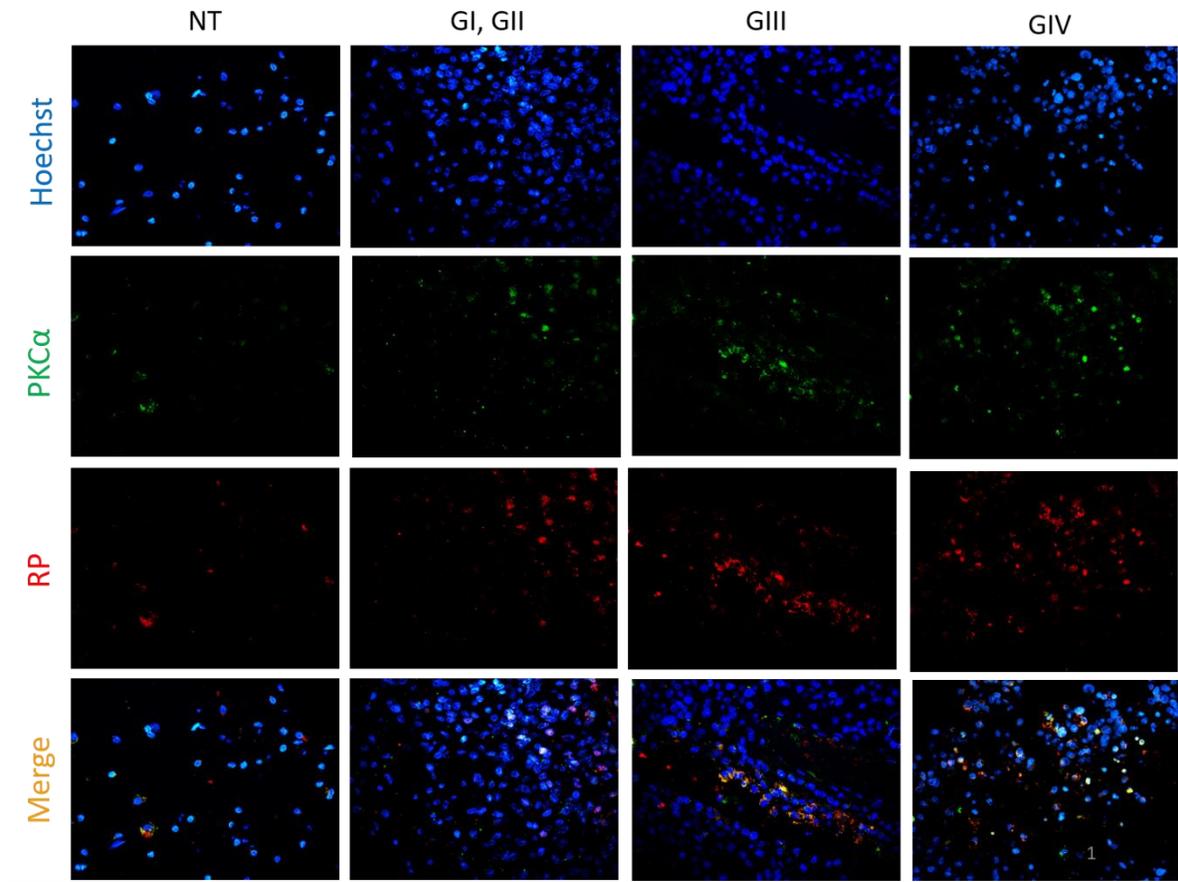
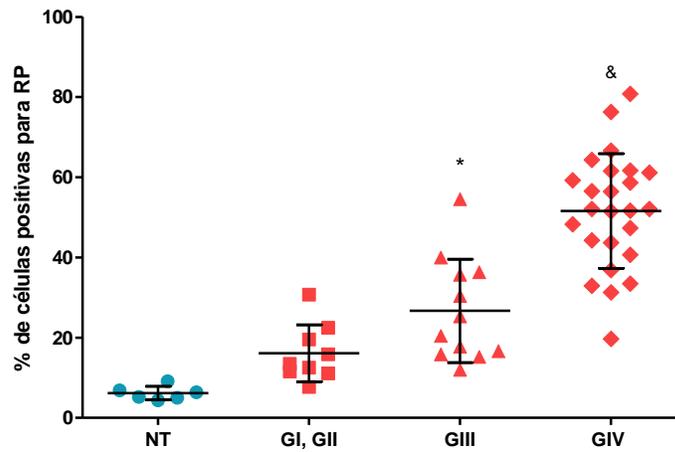


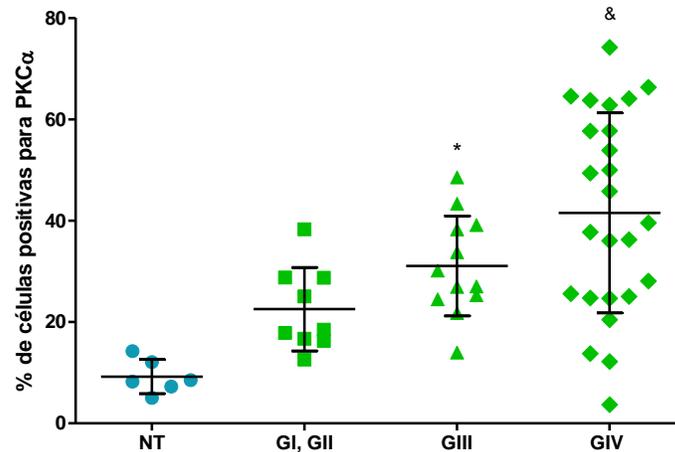
Figura 5. La presencia del RP y de PKC α aumenta con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos. Imágenes representativas de los grupos analizados; NT: No tumoral, Grado I y II, Grado III y Grado IV, en azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst, en verde la marca para PKC α , en rojo la señal generada por el RP y por último se muestra el merge (sobrelape).

Posteriormente se realizó el análisis cuantitativo de la señal obtenida para cada proteína, reportado como % de células positivas para RP (Fig. 6A) o PKC α (Fig. 6B) y el % de células en las que colocalizan (Fig. 6C) ambas proteínas. Se observa que existe una tendencia de aumento en el % de células positivas para ambas proteínas con respecto a los grados III y IV que es significativa con respecto al control.

A.



B.



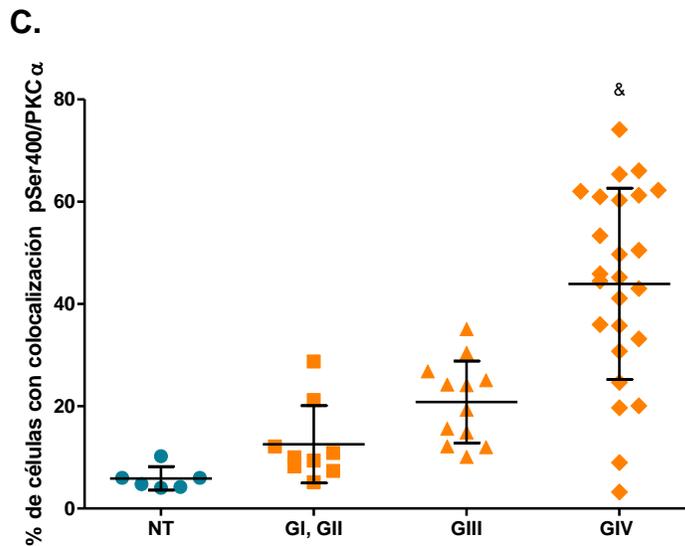


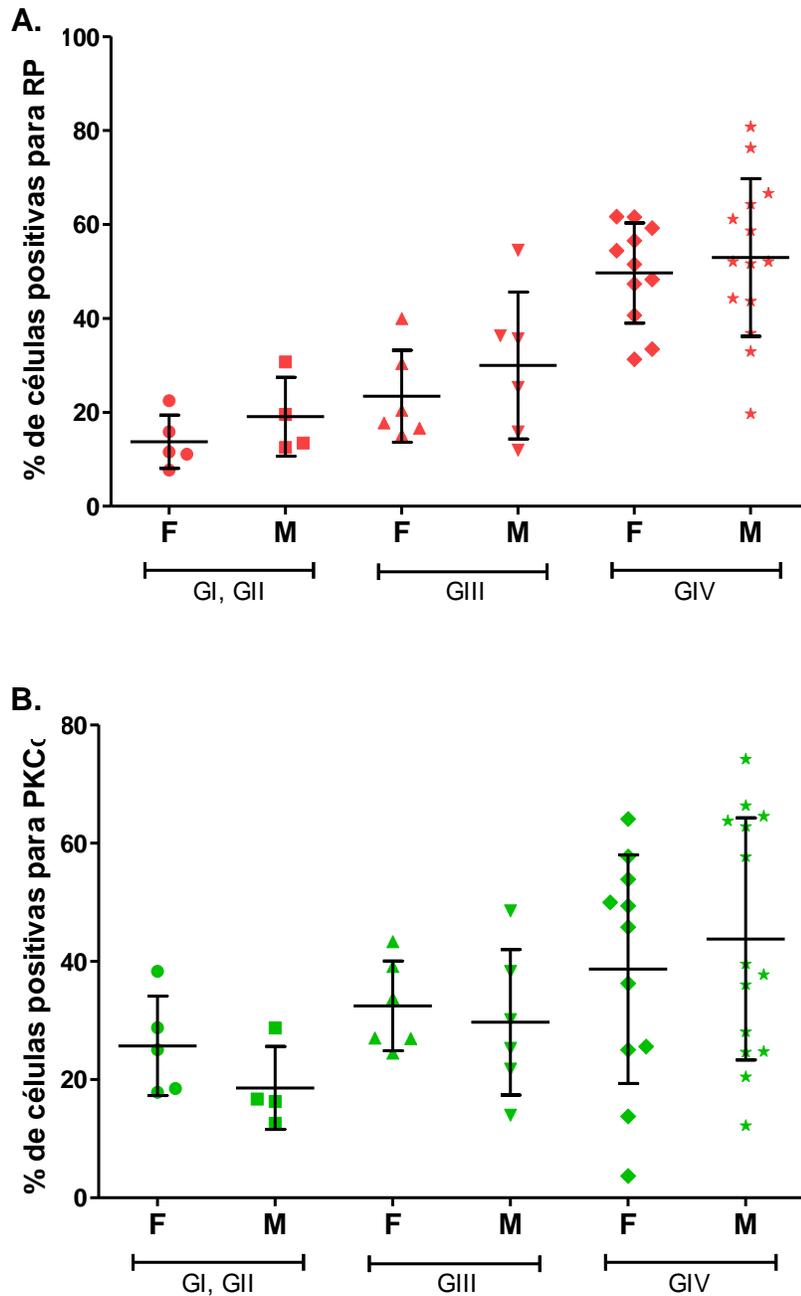
Figura 6. El % de células positivas para RP, PKC α y la colocalización de ambas aumenta con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos. % de células positivas para A. PR, B. PKC α y C. colocalización de ambas proteínas. NT: No tumoral, GI, GII: Grado 1 y 2, GIII: Grado 3 y GIV: Grado V o Glioblastoma. Para cada muestra se tomaron 25 campos al azar, las barras representan la media \pm DE (* $p \leq 0.05$ vs NT, & $p \leq 0.05$ vs todos los grupos).

Para estas muestras, se realizó también la cuantificación de la intensidad de fluorescencia, una aproximación a la media de fluorescencia de células positivas para cada proteína, para esto se aplicó la fórmula descrita anteriormente. Con lo anterior se obtuvieron 3 intervalos de intensidad para cada proteína (bajo, medio y alto), posteriormente se clasificaron las muestras de acuerdo con la intensidad que presentaron (Tabla 6). Se observó que para ambas proteínas, el mayor porcentaje de muestras se encuentra en el grupo que correlaciona con el grado histológico; para astrocitomas de bajo grado, el 66.6% de las muestras presentan un contenido bajo de células positivas para RP y 70% PKC α , para astrocitomas grado III, el 66.66% de las células fueron positivas para RP y el 61.54% para PKC α y encuentran en el grupo de intensidad media y para astrocitomas grado IV el 72% de las células fueron positivas para RP y el 64% para PKC α y encuentran en el grupo de intensidad alta.

Tabla 6. Contenido de RP y PKC α analizado mediante intensidad de fluorescencia.

Marcador	Grado Histológico	% de muestras	Contenido
RP	1-2	66.66	Bajo
		22.22	Medio
		11.11	Alto
	3	25	Bajo
		66.66	Medio
		8.33	Alto
	4	8.0	Bajo
		20.0	Medio
		72.0	Alto
PKCα	1-2	70.0	Bajo
		20.0	Medio
		10.0	Alto
	3	7.69	Bajo
		61.54	Medio
		30.77	Alto
	4	8.0	Bajo
		28.0	Medio
		64.0	Alto

Para conocer si existe una diferencia en el contenido de las proteínas con respecto al sexo, a partir de los resultados obtenidos en la Fig. 6, cada grado histológico fue clasificado y analizado en dos grupos (F: femenino y M: masculino). Como se observa en la Fig. 7 no existe diferencia significativa en el % de células positivas para ambas proteínas ni para su colocalización entre sexos.



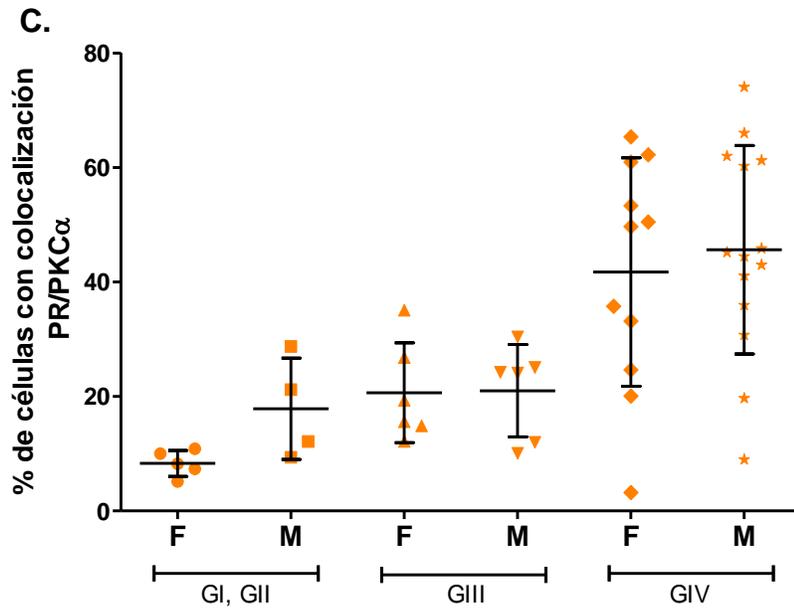
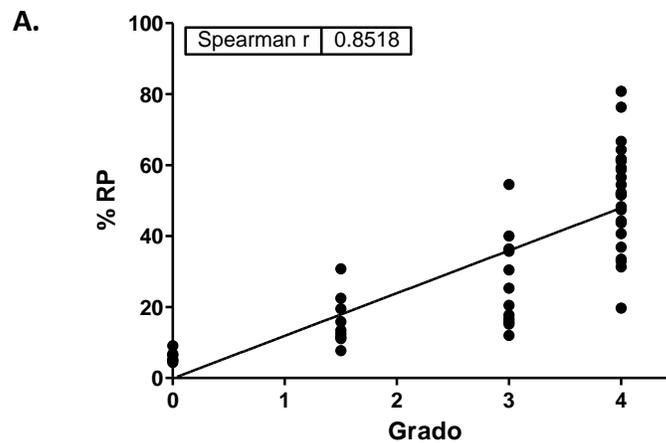


Figura 7. El % de células positivas para RP, PKC α y su colocalización, no presenta diferencia significativa entre sexos. Porcentaje de células positivas para el PR y el PKC α con respecto al sexo. **A.** PR, **B.** PKC α y **C.** colocalización. Se clasificaron los resultados de acuerdo con el sexo del paciente. . Para cada muestra se tomaron 25 campos al azar, las barras representan la media \pm DE.

Mediante una correlación de Spearman, se analizó la relación entre el % de positividad para los marcadores analizados (RP, PKC α y colocalización) contra el grado del astrocitoma (Fig. 8A, B y C) o la edad de diagnóstico (Fig. 9A, B y C), mostrando una correlación positiva entre el grado del tumor con respecto al % de células positivas y para la colocalización. Mientras que para la edad de diagnóstico, no se encontró correlación.



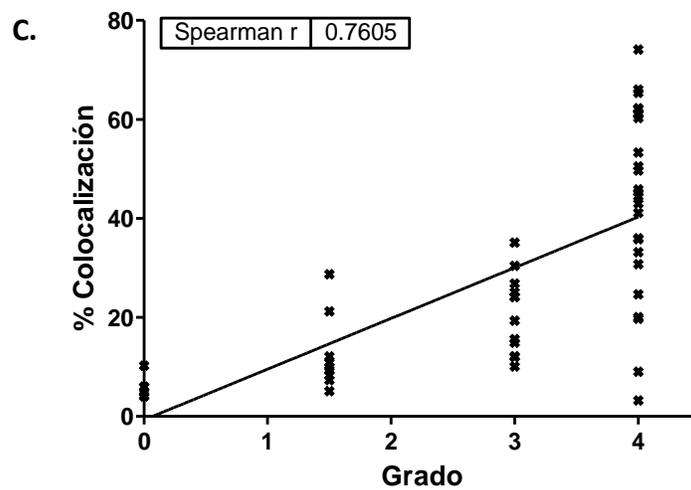
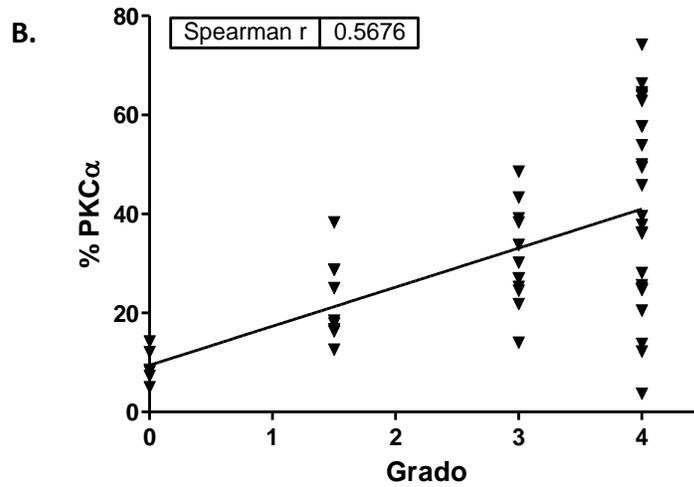


Figura 8. Existe correlación positiva entre el % de células positivas para RP y su colocalización con PKC α con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos. Gráficos de correlación entre el grado de evolución de los astrocitomas contra el porcentaje de células positivas para los distintos marcadores **A.** RP, **B.** PKC α y **C.** el porcentaje de células en las que colocaliza la marca del RP/PKC α . En el caso **A** y **C**, se observa una correlación positiva y para **B**, no existe correlación.

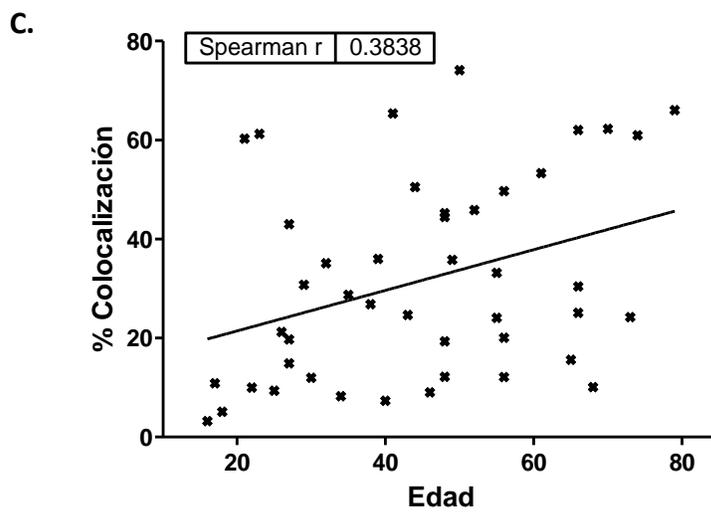
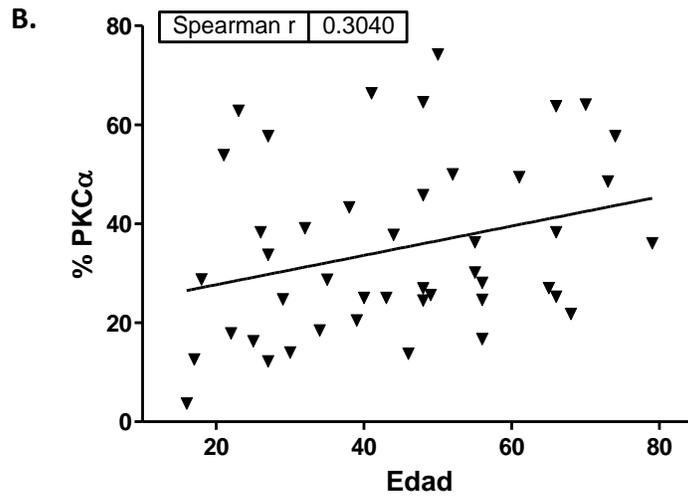
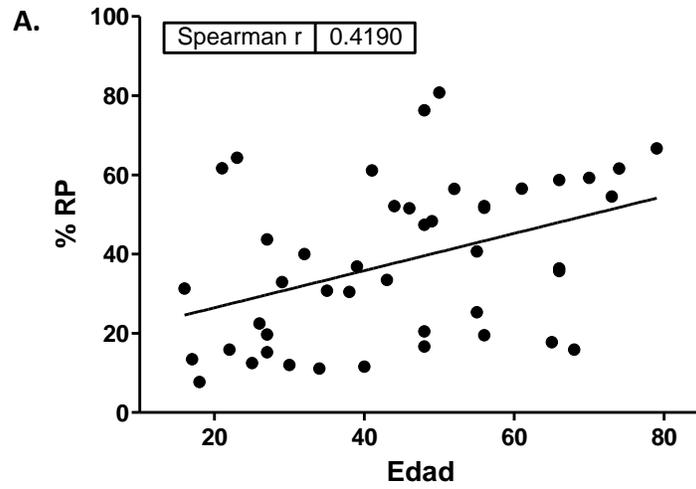


Figura 9. No existe correlación entre el % de células positivas para RP, PKC α y su colocalización con respecto a la edad del paciente. Gráficos de correlación entre la edad de diagnóstico de los pacientes contra el porcentaje de células positivas para distintos marcadores. **A.** RP, **B.** PKC α y **C.** el porcentaje de células en las que colocaliza la marca del RP/PKC α .

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la fosforilación del RP es crucial para la activación de distintas cascadas de señalización, el residuo Ser400 puede ser fosforilado por la PKC α y así aumentar la capacidad de proliferación e invasión de líneas celulares provenientes de glioblastomas. Dado lo anterior, se analizó el % de células positivas para el RP y su colocalización con la PKC α . En la Fig. 10 se muestran campos representativos para cada grado de astrocitomas, con marcaje que corresponde a la tinción de núcleos con Hoechst, la fosforilación del residuo Ser400 del RP, la PKC α y el sobrelape de los canales. Posteriormente, se realizó la cuantificación del % de células positivas para pSer400 (Fig. 11A) y para la colocalización de las dos señales pSer400-PKC α (Fig. 11B).

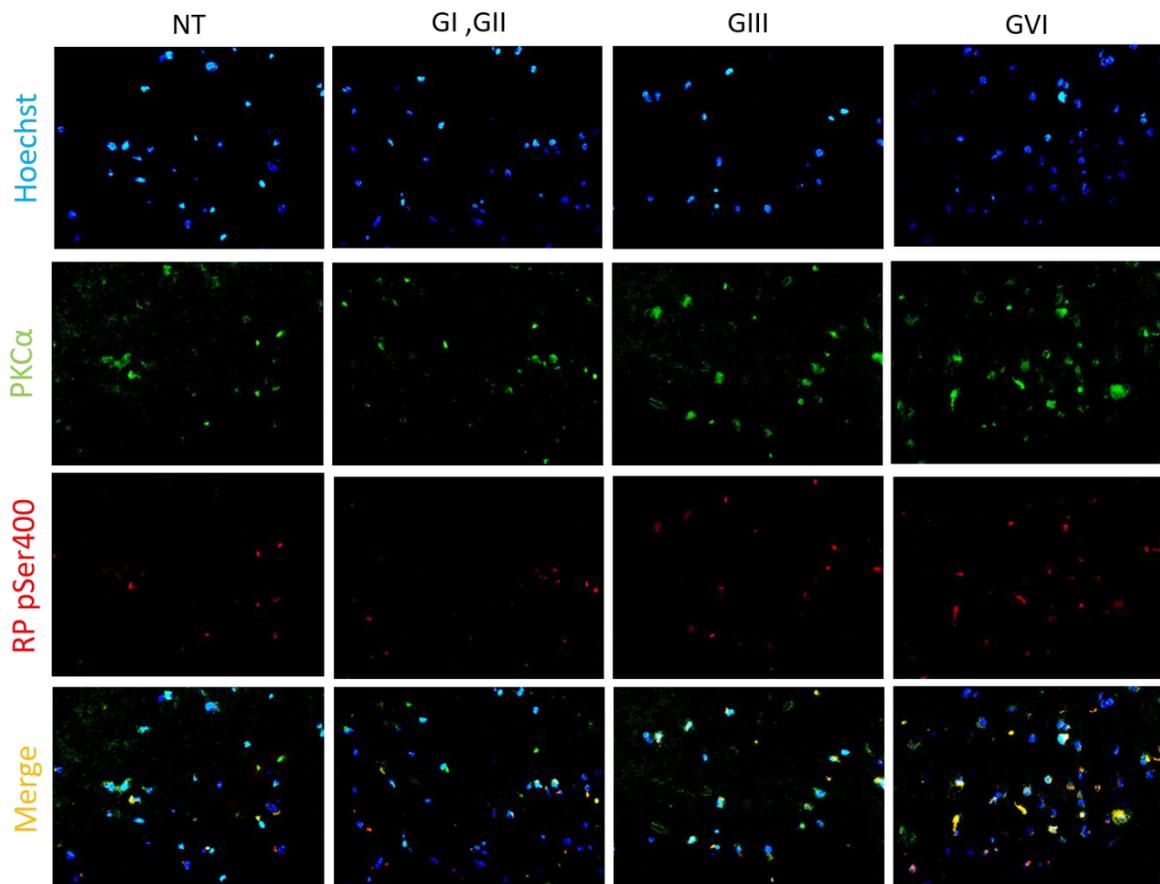


Figura 10. La presencia de la fosforilación en la Ser400 del RP, PKC α y su colocalización aumenta con respecto al grado tumoral en muestras de astrocitomas humanos. Imágenes

representativas de los grupos analizados; NT: No tumoral, Grado I y II, Grado III y Grado IV, en azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst, en verde la marca para PKC α , en rojo la señal dada por el pSer400 del RP y por último se muestra el merge.

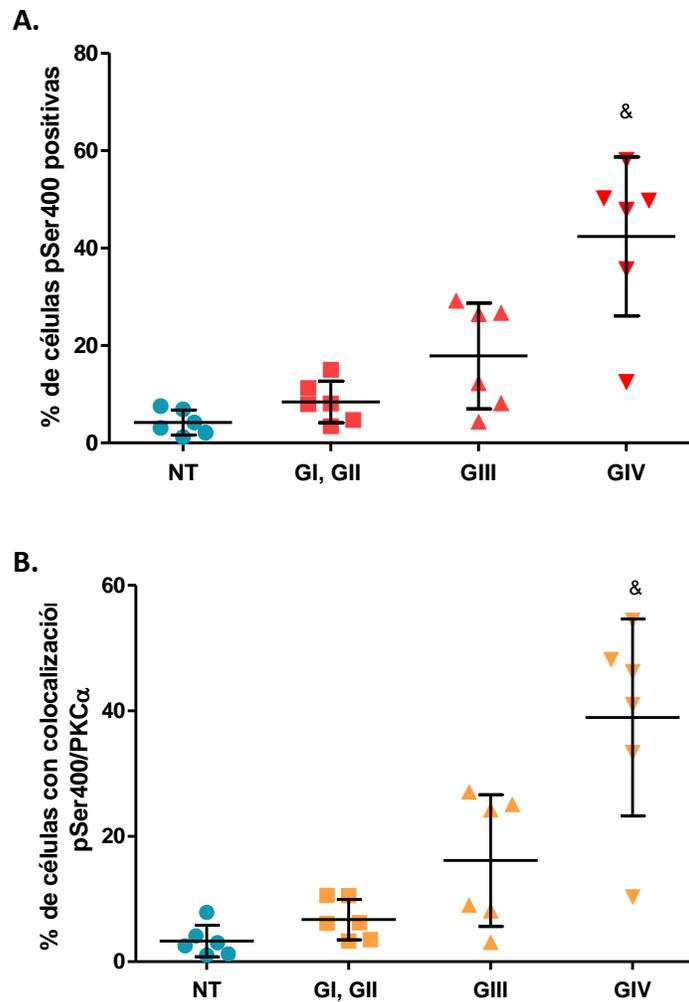
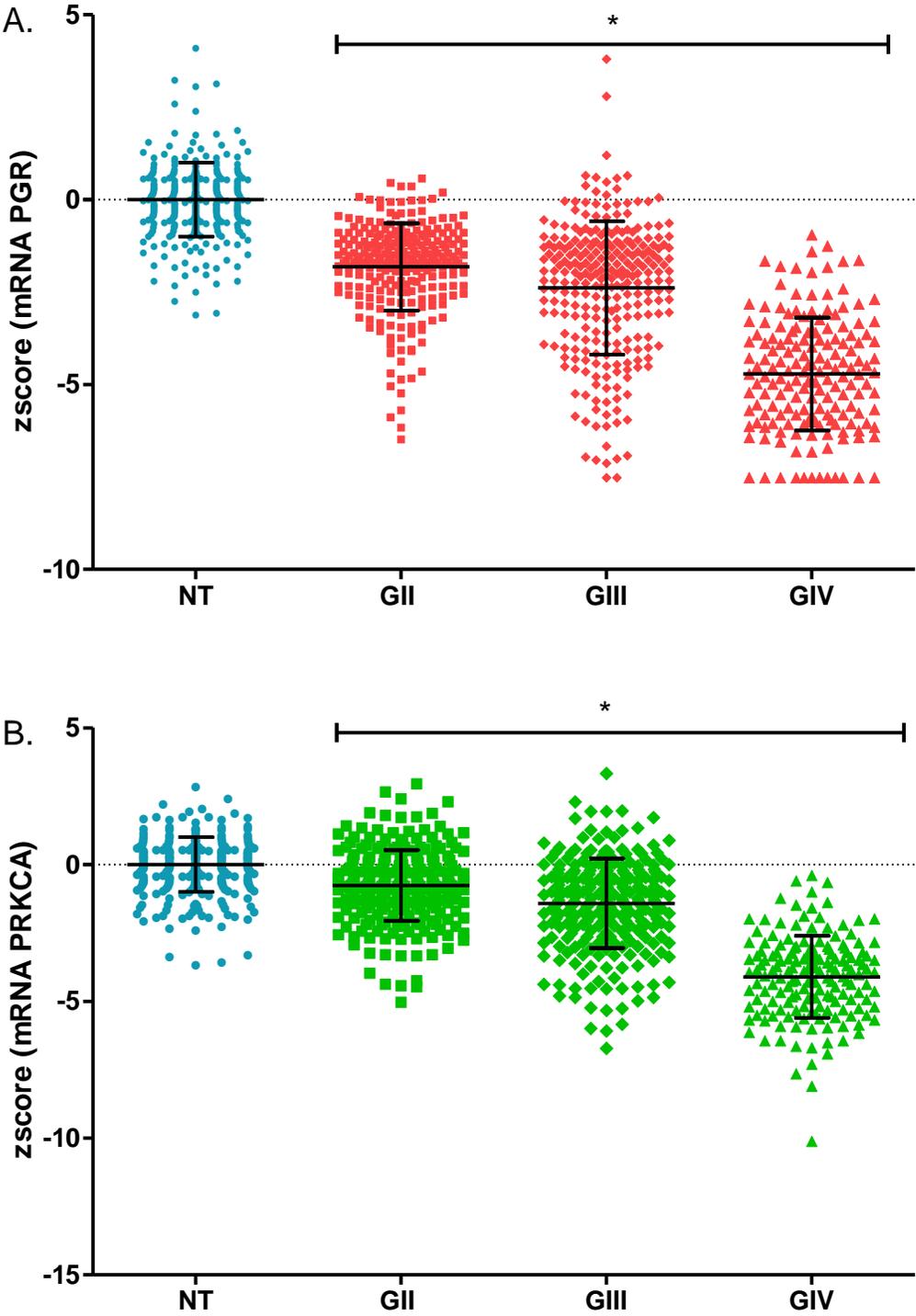


Figura 11. El % de células positivas para el RP pSer400 es mayor en astrocitomas de grado IV con respecto a tejido no tumoral. Porcentaje de células positivas para la **A.** pSer400 del RP, **B.** Merge pSer400/PKC α . Para cada muestra se tomaron 25 campos al azar, las barras representan la media \pm DE & $p \leq 0.05$ vs todos los grupos).

Derivado del análisis *in silico*, interesantemente, observamos en la Fig. 12, que la cantidad de mRNA para *PGR* (A) y *PRKCA* (B) es significativamente menor que el tejido no tumoral y es inversamente proporcional al aumento en el grado tumoral, es decir, a mayor grado tumoral, menor cantidad de mRNA para RP y PKC α . Para éste análisis fue utilizado

el gen *EGFR* como control, ya que es bien sabido, que éste gen presenta un aumento a nivel de mRNA que correlaciona con el grado tumoral [74] (Fig. 12C).



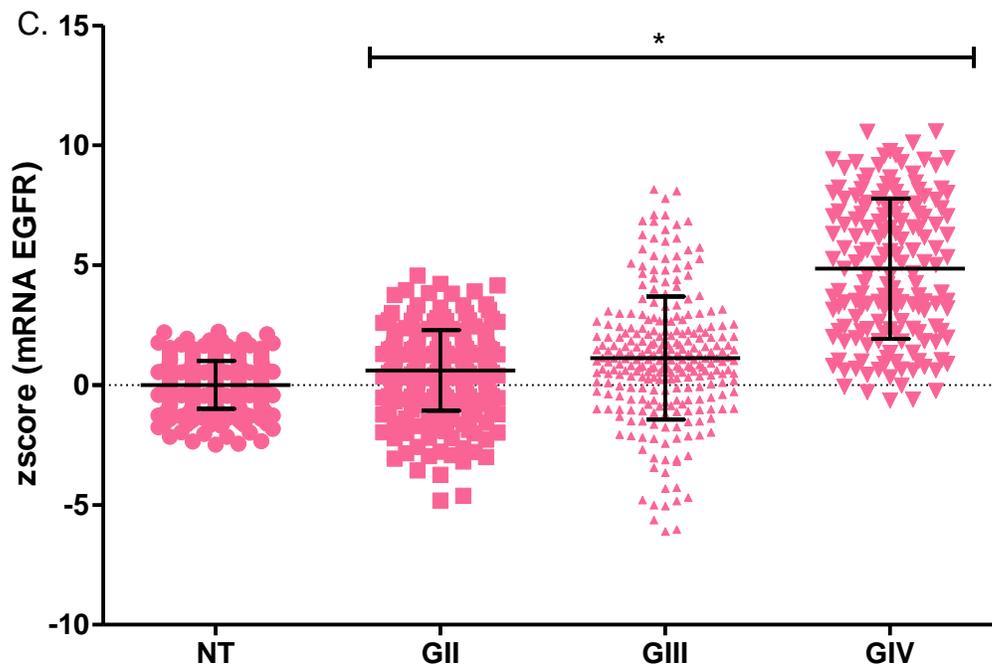
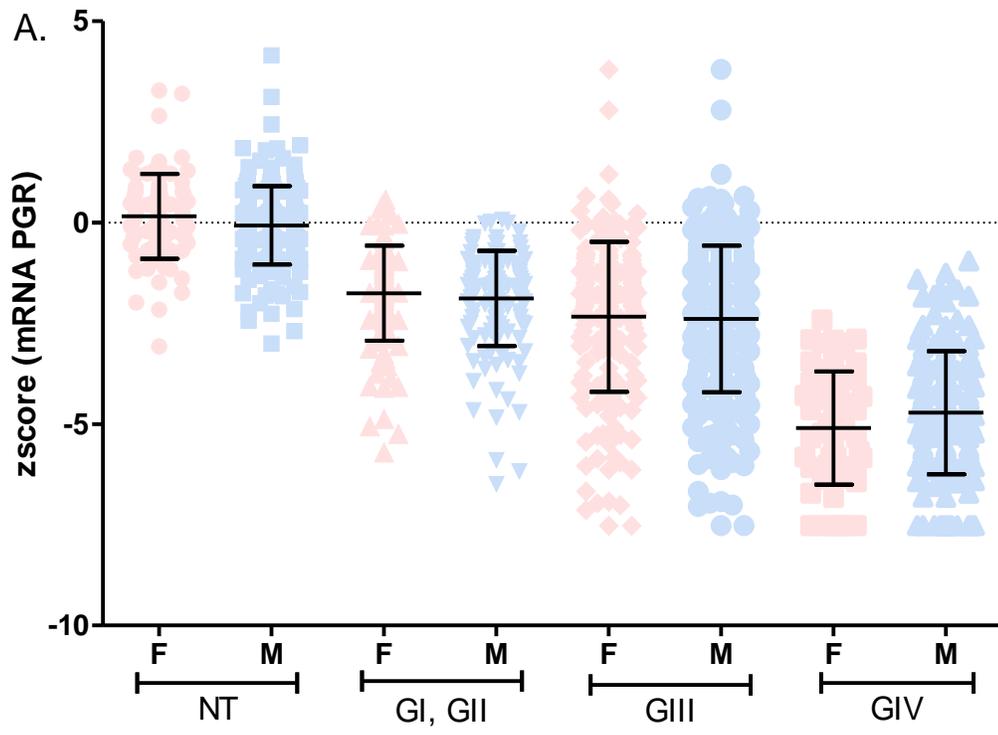


Figura 12. La cantidad de mRNA para *PGR* y *PRKCA* es menor en astrocitomas de grado I-IV con respecto a tejido no tumoral. Análisis *in silico* a nivel de mRNA para los genes **A.** *PGR*, **B.** *PRKCA* y como control positivo se utilizó a **C.** *EGFR*. NT: Tejido no tumoral (datos provenientes de GTEX), GII: Astrocitoma grado 2, GIII: Astrocitoma grado 3, GIV: Glioblastoma (datos tomados de TCGA), las barras representan la media \pm DE (* $p \leq 0.005$ NT).

Posteriormente, dentro del análisis *in silico*, se realizó la separación de datos de acuerdo con el sexo del paciente, para comprobar si estas diferencias en el mRNA son diferentes entre sexos, interesantemente, observamos en la Fig. 13, que la cantidad de mRNA para *PGR* (A) y *PRKCA* (B) no presenta diferencias entre sexos comparándolo con el mismo grado.



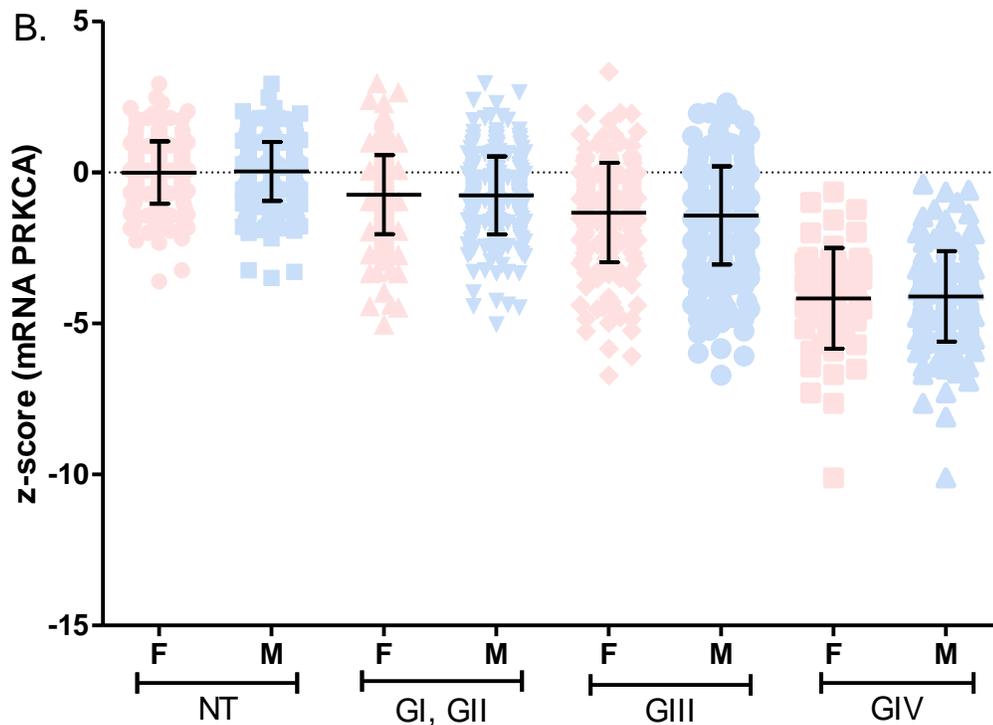


Figura 13. No existen diferencias a nivel de mRNA para los genes *PGR* y *PRKCA* entre sexos en astrocitomas de grados I-IV. Análisis *in silico* a nivel de mRNA para los genes A. *PGR*, B. *PRKCA*. NT: Tejido no tumoral (datos provenientes de GTEX), GI: Astrocitoma grado 2, GII: Astrocitoma grado 3, GIV: Glioblastoma (datos tomados de TCGA).

9. Discusión

La regulación de las proteínas mediante modificaciones post-traduccionales es un mecanismo fundamental para la activación o inactivación de las mismas, tal es el caso del receptor a progesterona (RP), un factor de transcripción que puede activarse al ser fosforilado por la PKC α en el sitio Ser400, en células provenientes de glioblastomas humanos [71]. En este trabajo pudimos detectar la presencia del RP, de la PKC α así como el solapamiento de ambas proteínas en 46 biopsias de pacientes con astrocitomas grado I-IV, interesantemente, observamos que el porcentaje de células positivas para el RP total y fosforilado en Ser400, la PKC α y su colocalización correlaciona positivamente con el grado tumoral. Estos datos sugieren que tanto el RP ya sea en su forma total o fosforilada en el sitio Ser400 y la PKC α , podrían ser consideradas como posibles biomarcadores de malignidad o de progresión para astrocitomas grados I-IV. El análisis de la presencia de

estas proteínas es importante debido a que forman parte de cascadas de señalización que impactan en el número de células, tal es el caso de la PKC α que puede ser activada por LPA₁ (el receptor del fosfolípido de membrana LPA) que se encuentra acoplado a proteínas de tipo G α q, que son capaces de activar a PKC α ; se ha observado que tanto el ácido lisofosfatídico (LPA) como el receptor 1 se encuentran sobreexpresados en líneas celulares de glioblastoma [75], lo que podría sugerir un aumento en la activación de PKC α . La activación de esta enzima conlleva a un aumento en la actividad transcripcional del RP [10] que regula genes involucrados en la proliferación, migración e invasión [68], [76]. En este trabajo, se analizó también la presencia de la fosforilación en el sitio de la Ser400 del RP para evaluar su activación por PKC α [71]; en este caso, encontramos que tanto la fosforilación como el sobrelape de la marca para pSer400 y de la PKC α aumentan con respecto al grado tumoral, lo que nos sugiere que la PKC α , al encontrarse en el mismo compartimento celular que el RP, puede ser la responsable del aumento en la fosforilación del sitio Ser400 del receptor generando un aumento en su actividad transcripcional [10], [67], [71]. Por otro lado, analizamos la influencia del sexo sobre la presencia del RP, de la PKC α así como el sobrelape y observamos que las diferencias no son dependientes del sexo del paciente.

Actualmente se han propuesto sitios de fosforilación como biomarcadores tumorales, un ejemplo de esto es la fosforilación en el sitio Ser294 del RP que se ha propuesto como factor pronóstico en cáncer de mama ya que se asoció a un mal pronóstico debido a que mantiene el fenotipo de células madre y coopera con vías de señalización activadas por factores de crecimiento, con base en ello se sugiere el uso de terapias con antiestrógenos para evitar recurrencia en pacientes que presenten un alto contenido de RP pSer294 [77].

De manera interesante, pudimos observar que a nivel de mRNA la expresión del *PGR* y de *PRKCA* disminuye a medida que incrementa el grado de malignidad de los astrocitomas; lo anterior puede deberse a alteraciones a nivel de la traducción del mRNA [78]. Las diferencias entre la abundancia de mRNA y los niveles de proteína no tienen concordancia en la mayoría de los casos [79], en adenocarcinoma de pulmón se encontró, que incluso las diferentes isoformas de una proteína, presentan diferente coeficiente de correlación mRNA/proteína [80]. En pacientes con adenocarcinoma de pulmón, se han sugerido varios mecanismos que pueden modificar la transcripción a nivel de mRNA, tales son: la alteración de las secuencias de Kozak, la polarización de los codones, la iniciación

en un codón diferente a AUG, lecturas sin sentido, o incluso estas variaciones podrían ser atribuidas a los métodos de cuantificación como son: el tiempo de vida media del RNA, la temperatura [78].

En el caso del glioblastoma, anteriormente, se han descrito irregularidades entre el transcriptoma y el proteoma de muestras provenientes del mismo paciente, tal es el caso de la sinapsina 1 (*SYN1*), relacionada con comunicación celular, se encontró que a nivel de mRNA se encuentra subexpresada, mientras que a nivel de proteína resultó sobreexpresada [78]. En otro estudio se realizó el perfil de proteínas para ocho pacientes con glioblastoma comparado con sus respectivos tejidos no tumorales, posteriormente evaluaron la relación con su mRNA y observaron que únicamente el 2% de las proteínas correlacionan con su respectivo mRNA [81], sin embargo, hasta el momento no existían datos para *PGR* ni para *PRKCA*.

Otra modificación post-traducciona importante es la ubiquitinación, señal que marca a la proteína para la degradación por proteosoma [82]. El sistema ubiquitina proteosoma (UPS: *Ubiquitin Proteasome System*) está compuesto por tres enzimas principales, E1 (enzima activadora de ubiquitina), E2 (enzimas conjugadas de ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasas) que unen la proteína ubiquitina en residuos de lisina del sustrato que será reconocido y degradado por el proteosoma [83]. El RP se somete a degradación por proteosoma a través de la vía ubiquitina-proteosoma, esto mediante la fosforilación del sitio Ser294 que señala al RP para ubiquitinación y su posterior degradación por la subunidad 26S del proteosoma [53]. Se ha observado que la ubiquitina ligasa E3 (UBE3C) se encuentra sobre expresada en tejidos de glioma en comparación con los tejidos no tumorales adyacentes, interesantemente, ésta ubiquitina es capaz de interactuar físicamente con el gen supresor de tumores anexina 7 (*ANXA7*) lo que conlleva a su degradación y por lo tanto una reducción en la expresión de la proteína ANXA7 en tejidos de glioma, impactando en un aumento en la proliferación de células tumorales [82].

La poliubiquitinación del RP lo marca para degradación, sin embargo, paradójicamente, la regulación negativa de los receptores es una señal para acelerar el ciclo de activación y desactivación de los receptores de los complejos de pre-iniciación para la transcripción activa, incluso, se ha observado que la inhibición de la actividad del proteosoma previene la degradación del RP y suprime la transcripción dependiente del receptor [84]. Al igual que otros factores de transcripción, la degradación del RP está estrechamente relacionada con una alta actividad, además de influir en otros factores

críticos para la actividad transcripcional, incluyendo el reclutamiento de la RNA polimerasa II hacia los promotores [85].

A diferencia de la ubiquitinación, la SUMOilación desempeña funciones en la estabilización de proteínas, localización subcelular, translocación nuclear y modulación de la actividad transcripcional (generalmente inhibición) [77], en tumores astrocíticos se identificó un aumento en las proteínas SUMO-1 y SUMO-2/3 hasta de 30 veces más en muestras de pacientes con GBM [86], interesantemente, los niveles de estas proteínas correlacionaron con el grado de malignidad de los astrocitomas, siendo menor para grado II y grado III [87], con esto, se puede sugerir que las proteínas responsables de la SUMOilación podrían estar estabilizando al RP y de esta forma evitar su degradación por proteosoma, generando una diferencia considerable entre la cantidad de mRNA *PGR* y de proteína presente en muestras de pacientes con astrocitomas.

Lo descrito en este estudio resulta de gran importancia debido a que se puede proponer diversas funciones para las proteínas RP y PKC α pudiendo ser utilizadas como: biomarcadores de malignidad o bien, continuar con los estudios para poder ser sugeridos como blancos terapéuticos ya que ambas proteínas juegan un papel muy importante en la proliferación de células de glioblastoma.

10. Conclusiones

- ✓ El contenido de RP total y fosforilado en el residuo S400, así como de PKC α y la colocalización de ambos aumenta con respecto al grado de malignidad del tumor.
- ✓ El contenido de RP total y fosforilado en el residuo S400, así como de PKC α y la colocalización de ambos PKC α no es diferente entre hombres y mujeres.
- ✓ Existe una correlación positiva entre el grado de malignidad de los astrocitomas y el contenido del RP total y fosforilado en el residuo S400, así como de PKC α y la colocalización de ambos.
- ✓ No existe correlación entre el contenido de RP total y fosforilado en el residuo S400, así como de PKC α y la colocalización de ambos con la edad del paciente.
- ✓ Para *PGR* y *PRKCA* se observa una disminución a nivel de mRNA en pacientes con astrocitomas con respecto al tejido no tumoral.

- ✓ Existe una correlación inversa entre el nivel de mRNA para *PGR* y *PRKCA* con respecto al grado de malignidad del astrocitoma.

Referencias

- [1] Q. T. Ostrom, H. Gittleman, G. Truitt, A. Boscia, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015," *Neuro. Oncol.*, 2018.
- [2] H. Ohgaki, "Genetic pathways to glioblastomas," *Neuropathology*, vol. 25, no. 1. pp. 1–7, 2005.
- [3] World Health Organization, "International Classification of Diseases for Oncology, 3rd Edition (ICD-O-3)," *Classification of Diseases*, 2015. [Online]. Available: <http://www.who.int/classifications/icd/adaptations/oncology/en/>.
- [4] A. M. Molinaro, J. W. Taylor, J. K. Wiencke, and M. R. Wrensch, "Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 15, no. 7, pp. 405–417, 2019.

- [5] R. Magaña-Maldonado *et al.*, “Immunological Evasion in Glioblastoma,” *BioMed research international*, vol. 2016. p. 7487313, 2016.
- [6] T. Wegman-Ostrosky *et al.*, “Clinical prognostic factors in adults with astrocytoma: Historic cohort,” *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 146, pp. 116–122, 2016.
- [7] L. Germán-Castelán, J. Manjarrez-Marmolejo, A. González-Arenas, M. G. González-Morán, and I. Camacho-Arroyo, “Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [8] C. A. Beck, Y. Zhang, N. L. Weigel, and D. P. Edwards, “Two types of anti-progestins have distinct effects on site-specific phosphorylation of human progesterone receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 2, pp. 1209–1217, 1996.
- [9] G. S. Takimoto, A. R. Hovland, D. M. Tasset, M. Y. Melville, L. Tung, and K. B. Horwitz, “Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 23, pp. 13308–13316, 1996.
- [10] B. Marquina-Sánchez *et al.*, “The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 172, 2017.
- [11] F. B. Furnari *et al.*, “Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment,” *Genes and Development*, vol. 21, no. 21. pp. 2683–2710, 2007.
- [12] M. L. Bondy *et al.*, “Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium,” *Cancer*, vol. 113, no. 7. pp. 1953–1968, 2008.
- [13] Q. T. Ostrom, H. Gittleman, G. Truitt, A. Boscia, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, “CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015,” *Neuro-Oncology*. 2018.
- [14] N. G. Burnet *et al.*, “High grade glioma: Imaging combined with pathological grade defines management and predicts prognosis,” *Radiother. Oncol.*, vol. 85, no. 3, pp. 371–378, 2007.
- [15] CBTRUS; Central Brain Tumor Registry of the USA Hisdale, “CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the

United States in 2004-2007," *CBTRUS Stat. Rep.*, 2011.

- [16] M. E. Tyburczy and B. Kaminska, *Subependymal Giant Cell Astrocytoma: Gene Expression Profiling*, vol. 5. 2012.
- [17] A. D. Norden, J. Drappatz, and P. Y. Wen, "Malignant gliomas in adults," *Blue Books Neurol.*, vol. 36, pp. 99–120, 2010.
- [18] S. A. Grimm and M. C. Chamberlain, "Anaplastic astrocytoma," *CNS oncology*. 2016.
- [19] R. Stupp *et al.*, "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma," *N. Engl. J. Med.*, pp. 987–96, 2005.
- [20] K. B. Peters, "Revisiting anti-angiogenic therapy for recurrent glioblastoma," *Transl. Cancer Res. Publ. Ahead Print*, 2019.
- [21] C. J. Farrell and S. R. Plotkin, "Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes," *Neurologic Clinics*, vol. 25, no. 4. pp. 925–946, 2007.
- [22] J. C. Tonn, M. Westphal, J. T. Rutka, and S. A. Grossman, *Neuro-Oncology of CNS tumors*. 2006.
- [23] F. J. Wippold, M. Lämmle, F. Anatelli, J. Lennerz, and A. Perry, "Neuropathology for the neuroradiologist: Palisades and pseudopalisades," *American Journal of Neuroradiology*, vol. 27, no. 10. pp. 2037–2041, 2006.
- [24] C. S. Jung *et al.*, "Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme," *Brain*, vol. 130, no. 12, pp. 3336–3341, 2007.
- [25] I. Camby *et al.*, "Supratentorial Pilocytic Astrocytomas, Astrocytomas, Anaplastic Astrocytomas and Glioblastomas are Characterized by a Differential Expression of S100 Proteins," *Brain Pathol.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–19, 2006.
- [26] R. a Morantz, I. Feigin, and J. Ransohoff, "Clinical and pathological study of 24 cases of gliosarcoma.," *J. Neurosurg.*, vol. 45, no. 4, pp. 398–408, 1976.
- [27] R. G. W. Verhaak *et al.*, "Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1," *Cancer Cell*, 2010.

- [28] F. D'Angelo *et al.*, "The molecular landscape of glioma in patients with Neurofibromatosis 1," *Nat. Med.*, 2019.
- [29] J. FUKAI, H. NISHIBAYASHI, Y. UEMATSU, Y. KANEMURA, K. FUJITA, and N. NAKAO, "Rapid regression of glioblastoma following carmustine wafer implantation: A case report," *Mol. Clin. Oncol.*, 2016.
- [30] "Recomendaciones institucionales ISSSTE en el tratamiento multidisciplinario de los gliomas de alto grado," *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas*, 2017.
- [31] A. A. Rehman, K. B. Elmore, and T. A. Mattei, "The effects of alternating electric fields in glioblastoma: Current evidence on therapeutic mechanisms and clinical outcomes," *Neurosurg. Focus*, 2015.
- [32] E. T. Wong, E. Lok, and K. D. Swanson, "Alternating Electric Fields Therapy for Malignant Gliomas: From Bench Observation to Clinical Reality," *Prog. Neurol. Surg.*, 2018.
- [33] D. Dubinski *et al.*, "Controversial roles for dexamethasone in glioblastoma – Opportunities for novel vascular targeting therapies," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2019.
- [34] H. Escriva, S. Bertrand, and V. Laudet, "The evolution of the nuclear receptor superfamily," *Essays Biochem*, vol. 40, pp. 11–26, 2004.
- [35] I. J. McEwan, "Nuclear receptors: one big family.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 505, pp. 3–18, 2009.
- [36] M. Camacho-arroyo, Ignacio; Rodriguez-Dorantes, "Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms," *Mol. Endocrinol.*, vol. 661, no. 2, pp. 25–38, 2006.
- [37] D. P. Edwards, "The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2000.
- [38] C.-M. E. and H.-H. O.T., "Role of progesterone in human astrocytomas growth," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 13, pp. 1663–1667, 2011.
- [39] P. Kastner *et al.*, "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts

encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B.," *EMBO J.*, vol. 9, no. 5, pp. 1603–14, 1990.

- [40] S. K. Mani and B. W. O'Malley, "Mechanism of progesterone receptor action in the brain," in *Hormones, Brain and Behavior Online*, 2010, pp. 1467–1504.
- [41] M. E. Meyer, C. Quirin-Stricker, T. Lerouge, M. T. Bocquel, and H. Gronemeyer, "A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 15, pp. 10882–7, 1992.
- [42] P. H. Giangrande, G. Pollio, and D. P. McDonnell, "Mapping and Characterization of the Functional Domains Responsible for the Differential Activity of the A and B Isoforms of the Human Progesterone Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 52, pp. 32889–32900, 1997.
- [43] P. H. Giangrande, E. A. Kimbrel, D. P. Edwards, and D. P. McDonnell, "The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. 3102–15, 2000.
- [44] X. Li, D. M. Lonard, and B. W. O'Malley, "A contemporary understanding of progesterone receptor function," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 125, no. 10-11 SPEC. ISS. pp. 669–678, 2004.
- [45] B. M. Jacobsen and K. B. Horwitz, "Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 357, no. 1–2. pp. 18–29, 2012.
- [46] M. D. Aupperlee, K. T. Smith, A. Kariagina, and S. Z. Haslam, "Progesterone receptor isoforms A and B: Temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development," *Endocrinology*, vol. 146, no. 8, pp. 3577–3588, 2005.
- [47] G. González-Agüero, R. Ondarza, A. Gamboa-Domínguez, M. A. Cerbón, and I. Camacho-Arroyo, "Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas," *Brain Res. Bull.*, 2001.
- [48] C. R. Hagan, A. R. Daniel, G. E. Dressing, and C. A. Lange, "Role of

phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 357, no. 1–2, pp. 43–49, 2012.

- [49] M. Qiu and C. A. Lange, "MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: Degradation, transcriptional synergy, and nuclear association," in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 85, no. 2–5, pp. 147–157.
- [50] Y. Zhang, C. A. Beck, A. Poletti, D. P. Edwards, and N. L. Weigel, "Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 49, pp. 31034–31040, 1994.
- [51] Y. Zhang *et al.*, "Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 11, no. 6, pp. 823–32, 1997.
- [52] T. A. Knotts, R. S. Orkiszewski, R. G. Cook, D. P. Edwards, and N. L. Weigel, "Identification of a Phosphorylation Site in the Hinge Region of the Human Progesterone Receptor and Additional Amino-terminal Phosphorylation Sites," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 8475–8483, 2001.
- [53] C. A. Lange, T. Shen, and K. B. Horwitz, "Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 3, pp. 1032–7, 2000.
- [54] "Nuclear receptors," *British Journal of Pharmacology*. 2009.
- [55] L. K. Pierson-Mullany and C. A. Lange, "Phosphorylation of Progesterone Receptor Serine 400 Mediates Ligand-Independent Transcriptional Activity in Response to Activation of Cyclin-Dependent Protein Kinase 2," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 24, pp. 10542–10557, 2004.
- [56] S. F. Steinberg, "Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function," *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 4, pp. 1341–1378, 2008.
- [57] G. Martiny-Baron and D. Fabbro, "Classical PKC isoforms in cancer," *Pharmacol. Res.*, vol. 55, no. 6, pp. 477–486, 2007.

- [58] R. Mandil *et al.*, "Protein kinase C α and protein kinase C δ play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 11, pp. 4612–4619, 2001.
- [59] A. C. Newton, "Protein kinase C: poised to signal," *AJP Endocrinol. Metab.*, vol. 298, no. 3, pp. E395–E402, 2010.
- [60] C. Graybill, B. Wee, S. X. Atwood, and K. E. Prehoda, "Partitioning-defective protein 6 (Par-6) activates atypical protein kinase C (aPKC) by pseudosubstrate displacement," *J. Biol. Chem.*, 2012.
- [61] S. Nakashima, "Protein kinase C α (PKC α): regulation and biological function," *J. Biochem.*, vol. 132, no. 5, pp. 669–675, 2002.
- [62] D. C. Schönwasser, R. M. Marais, C. J. Marshall, and P. J. Parker, "Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 790–798, 1998.
- [63] P. P. Ruvolo, X. Deng, B. K. Carr, and W. S. May, "A functional role for mitochondrial protein kinase C α in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 39, pp. 25436–25442, 1998.
- [64] H. Khalid, S. Shibata, M. Kishikawa, A. Yasunaga, M. Iseki, and T. Hiura, "Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors," *Cancer*, vol. 80, no. 11, pp. 2133–2140, 1997.
- [65] M. Assimakopoulou, G. Sotiropoulou-Bonikou, T. Maraziotis, and J. Varakis, "Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors?," *Clin. Neuropathol.*, vol. 17, no. 1, pp. 27–34, 1998.
- [66] G. González-Agüero *et al.*, "Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines," *Endocrine*, vol. 32, no. 2, pp. 129–135, 2007.
- [67] O. T. Hernández-Hernández, T. K. González-García, and I. Camacho-Arroyo, "Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 132, no. 1–2, pp. 127–134, 2012.
- [68] A. González-Arenas, P. Valadez-Cosmes, C. Jiménez-Arellano, M. López-Sánchez,

- and I. Camacho-Arroyo, "Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 144, no. PB, pp. 463–470, 2014.
- [69] A. J. Cameron, K. J. Procyk, M. Leitges, and P. J. Parker, "PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival," *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 4, pp. 769–779, 2008.
- [70] J.-H. Kang, "Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer," *New J. Sci.*, vol. 2014, pp. 1–36, 2014.
- [71] A. González-Arenas *et al.*, "Pkc α and pkc δ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells," *Endocrinology*, vol. 156, no. 3, pp. 1010–1022, 2015.
- [72] S. A. Grossman *et al.*, "Efficacy and toxicity of the antisense oligonucleotide aprinocarsen directed against protein kinase C- α delivered as a 21-day continuous intravenous infusion in patients with recurrent high-grade astrocytomas," *Neuro. Oncol.*, 2005.
- [73] J. C. Villegas-Pineda *et al.*, "Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 211, no. 12, pp. 973–981, 2015.
- [74] V. T. Puliappadamba, K. J. Hatanpaa, S. Chakraborty, and A. A. Habib, "The role of NF- κ B in the pathogenesis of glioma," *Mol. Cell. Oncol.*, 2014.
- [75] S. A. Valdés-Rives, M. de la Fuente-Granada, M. A. Velasco-Velázquez, O. González-Flores, and A. González-Arenas, "LPA 1 receptor activation induces PKC α nuclear translocation in glioblastoma cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2019.
- [76] O. T. Hernández-Hernández and I. Camacho-Arroyo, "Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF.," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 13, no. 5, pp. 635–42, 2013.
- [77] T. P. Knutson *et al.*, "Posttranslationally modified progesterone receptors direct ligand-specific expression of breast cancer stem cell-associated gene programs," *J. Hematol. Oncol.*, 2017.
- [78] J.-M. Lemée *et al.*, "Integration of transcriptome and proteome profiles in

glioblastoma: looking for the missing link," *BMC Mol. Biol.*, vol. 19, no. 1, p. 13, 2018.

- [79] T. Maier, M. Güell, and L. Serrano, "Correlation of mRNA and protein in complex biological samples," *FEBS Letters*. 2009.
- [80] G. Chen *et al.*, "Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.," *Mol. Cell. Proteomics*, 2002.
- [81] Y. C. Song *et al.*, "Proteogenomic characterization and integrative analysis of glioblastoma multiforme," *Oncotarget*, 2017.
- [82] S. J. Pan *et al.*, "Ubiquitin-protein ligase E3C promotes glioma progression by mediating the ubiquitination and degrading of Annexin A7," *Sci. Rep.*, 2015.
- [83] I. A. Voutsadakis, "Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells," *Tumor Biology*. 2017.
- [84] A. P. Dennis, D. M. Lonard, Z. Nawaz, and B. W. O'Malley, "Inhibition of the 26S proteasome blocks progesterone receptor-dependent transcription through failed recruitment of RNA polymerase II," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005.
- [85] H. A. Abdel-Hafiz and K. B. Horwitz, "Post-translational modifications of the progesterone receptors," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014.
- [86] B. M. Fox *et al.*, "SUMOylation in glioblastoma: A novel therapeutic target," *Int. J. Mol. Sci.*, 2019.
- [87] W. Yang *et al.*, "Small ubiquitin-like modifier 1–3 is activated in human astrocytic brain tumors and is required for glioblastoma cell survival," *Cancer Sci.*, vol. 104, no. 1, pp. 70–77, Jan. 2013.