



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“Efecto de la progesterona sobre el perfil de expresión de miRNAs en células derivadas de glioblastomas humanos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Diana Elisa Velázquez Vázquez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes  
Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Dr. Eduardo Martínez Martínez  
Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Ciudad de México. Agosto, 2020



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**

El trabajo de esta tesis fue realizado en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana del Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección y el apoyo del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Gracias al comité tutor, conformado por los Dres. Mauricio Rodríguez Dorantes y Eduardo Martínez Martínez, por su apoyo y asesoramiento a lo largo del desarrollo de este trabajo. A los sinodales por el tiempo que dedicaron a la revisión y corrección la presente tesis.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado, el cual me permitió dedicarme de tiempo completo a mis estudios de maestría y al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) por financiar mi asistencia al III Congreso de Neurobiología en Guanajuato, Gto,

Gracias a mis padres, Mónica Vázquez Nolasco y Alejandro Velázquez Sánchez y a mis hermanitos Alejandro, Karina y Andrea por su apoyo y cariño incondicional.

## CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	4
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.1.	Gliomas.....	5
2.1.1.	Glioblastoma multiforme (GBM). ....	6
2.2.	Mecanismos de acción de la progesterona (P4). ....	9
2.3.	microRNAs (miRNAs). ....	11
2.3.1.	Biogénesis y función de los miRNAs. ....	12
3.	ANTECEDENTES.....	14
3.1.	Efecto de la P4 en la malignidad de los glioblastomas (GBMs). ....	14
3.2.	Los miRNAs en el cáncer.....	15
3.2.1.	Identificación y función de miRNAs en glioblastomas. ....	17
3.3.	Regulación de miRNAs por P4. ....	18
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5.	HIPÓTESIS.....	20
6.	OBJETIVO GENERAL.....	21
7.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
8.1.	Cultivos celulares.....	21
8.2.	Tratamientos. ....	22
8.3.	Extracción de RNA. ....	22
8.4.	Microarreglos. ....	22
8.5.	Análisis de expresión diferencial de los datos de microarreglos. ....	23
8.6.	Análisis bioinformático para la notación funcional de genes. ....	23
8.7.	Análisis de la red de interacción proteína-proteína (PPI). ....	24
8.8.	Análisis estadístico. ....	24
9.	RESULTADOS.....	25
9.1.	Identificación de los miRNAs expresados diferencialmente en células U251. ....	25
9.2.	Anotación funcional GO y análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los miRNAs regulados por P4. ....	28
9.3.	Selección de genes hub. ....	31
10.	DISCUSIÓN.....	36
11.	CONCLUSIÓN.....	40
12.	REFERENCIAS.....	40

## 1. RESUMEN.

Los glioblastomas (GBMs) son los tumores cerebrales más frecuentes y malignos en el ser humano. Se ha reportado que la progesterona (P4) induce la progresión de los GBMs al modificar la expresión de genes que promueven la proliferación, migración e invasión. Es posible que la P4 medie estos efectos, en parte, a través de modificar el perfil de expresión de microRNAs (miRNAs) que se sabe juegan un papel fundamental en la progresión tumoral. Se trataron células U251 derivadas de GBMs humanos por 6 h con P4, RU486 (un antagonista del receptor intracelular a P4), el tratamiento combinado (P4+RU486), y ciclodextrina (vehículo), se extrajo el RNA y se realizó un análisis de microarreglos de miRNAs. El análisis de expresión reveló un set de 190 miRNAs con abundancia diferencial en los tratamientos con P4, RU486 y P4+RU486 respecto al vehículo; 16 de estos miRNAs fueron regulados exclusivamente por P4; los miRNAs con una mayor tasa de cambio fueron: hsa-miR-6068 (-2.18), hsa-miR-5739 (-1.81), hsa-miR-1244 (3.56) y hsa-miR-4750-5p (2.05). Los sets de genes blanco de los miRNAs regulados por P4 están involucrados en la regulación del ciclo celular, la proliferación y la migración en células de GBMs, contribuyendo de esta manera a su malignidad. Este trabajo documentó por primera vez los cambios globales en el perfil de expresión de miRNAs en células de GBM tratadas con P4.

## 2. INTRODUCCIÓN.

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) abarcan aproximadamente el 20% y el 30% de las muertes por cáncer en adultos jóvenes y niños, respectivamente<sup>1</sup>. Los tumores más comunes del SNC son los gliomas y representan el 27.2% de los tumores cerebrales primarios y el 81.3% de los tumores malignos<sup>2,3</sup>. De todos los gliomas, el 76.4% corresponde a los astrocitomas, el tipo de glioma más frecuente.

El astrocitoma grado IV o glioblastoma multiforme (GBMs) es el glioma más frecuente (57.3% de todos los gliomas) y maligno del SNC, es más común en adultos y la frecuencia de aparición entre hombres y mujeres es de 3:2.

Dada esta relación de incidencia entre hombres y mujeres, se ha considerado que las hormonas sexuales podrían estar involucradas en el desarrollo y progresión de los GBMs. Una de las hormonas sexuales que ha sido evaluada es la progesterona (P4). Esta hormona puede ser sintetizada en el cerebro y de manera particular, se ha visto que estos tumores expresan su receptor intracelular (PR)<sup>4</sup>, por lo que se ha comprobado que la P4 promueve la proliferación, migración e invasión, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los GBMs<sup>5-9</sup>.

Por otra parte, uno de los principales elementos genéticos que regula la tumorigenesis en diferentes tipos de cáncer son los microRNAs (miRNAs)<sup>10</sup>, secuencias de RNA no codificante cortas (18-25 nt), que regulan post-transcripcionalmente la expresión genética<sup>11</sup>. En cánceres de tejidos sensibles a hormonas, está bien establecida la relación que existe entre los miRNAs y las hormonas sexuales, como la P4<sup>12-19</sup>. Aunque el papel de los miRNAs en el desarrollo y la progresión de los GBMs ha sido ampliamente estudiado<sup>20-28</sup>, aún no se ha determinado el efecto de la P4 en el perfil de expresión de miRNAs en GBMs humanos.

### 2.1. Gliomas

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes, representan el 27.2% de los tumores cerebrales primarios y el 81.3% de los tumores malignos<sup>2,3</sup>. Los gliomas son responsables de la mayoría de las muertes por tumores cerebrales

primarios y se cree que surgen a partir de células progenitoras neurogliales, de células gliales o de células troncales cancerosas<sup>29-32</sup>.

Los gliomas se clasifican histológicamente en astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas oligoastrocíticos mixtos o ependimomas, según las similitudes morfológicas con los tipos de células neurogliales encontradas en el cerebro<sup>33</sup>. Los astrocitomas son los más comunes ya que representan el 76.4% de todos los gliomas<sup>3</sup>. La Organización Mundial de la Salud clasificó a los astrocitomas, según sus características histopatológicas en 4 grados de malignidad<sup>3,33</sup>; el grado I es considerado benigno debido a que en general es curable por medio de una resección quirúrgica completa y rara vez evoluciona a lesiones de alto grado. Los astrocitomas de grado II y III son los más comunes en adultos jóvenes y se caracterizan por tener una infiltración difusa en el parénquima cerebral, así como una tendencia inherente a la recurrencia y a una progresión hacia el grado de mayor malignidad. Los astrocitomas de grado IV, o GBMs, son los más frecuentes e invasivos, además de presentar la peor prognosis<sup>2,34</sup>.

### **2.1.1. Glioblastoma multiforme (GBM).**

Los GBMs se componen de células tumorales astrocíticas pleomórficas, pobremente diferenciadas, con marcada atipia celular, incrementada actividad mitótica, significativa anisocariosis (variación en el tamaño de los núcleos) y presencia de focos necróticos<sup>35</sup>.

Una de las características principales de los GBMs es la inestabilidad genómica. Como resultado del Proyecto del Atlas del Genoma del Cáncer<sup>36</sup>, más de 600 genes de 200 muestras de tumores fueron secuenciados, su perfil genómico reveló tres vías de señalización importantes que se encuentran activadas en GBMs: 1) la vía de la proteína tumoral 53 (p53), 2) la vía de señalización del receptor tirosina cinasa/Ras/cinasa 3 fosfoinositido y 3) la vía de retinoblastoma. La activación de estas vías da origen a una proliferación celular descontrolada y a una aumentada supervivencia celular, al mismo tiempo que permite que la célula tumoral escape de los puntos de control del ciclo celular, la senescencia y las vías de apoptosis<sup>37,38</sup>. Las alteraciones genéticas más frecuentes que se encuentran en los GBMs primarios, aquellos que surgen de novo, son la sobre-expresión del

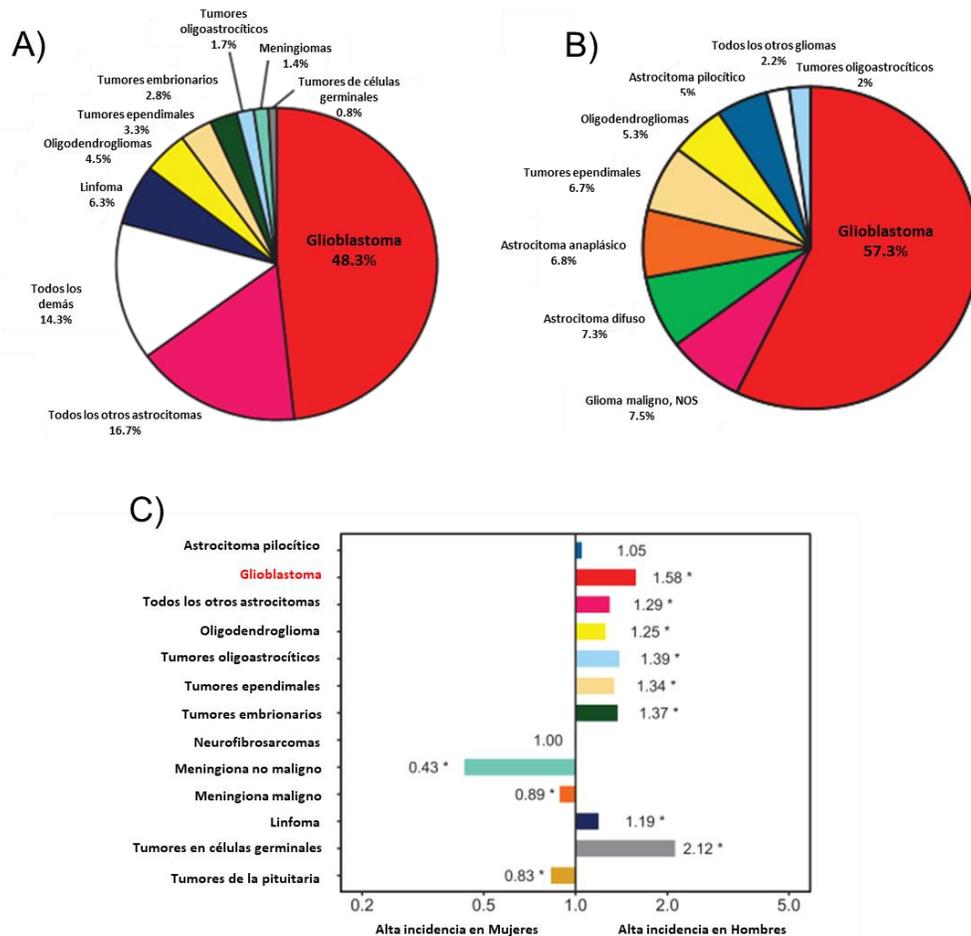
receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mutaciones en fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), deleciones homocigas del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A), pérdida del cromosoma 10q y anomalías en complejos reguladores del ciclo celular como la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y 6 (CDK6), la ciclina D1 (CD1) y retinoblastoma (Rb). En GBMs secundarios, los GBMs que surgen de la progresión de gliomas de grado I, II, III, presentan mutaciones en la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), mutaciones en p53, sobreexpresión del receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), amplificación del receptor tirosina cinasa MET y pérdida del cromosoma 19q<sup>37-40</sup>. Este perfil genómico ha permitido subclasificar a los GBMs en 4 subtipos: clásico, proneural, neural y mesenquimal; cada uno con un patrón diferente de progresión de la enfermedad y supervivencia<sup>41,42</sup>. Aunque los GBMs ocurren casi exclusivamente en el encéfalo, específicamente en la materia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales, también pueden surgir en el tallo cerebral, cerebelo y médula espinal <sup>39</sup>. La naturaleza infiltrante de los GBMs es particularmente notoria por su rápida invasión de las estructuras cerebrales circundantes; sin embargo, a pesar de su rápido crecimiento infiltrante, los GBMs tienden a no invadir el espacio subaracnoideo y al carecer de vasos linfáticos la metástasis vía fluido cerebroespinal, o a través de los vasos linfáticos, es prácticamente improbable. Aunado a esto, la corta vida del paciente contribuye al bajo potencial metastásico de los GBMs <sup>35,43</sup>. Como se mencionó, la historia clínica de los pacientes con GBMs es corta, principalmente porque muy pocos pacientes sobreviven más de un año y solo el 6.8% sobrevive 5 años<sup>3</sup>. Dependiendo de la localización y el nivel de incremento de la presión intracraneal, los signos más comunes son: dolores de cabeza, ataxia, mareos, trastornos de la visión y síncope frecuente <sup>35</sup>.

La etiología de los GBMs no ha sido completamente elucidada pero se han estudiado una serie de factores como la historia familiar, que ha sido observada en el 1% de los casos, así como enfermedades genéticas (esclerosis tuberosa, el síndrome de Turcot y neurofibromatosis), inclusive lesiones en la cabeza como resultado de una contusión cerebral; también se ha estudiado la presencia de

virus, como citomegalovirus humano (HCMV), que presenta tropismo por las células gliales e induce encefalitis congénita y cambios multiorgánicos en adultos inmunocomprometidos, y la exposición a campos electromagnéticos y ciertos metales<sup>35</sup>. Sin embargo, la radiación ionizante (dosis terapéuticas) ha sido el único factor reconocido como un agente causante de gliomas <sup>44</sup>.

El diagnóstico primario de los GBMs se realiza por medio de resonancia magnética y el diagnóstico definitivo se basa en evaluaciones histopatológicas del tumor extirpado intraoperatoriamente, o sus partes, utilizando métodos histológicos, citológicos e histoquímicos <sup>45</sup>. Al infiltrarse en los tejidos circundantes, es imposible su completa resección quirúrgica y la radioterapia no siempre es eficiente. La resección quirúrgica seguida de quimioterapia con Temozolamida, un agente alquilante, que tiene excelente penetración al sistema nervioso central, y la radioterapia son los principales tratamientos contra los GBMs.

De todos los tumores malignos del SNC, los GBMs tienen la incidencia más alta, por sí solos representan el 48.3% (**Figura 1A**) y el 57.3% de todos los gliomas (**Figura 1B**)<sup>3</sup>. Se diagnostican principalmente en adultos mayores de 50 años, pero pueden ocurrir a cualquier edad. Su incidencia es mayor en hombres que en mujeres (**Figura 1C**) y en caucásicos en comparación con otros grupos étnicos. <sup>3</sup>



**Figura 1.** Distribución e incidencia de glioblastomas comparado con otros tumores. A) Distribución de todos los tumores malignos del sistema nervioso central (SNC); B) Distribución de todos los gliomas; C) Tasa de incidencia de tumores del SNC y otros, por sexo (Hombres:Mujeres), Reporte estadístico CBTRUS: NPCR y SEER, 2012-2016. Traducida de Ostrom et al. (2019).

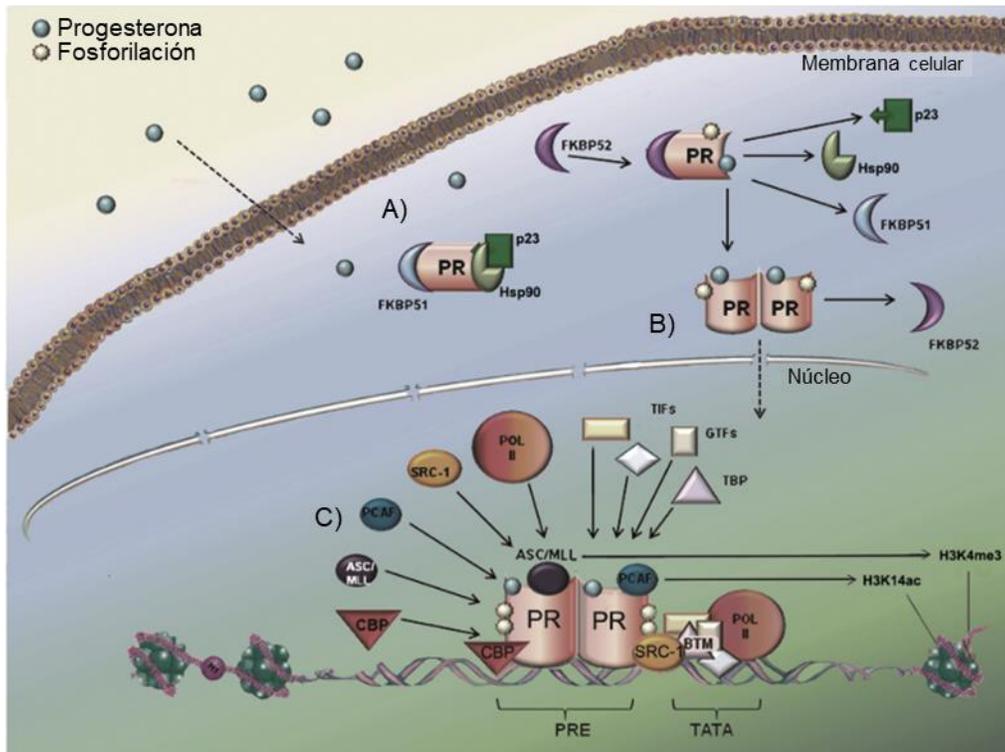
Dada una mayor incidencia de GBMs en hombres que en mujeres y la expresión de receptores a hormonas sexuales encontrada en astrocitomas<sup>4</sup>, se ha considerado que las hormonas sexuales, entre estas la progesterona (P4), tienen un importante papel en el desarrollo del tumor.

## 2.2. Mecanismos de acción de la progesterona (P4).

La progesterona (P4) es una hormona sexual esteroide que se sintetiza y secreta en ovarios, placenta, glándulas adrenales, testículos, cerebro, médula espinal y nervios periféricos; además de ser importante en funciones reproductivas tales

como el mantenimiento del embarazo, la diferenciación sexual y el comportamiento reproductivo, también ha sido reconocida como un factor clave en la regulación del sistema inmune, aprendizaje y memoria, neuroprotección y neurogénesis<sup>46-48</sup>.

La P4 ejerce sus efectos a través de dos mecanismos de acción: el clásico o genómico y el no clásico o no genómico. El mecanismo clásico comprende los efectos a largo plazo modulados por el receptor intracelular a P4 (PR), un factor de transcripción dependiente de ligando. En su forma inactiva se encuentra predominantemente en el citoplasma asociado a un complejo de chaperonas de las cuales se libera luego de su interacción con su ligando (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.A**), una vez libre, se dimeriza con otro PR y se transloca al núcleo en donde puede regular la transcripción(**Figura 2B**). En genes con elementos de respuesta a P4 (PRE), el dímero se une al DNA en donde recluta coactivadores<sup>48,49</sup> (**Figura 2C**); en el caso de genes que carecen de secuencias PRE canónicas en sus promotores, el dímero puede unirse a factores de transcripción como la proteína de especificidad 1 (Sp1) y la proteína activadora 1 (AP1)<sup>50</sup>. El PR presenta dos isoformas: PR-A (94 kD) y PR-B (114 kD), ambas son codificadas por el mismo gen, pero son transcritas a partir de diferentes promotores para generar dos mRNAs.



**Figura 2.** Mecanismo clásico de acción de la P4. PR: Receptor a P4; PRE: Elementos de respuesta a P4. Tomado de Camacho-Arroyo et al. (2017).

Por otra parte, las acciones no genómicas de la P4 son mediadas por receptores a progesterona membranales (mPRs), éstas generalmente son rápidas e independientes de la síntesis de mRNA. Según diversas investigaciones, los mPRs al estar acoplados a proteínas G modifican los niveles intracelulares de AMPc, estimulan la vía PI3K/Akt y activan receptores  $\beta$ -adrenérgicos; también se ha visto que los mPRs pueden interactuar con PR-B para activar la transcripción de genes. Hasta la fecha se han descrito cinco subtipos de mPRs en humanos: mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$ , mPR $\delta$  y mPR $\epsilon$  <sup>6,51-55</sup>.

### 2.3. microRNAs (miRNAs).

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias cortas de RNA no codificantes cuya longitud va de 18 a 25 nucleótidos (nt), regulan a nivel postranscripcional la expresión. El primer miRNA descubierto fue *lin-4*<sup>66</sup>, un regulador clave del desarrollo larval de *C. elegans*, al igual que *let-7*<sup>67</sup>. Posterior al descubrimiento de *lin-4* y *let-7*, se han descrito una gran cantidad de miRNAs en distintas especies de animales<sup>58-60</sup> y plantas<sup>61</sup>. Bases de datos, como miRBase han catalogado

secuencias de miRNAs de varios organismos y es la base de datos de referencia más usada<sup>62-64</sup>.

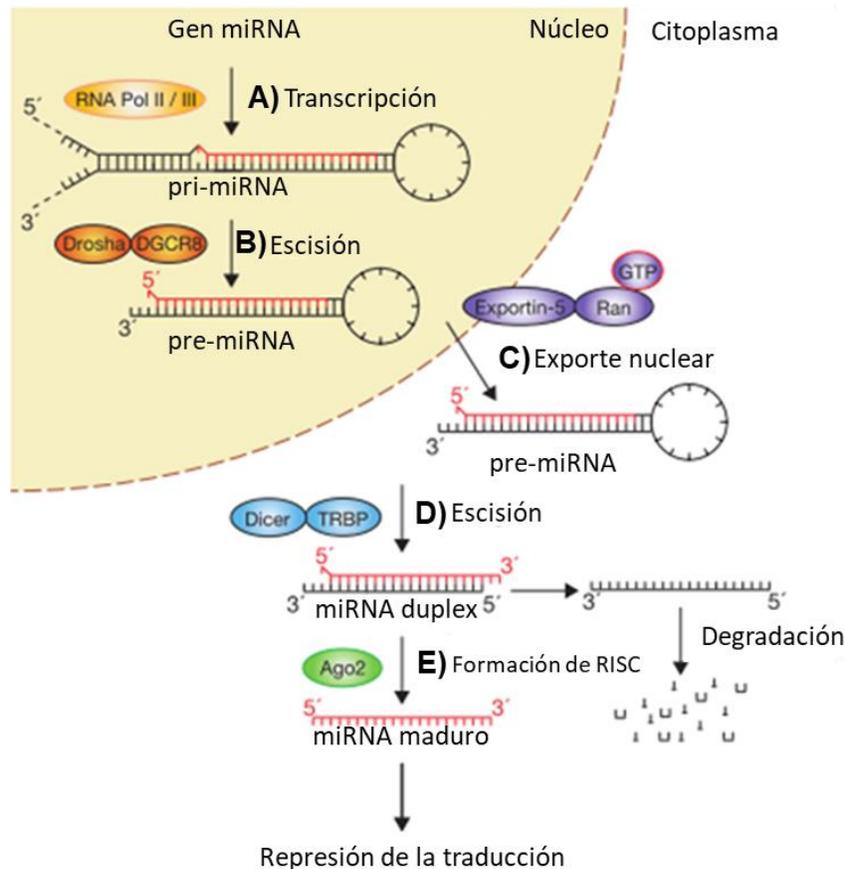
### **2.3.1. Biogénesis y función de los miRNAs.**

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo con la transcripción de los miRNAs por la RNA polimerasa II<sup>65</sup> para crear un transcrito primario largo (pri-miRNA) poliadenilado y protegido en su extremo 5' por una estructura 7-metilguanosa-trifosfato (**Figura 3A**). Dentro del núcleo, el complejo microprocesador conformado por la RNAsa III Drosha<sup>66</sup> y por la proteína de la región cromosómica 8 del síndrome DiGeorge (DGCR8), escinde el tallo del pri-miRNA y libera una estructura de horquilla de 60-70 nt llamada el precursor de miRNA (pre-miRNA)<sup>67,68</sup> (**Figura 3B**). DGCR8, es una proteína de unión a RNA de doble cadena (dsRNA) que reconoce aproximadamente 10 pb cerca del tallo de la horquilla del pri-miRNA, posicionando el sitio catalítico de Drosha<sup>10,69</sup>.

Los 2 nt sobresalientes del extremo 3' del pre-miRNA son reconocidos por la Exportina 5, se asocian y junto a RanGTP se forma un complejo trimérico (pre-miRNA/exportina/RanGTP), que interactúa con el poro nuclear. Lo anterior, facilita la salida del complejo trimérico del núcleo y una vez en el citoplasma se efectúa la hidrólisis de RanGTP a RanGDP y consecuentemente el desensamble de la horquilla pre-miRNA<sup>70</sup> (**Figura 3C**). En el citoplasma Dicer, una RNAsa III, escinde el asa de la horquilla del pre-miRNA liberando un miRNA de doble cadena o miRNA dúplex de 18-25 nt de longitud<sup>10,71</sup> (**Figura 3D**). En humanos, Dicer interactúa con la proteína reguladora de unión a RNA TAR (TRBP)<sup>72,73</sup>.

Una de las hebras del miRNA dúplex, el miRNA maduro o hebra guía, es incorporada en la proteína Argonauta 2 (Ago2), en humanos, para formar el complejo silenciador inducido por miRNA (miRISC) (**Figura 3E**), mientras que la otra puede ser degradada, por esto se le llama hebra pasajera. La elección de la hebra guía se determina durante la etapa de carga de Ago2, principalmente por la estabilidad termodinámica de los dos extremos del dúplex del miRNA. Un determinante adicional para la elección de la cadena es el nucleótido 5': las proteínas Ago seleccionan hebras guía con uracilo (U) en la posición 1. Como la selección de hebras no es estrictamente complementaria, la hebra no favorecida,

o hebra pasajera, también puede seleccionarse. Hay evidencia de que la hebra pasajera no representa un bio-producto no funcional de la biogénesis de los miRNAs, sino que puede también ser seleccionada como una hebra guía funcional y desempeñar funciones biológicas significativas <sup>74</sup>.



**Figura 3.** Mecanismo de biogénesis de miRNAs. A) Transcripción por la polimerasa II y producción del pri-miRNA; B) Drosha-DGCR8 escinde al pri-miRNA en el núcleo para dar origen al pre-miRNA; C) Exportina 5 exporta el pre-miRNA al citoplasma; D) Dicer-TRBP escinde el asa terminal de la horquilla del pre-miRNA para liberar un miRNA dúplex; E) Una de las dos hebras del miRNA dúplex se carga en Ago 2 para formar el miRISC, la otra puede ser degradada. Modificado y traducido de Winter et al. (2009).

El principal determinante de la unión del miRNA maduro con su mRNA blanco es una región que va de los nucleótidos 2 al 7 en el extremo 5', conocida como la secuencia semilla<sup>76,77</sup>. Dicha secuencia se une por complementariedad de bases a la región 3' UTR del mRNA, o en ciertos casos también a la región 5' UTR<sup>76,78</sup>, para reprimir su traducción.

En los miRNAs de animales, la complementariedad de los nucleótidos 10-11 es imperfecta, dándose una inhibición traduccional y una degradación vía remoción de la cola de poliA y exonucleasa 3'→5'<sup>79</sup>. También, como parte del mecanismo de inhibición de la traducción, se ha descrito la incorporación guiada por un miRNA del mRNA en cuerpos de procesamiento y degradación, llamados cuerpos P<sup>80</sup>. Adicionalmente a estos mecanismos tradicionales existe evidencia que indica que algunos miRNAs pueden incrementar la traducción de sus mRNA blanco<sup>81,82</sup>.

La secuenciación masiva ha revelado variantes de secuencias de miRNAs, que aunque parecen derivar del mismo gen, varían en secuencia debido al procesamiento post-transcripcional, estas variantes se denominan isomiRs<sup>83,84</sup>. Algunos miRNAs localizados en las secuencias intrónicas dependen del splicing para la liberación de los pre-miRNAs, en lugar de la actividad de la RNAsa Drosha, estos miRNAs se conocen como miRtrons<sup>65,85,86</sup>.

### 3. ANTECEDENTES

#### **3.1. Efecto de la P4 en la malignidad de los glioblastomas (GBMs).**

Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron la presencia de las isoformas de PR en biopsias de astrocitomas humanos grados III y IV (GBMs), siendo PR-B la más abundante. Además, se vio que, en líneas celulares derivadas de astrocitomas, grados III y IV (U373 y D54, respectivamente), la P4 (10 nM) aumentó de manera significativa el número de células respecto al vehículo, mientras que la mifepristona (RU486, 10 µM), un antagonista del PR bloqueó dicho aumento. Estos resultados sugieren que los efectos de la P4 son mediados por el PR<sup>87</sup>.

Posteriormente, se investigó el efecto de la P4 *in vivo*: se implantaron células U87, derivadas de GBMs, en la corteza cerebral de ratas macho adultas y se observó que la P4 incrementó el área del tumor y la longitud de infiltración. En estudios *in vitro* se observó que la P4 incrementó la migración y la invasión de células U251 y D54 derivadas de GBMs humanos y dicho efecto fue, bloqueado por el RU486.

En un enfoque más global, se realizaron análisis de expresión con microarreglos para determinar el papel del PR en el perfil de expresión de genes regulados por

P4, y sus metabolitos como la alopregnanolona. Se observó que la P4 regula la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en: metabolismo, transporte, ciclo celular, proliferación, metástasis, apoptosis, adhesión, procesamiento de ácidos nucleicos y proteínas, respuesta inmune, citoesqueleto y receptores de membrana<sup>88-90</sup>; es decir, sets de genes que participan en la progresión de tumores de GBMs. Estos datos de expresión permiten concluir que la actividad transcripcional del PR podría modificar el crecimiento de los GBMs.

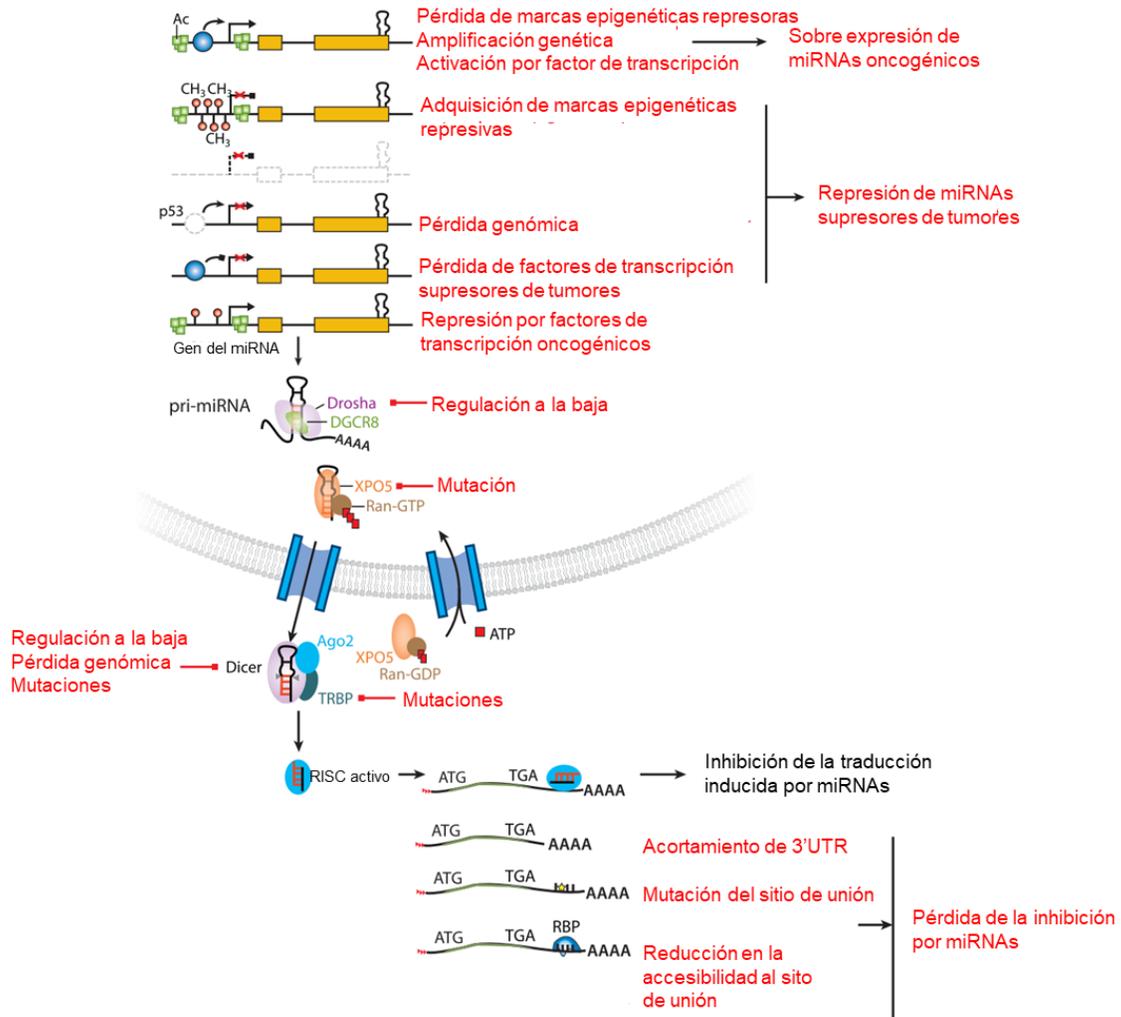
Si bien, todos estos resultados demuestran que la P4, modifica el perfil de expresión de diferentes genes que promueven el crecimiento, proliferación, invasión y migración de los GBMs, a través del PR, sigue siendo necesaria una comprensión más profunda de las bases moleculares de este tumor. Uno de los enfoques recientemente utilizados en la caracterización molecular de los GBMs, se basa en perfiles de expresión de microRNAs (miRNAs).

### **3.2. Los miRNAs en el cáncer.**

La expresión de miRNAs es tejido y tipo celular específico y éstos participan en la regulación de casi todos los procesos biológicos. Dado que el apareamiento con su mRNA blanco puede ser imperfecto, un miRNA puede dirigirse a varios blancos, lo que les brinda el potencial de regular más de la mitad del genoma humano<sup>65,77</sup>, por lo que la alteración de su expresión está implicada en el desarrollo de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer.

La primera evidencia de la participación de los miRNAs en el cáncer proviene de un trabajo realizado por Calin en el año 2002, en el cual examinó una deleción recurrente en el cromosoma 13q14 en la búsqueda de un gen supresor tumoral involucrado en la leucemia linfocítica crónica (CLL) y descubrió que la región común de deleción mínima codifica dos miRNAs, hsa-miR-15a y hsa-miR-16-1. El análisis de su expresión en muestras de CLL y en linfocitos normales CD5+, reveló que la regulación a la baja de los hsa-miR-15a y hsa-miR-16-1 se asocia consistentemente con la deleción en el cromosoma 13q14. Esto sugirió un papel de hsa-miR-15a y hsa-miR-16-1 como genes supresores de tumores<sup>91,92</sup>.

Después de este descubrimiento, se han ido describiendo los mecanismos por los que se da la desregulación de los miRNAs y el papel de estos en la patogénesis del cáncer (**Figura 4**).



**Figura 4.** Alteraciones en las vías de síntesis y de acción de miRNAs en cáncer. Los procesos comúnmente alterados se encuentran en rojo. Abreviaciones: Ac, acetilación; Ago2: argonata 2; CH<sub>3</sub>: metilación; RBP: proteína de unión a DNA; RISC: complejo silenciador inducido por RNA; TRBP: proteína reguladora de unión a RNA; UTR: región no traducida; XPO5: exportina 5. Traducida de Leva et al., (2014).

En general, los tumores analizados muestran una firma específica de miRNAs denominado miRNoma que caracteriza el estado maligno y define algunas de sus características clínico-patológicas<sup>10</sup>; dicho miRNoma está también relacionado con

el diagnóstico, grado, progresión, pronóstico y respuesta a tratamientos<sup>93</sup>. Dependiendo de los tipos celulares donde se encuentre y si están regulados a la alta o a la baja en tejidos malignos comparados con su contraparte no cancerosa, los miRNAs pueden considerarse como oncomiRNAs o como miRNAs supresores de tumores<sup>10</sup>.

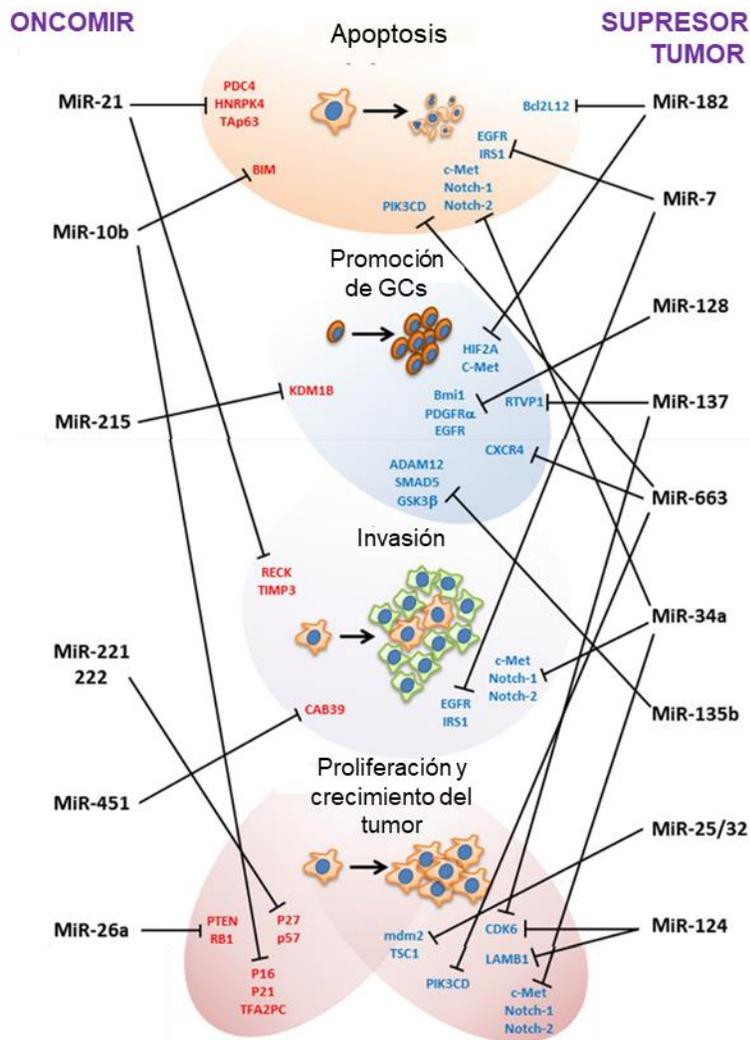
Algo particularmente prometedor para el diagnóstico del cáncer es la evidencia que sugiere que los perfiles de expresión de los miRNAs se pueden utilizar para clasificar a los cánceres humanos con más precisión que con los perfiles de expresión de mRNAs<sup>94,95</sup>. Por otra parte, el estudio de los miRNAs en cáncer también ha dado lugar al surgimiento de nuevos enfoques terapéuticos que involucran dos estrategias: 1) la primera pretende inhibir a los oncomiRNAs mediante el diseño de oligonucleótidos de una sola hebra, conocidos como antagomirs o anti-miRs, que actúan a través del apareamiento por complementariedad de bases con los miRNAs. Para un efecto inhibitorio farmacológico de miRNAs asociados a enfermedades, los antagomirs contienen modificaciones químicas para aumentar la afinidad de unión, conferir resistencia a nucleasas y facilitar la captación celular<sup>10,96</sup>; 2) la segunda estrategia consiste en el reemplazo de miRNAs, lo que implica la reintroducción de miRNAs mimic inhibidores de tumores para restaurar la pérdida de función<sup>97</sup>. Los miRNAs mimic representan un nivel adicional de complejidad en comparación con los anti-miR; en primer lugar, están los efectos de saturación del complejo RISC, además, existe la posibilidad de inducir efectos no deseados cuando se introducen nuevos miRNAs en una célula<sup>10</sup>.

### ***3.2.1. Identificación y función de miRNAs en glioblastomas.***

De manera general, se ha observado que los genes de los miRNAs que se modulan en las muestras de GBMs no residen en lugares cromosómicos comúnmente eliminados, amplificados o reorganizados en este tipo de tumor cerebral, lo que sugiere que su regulación específica a la alta o a la baja se debe a la modulación de su expresión y no a las anomalías del DNA.

Hasta la fecha, sigue acumulándose evidencia de que los miRNAs se encuentran involucrados en vías de señalización relacionadas con la gliomagénesis,

proliferación, apoptosis, invasión y malignidad de los GBMs<sup>20-28</sup>. En la **Figura 5** se presentan algunos miRNAs, sus blanco y su papel en la progresión de los GBMs.



**Figura 5.** *Función de miRNAs relevantes en GBMs.* Los miRNAs con función de oncomir se encuentran enlistados a la izquierda de la figura, sus genes blanco se encuentran en rojo. Los miRNAs con función supresora de tumores se encuentra a la derecha de la figura y sus genes blanco se encuentran en color azul. Para cada gen se indica la función en la que estarían participando. Traducida de Mercatelli et al., (2017).

Dada su especificidad, la expresión diferencial de miRNAs en tumores también podría constituir una herramienta útil en la clasificación molecular de los GBMs<sup>98,99</sup>.

### 3.3. Regulación de miRNAs por P4.

Los primeros miRNAs regulados por P4 fueron encontrados y estudiados en el tejido uterino, estos miRNAs están involucrados en procesos como la implantación

del embrión en el útero<sup>100</sup>, proliferación del endometrio<sup>101</sup>, contracción uterina al inicio del parto<sup>102,103</sup>, así como en enfermedades como leiomioma y endometriosis<sup>104,105</sup>

Los miRNAs regulados por P4 en células cancerígenas fueron identificados por primera vez en las líneas celulares de cáncer de mama<sup>12-18</sup> y en cáncer de ovario<sup>106</sup>. En estos cánceres y tejidos sensibles a hormonas se demostró que 1) existen miRNAs regulados por P4, 2) existen miRNAs regulados por P4 cuya expresión se encuentra alterada en cáncer, 3) existen blancos de miRNAs regulados a su vez por P4, y que se encuentran alterados en cáncer, por ejemplo: PR (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Lista de miRNAs validados, regulados por P4. ND: No determinado.

miRNA	Blanco	Función y regulación del mRNA blanco
let-7a	ND	El tratamiento con estradiol-17 $\beta$ y/o P4, aumentó significativamente la expresión de let-7a, el primer miRNA descubierto en <i>C. elegans</i> <sup>100</sup> .
miR-152	WNT-1	La P4 induce la expresión de miR-152 a través del subtipo B de su receptor. miR-152 impide la transición G1/S del ciclo celular e inhibe la proliferación celular al regular a la baja WNT-1 <sup>101</sup> .
Familia del miR-200	ZEB1 ZEB 2	La familia miR-200, a través de ZEB1 y ZEB2 regulan la contracción en el trabajo de parto <sup>102</sup> .
miR-200a	STAT5b	Este miRNA disminuye la función de PR durante la progresión hacia el parto, regula a la baja a STAT5b, un represor transcripcional de la enzima 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 $\alpha$ -HSD) <sup>103</sup> .
miR-196a	P-MEK P-ERK	Se estableció un eje regulador entre miR-196a-P-MEK/P-ERK-PGR. La inhibición de miR-196a, aumentó la expresión de P-MEK/P-ERK y a su vez aumentó los niveles de proteína del PR <sup>105</sup> .
miR-29	KLF4	miR-29 reduce la proliferación celular, induce la apoptosis, disminuye la invasión. P4 regula a la alta al factor de transcripción 4 tipo Krüppel (KLF4), a nivel transcripcional y postranscripcional, a través de la regulación a la baja de su represor, miR-29 <sup>12</sup> .
	ATP1B1	El acetato de medroxiprogesterona (MPA), una progestina, regula a la baja la expresión de miR-29. El gen que codifica a la subunidad beta-1 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio (ATP1B1) es regulado por PR mediante elementos de respuesta en su promotor <sup>14</sup> .
miR-16	Ciclina D Ciclina E	MPA regula a la baja a miR-16 a través de la vía clásica de PR y una interacción jerárquica entre Stat3 y c-Myc <sup>13</sup> .

---

miR-513a-5p	PR	El MPA regula al alta la expresión de miR-513-5p, el cual a su vez regula a la baja a PR en cáncer de mama <sup>18</sup> .
let-7/miR-98	PGRMC1	La estimulación de células SKOV-3 con P4 resultó en una disminución en los niveles del mRNA de PGRMC1. La P4 ejerce su efecto sobre la expresión del componente 1 del receptor a P4 membranaral (PGRMC1) por la estimulación de let-7/miR-98 <sup>106</sup> .
miR-141	STAT5a PR	P4 regula a la baja a miR-141.La pérdida de miR-141, facilita la desdiferenciación de células de cáncer de mama a través de la desregulación de PR y Stat5a, dos factores de transcripción importantes para controlar el destino de la célula mamaria <sup>15</sup> .
miR-129-2	PR	miR-129-2 se dirige al 3'UTR de PR para regular a la baja su expresión <sup>16</sup> .
miR-26b-5p	ND	La expresión de PR-A se relaciona positivamente con la expresión de miR-26b-5p. La P4 más PR-A previenen la supresión de miR-26b-5p por estradiol (E2), permitiendo un incremento en la invasión y metástasis de las células T47D y BT474 <sup>17</sup> .
miR-92a-3p	ND	La expresión de PR-A se relaciona negativamente con la expresión de miR-92a-3p. La P4 a través de PR-A previene la inducción de miR-92a-3p por E2. La expresión constitutiva de este miRNA suprime la metástasis <sup>17</sup> .

---

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La alteración de la expresión de los miRNAs está implicada en el desarrollo de muchas enfermedades, entre ellas los GBMs. Aunque se ha observado que la P4 regula la expresión de genes que promueven el crecimiento, proliferación, invasión y migración de células derivas de GBMs, aún no se determinado el efecto de la P4 en el perfil de expresión de miRNAs en GBMs humanos.

#### 5. HIPÓTESIS

Si los efectos de la P4 en la progresión de los GBMs involucran en parte la regulación por miRNAs, entonces, la administración de la hormona y el antagonista de su receptor, RU486, **modificarán** el perfil de expresión de éstos en células derivadas de GBMs humanos.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Conocer el perfil de expresión de miRNAs regulados por P4 en la línea celular U251 derivada de un GBM humano.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar los patrones de expresión de miRNAs en la línea celular U251 tratada con P4, RU486 y P4+RU486.
- Obtener una lista de miRNAs regulados por P4 y validarlos mediante RT-qPCR.
- Hacer un análisis preliminar de los mRNA blancos regulados por los miRNAs validados.

## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 8.1. Cultivos celulares.

La línea celular U251 derivada de un GBM humano se mantuvo en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con rojo fenol alto en glucosa, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y antibiótico 1mM (Estreptomicina 10 g/L, Penicilina G 6.028 g/L y Amfotericina B 0.025 g/L), a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Para obtener una cantidad óptima de RNA, se utilizaron dos cajas de 12 pozos, en cada uno se sembraron 150,000 células (se designaron dos pozos para cada réplica en cada uno de los tratamientos. Para la validación de los miRNAs y sus genes blanco, los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior; posteriormente se pasaron a cajas de 6 pozos, en las que se sembraron 200,000 células por pozo. Doce horas antes de los tratamientos, tanto para los microarreglos como para las validaciones, el medio DMEM con rojo fenol se sustituyó por DMEM sin rojo fenol con SFB sin hormonas.

## **8.2. Tratamientos.**

Para los microarreglos, las células se trataron por 6 h con P4 (10 nM), RU486 (10  $\mu$ M), P4 (10 nM) + RU486 (10  $\mu$ M) y vehículo (ciclodextrina, 0.02%).

## **8.3. Extracción de RNA.**

Después del tratamiento de 6 h se extrajo el RNA total por el método de fenol-guanidina isocitrato-cloroformo usando el reactivo TRIzol de Molecular Research Center Inc. (Cincinnati, OH, USA). Las células fueron cosechadas con 300  $\mu$ L de reactivo por pozo; se transfirió el contenido de dos pozos a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se les añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo y se centrifugaron a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4 °C. Después de este tiempo, se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos eppendorf, se les añadieron 400  $\mu$ L de isopropanol y se dejaron reposando toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante dejando solo la pastilla precipitada en el fondo que se enjuagó con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugaron a 12,500 rpm por 8 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se volvieron a enjuagar las pastillas con 1 mL de etanol al 80% y se repitió la centrifugación a 12,500 rpm por 8 minutos a 4 °C. Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire libre; una vez seca se re-suspendió con 40  $\mu$ L de agua grado biología molecular.

La concentración y la pureza del RNA extraído fue determinada en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en donde se leyó la absorbancia a 260 nm de 1  $\mu$ L de muestra de RNA por triplicado. La integridad del RNA fue comprobada mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. La integridad de las muestras se verificó también en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) con el Software Expert Agilent 2100.

## **8.4. Microarreglos.**

Los microarreglos fueron realizados en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y se realizaron 3 réplicas técnicas por tratamiento: vehículo, P4,

RU486 y P4+RU46, usando un total de 12 microarreglos. Se siguió el protocolo estándar, en donde un total de 250 ng de RNA se marcaron con el kit FlashTag Biotin HSR (Affymetrix; Santa Clara, CA USA.), para ser subsecuentemente hibridado con el GeneChip miRNA 4.0 Array Affymetrix® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), que contiene 30,434 sondas de miRNAs maduros, de los cuales 2,578 son miRNAs humanos y el resto son miRNAs de ratón, rata y snoRNAs. El chip fue posteriormente lavado dos veces con PBS 1X con Tween al 0.02% y teñido con FlashTag Biotin HSR (Affymetrix; Santa Clara, CA USA.) en la estación Fluidics Station 450 (Affymetrix), finalmente se digitalizó la imagen en el scanner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix), en donde se generaron los archivos .CEL.

### **8.5. Análisis de expresión diferencial de los datos de microarreglos.**

Los valores de intensidad de fluorescencia en formato .CEL, obtenidos después del escaneo de los microarreglos, fueron cargados en el software Expression Console™ 1.4.1.46 en donde se pre-procesaron con el Robust Multiarray Analysis (RMA) y se normalizaron por cuantiles. Los archivos .CHP generados después de la normalización fueron cargados en el Software Transcriptomic Analysis Console™ (TAC) 4.0.1 para el análisis de expresión diferencial a través de las funciones del paquete Limma y para la generación de gráficos. Este paquete corrige los efectos de lote durante el análisis de expresión diferencial.

### **8.6. Análisis bioinformático para la notación funcional de genes.**

Se realizó una búsqueda de los mRNAs blanco para cada uno de los miRNAs expresados diferencialmente para cada tratamiento respecto al vehículo en 5 diferentes bases de datos de libre acceso: Tarbase<sup>107</sup>, MiRWalk<sup>108</sup>, MicroT-CDS<sup>109</sup> y TargetScan<sup>110</sup>. De las bases de datos anteriormente mencionadas, Tarbase y MiRWalk reportan interacciones miRNA-mRNA validadas mientras que MicroT-CDS y TargetScan reportan únicamente interacciones miRNA-mRNA predichas. Los falsos positivos fueron eliminados tomando solo las intersecciones de al menos 3 de estas bases de datos con ayuda de un diagrama de Venn usando una

herramienta web de libre acceso (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Los mRNAs que se encontraron en al menos 3 bases de datos fueron ingresados a Enrichr<sup>111</sup> para realizar una anotación funcional de genes en la ontología de genes (Gene Ontology: GO)<sup>112</sup> y un análisis de enriquecimiento de vías en la enciclopedia de Kioto de genes y genomas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG)<sup>113</sup>. Los términos GO y KEGG con un valor de  $P < 0.05$  fueron considerados significativamente enriquecidos.

### **8.7. Análisis de la red de interacción proteína-proteína (PPI).**

La red de interacción proteína-proteína (PPI) se estableció usando la base de datos STRING<sup>114</sup>. Los genes hub, aquellos que tuvieron un alto grado de conectividad con otros genes<sup>115</sup>, fueron determinados con la ayuda del software Cytoscape (versión 3.7.1).

Finalmente se determinaron los niveles de expresión de los genes hub en GEPIA<sup>116</sup>, un servidor web interactivo que fue desarrollado para realizar el análisis de datos de expresión de RNA-seq de 9,736 tumores y 8,587 muestras normales de los proyectos de El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y La expresión del genotipo en tejido (GTEx).

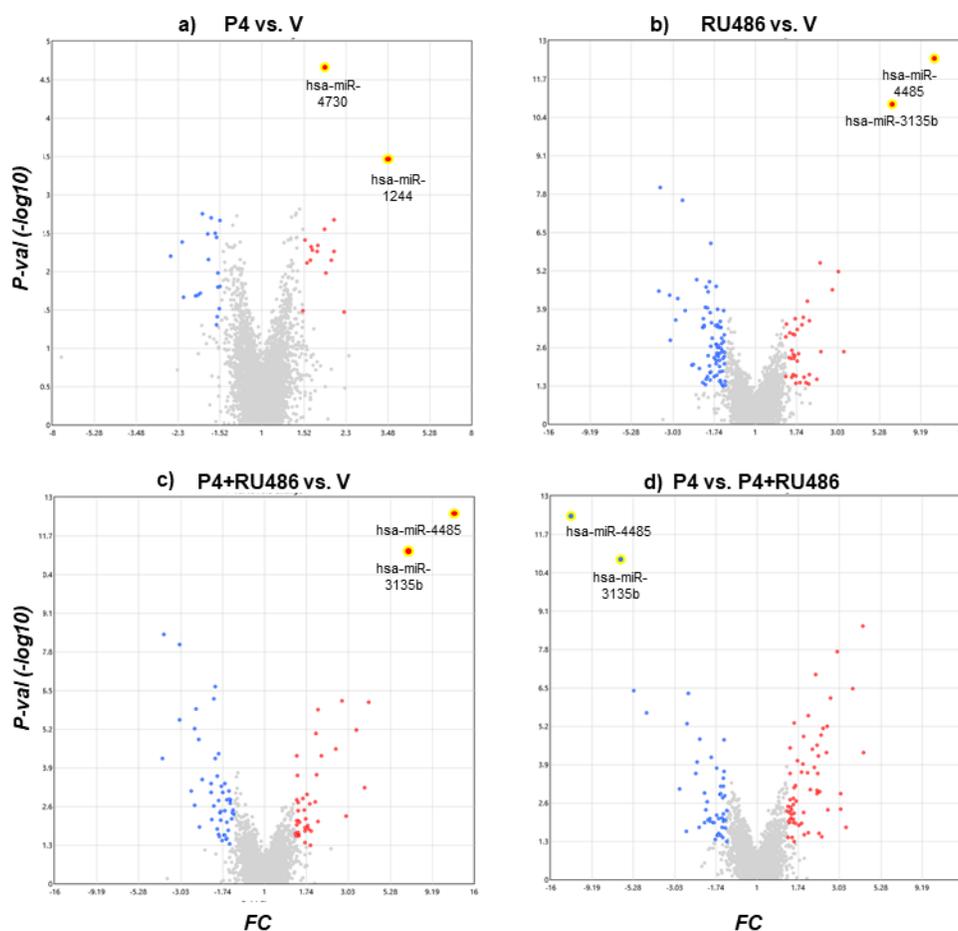
### **8.8. Análisis estadístico.**

Para la selección de los miRNAs diferencialmente expresados entre los tratamientos se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con la t-moderada por método de ebayes. Los miRNAs con una tasa de expresión diferencial (Fold Change, por su nombre en inglés) mayor a 1.5 y menor a -1,5 y un valor de  $p < 0.05$ , fueron seleccionados como miRNAs diferencialmente expresados en los principales contrastes de los tratamientos.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Identificación de los miRNAs expresados diferencialmente en células U251.

Se evaluó la expresión global de 2578 miRNAs humanos en las células U251 después de 6 horas de tratamiento con vehículo (V), P4, RU486 y P4+RU486. En total, se encontraron 190 miRNAs diferencialmente expresados (DE-miRNAs) en los contrastes de “P4 vs. V” (**Figura 6A**), “RU486 vs. V” (**Figura 6B**), “P4+RU486 vs. V” (**Figura 6C**) y “P4 vs. P4+RU486” (**Figura 6D**). Los datos de los microarreglos presentados en esta tesis fueron depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus de NCBI [29] y son accesibles a través del número de serie GSE144204.



**Figura 6.** Análisis de expresión diferencial de miRNAs en respuesta a P4 y a un antagonista de su receptor en células U251. Los plots de volcán muestran a los DE-miRNAs en A) P4 vs. V, B) RU486 vs. V, C) P4+RU486 vs. V, D) P4 vs. P4+RU486. Los puntos azules representan los miRNAs regulados a la baja y los puntos rojos representan

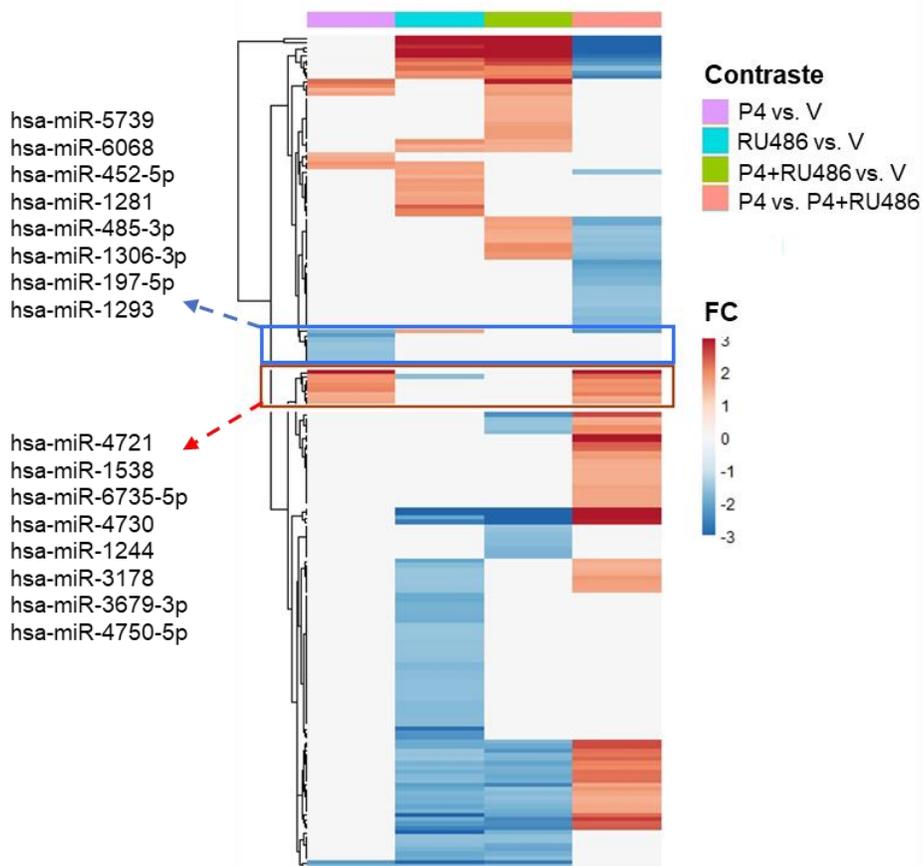
a los miRNAs regulados a la alta (FC>1.5 and valor de  $p \leq 0.05$ ). FC: Fold change (Tasa de cambio).

El número de DE-miRNAs regulados a la baja y a la alta en cada contraste se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Número de miRNAs con expresión diferencial al comparar los tratamientos a las 6 h (vehículo, P4, RU486 y P4+RU486). V: vehículo.

<b>Contraste</b>	<b>Regulados a la alta</b>	<b>Regulados a la baja</b>	<b>Total</b>
P4 vs. V	16	10	26
RU486 vs. V	27	77	104
P4+RU486 vs. V	38	47	85
P4 vs. P4+RU486	63	39	102

Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se realizó un mapa de calor con los 190 DE-miRNAs (**Figura 7**). En este mapa de calor se pueden identificar 8 miRNAs cuya expresión disminuyó con P4 respecto al vehículo, sin ser afectados por los tratamientos de RU486 y P4+RU486. Por el contrario, la P4 aumentó la expresión de 8 miRNAs, respecto al vehículo, cuya expresión cambió de manera similar en la comparación P4 vs. P4+RU486, pero no cambió con los tratamientos de RU486 y P4+RU486, respecto al V.



**Figura 7.** Mapa de calor del agrupamiento jerárquico de todos los DE-miRNAs en células U251 tratadas con vehículo, P4, RU486 y P4+RU486 por 6 h. En el cuadro azul se señalan los miRNAs regulados a la baja por P4 y en el cuadro rojo los miRNAs regulados a la alta por P4. FC: Tasa de cambio; V: vehículo.

En la **Tabla 3** se muestra la identidad, la tasa de cambio y el valor de P de los 16 miRNAs regulados exclusivamente por P4.

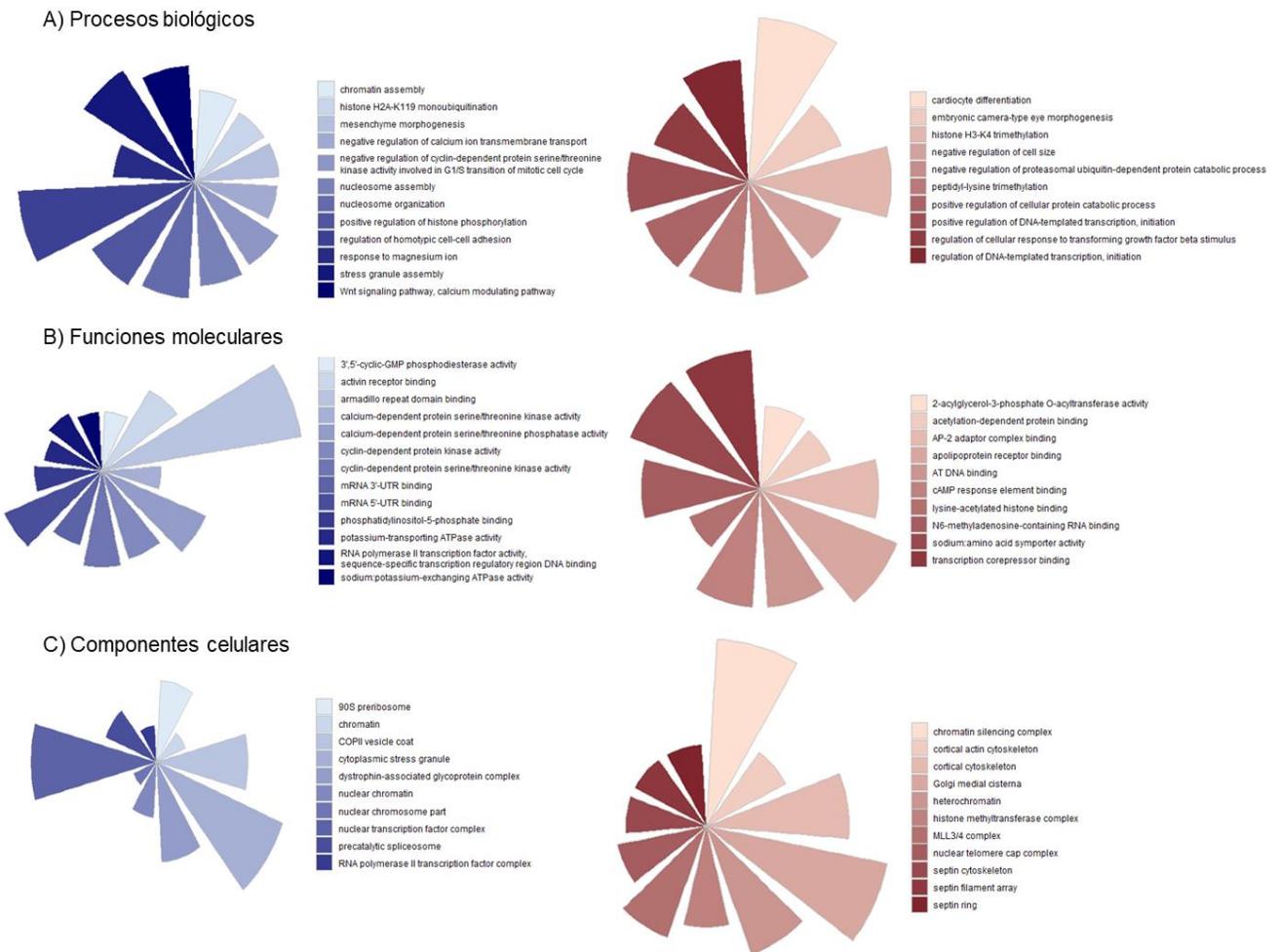
**Tabla 3.** miRNAs regulados por P4 en células U251. FC: Tasa de cambio; V: vehículo.

miRNA	P4 vs V		RU486 vs V		P4+RU486 vs V		P4 vs P4+RU486	
	Valor de p	FC	Valor de p	FC	Valor de p	FC	Valor de p	FC
<b>miRNAs regulados a la baja por P4</b>								
hsa-miR-5739	0.0018	-1.81	0.0048	1.69	-	-	1.69E-05	-2.16
hsa-miR-6068	0.0216	-2.18	-	-	-	-	-	-
hsa-miR-452-5p	0.0389	-1.56	-	-	-	-	-	-
hsa-miR-1281	0.0031	-1.59	-	-	-	-	-	-

hsa-miR-485-3p	0.0022	-1.52	-	-	-	-	-	-
hsa-miR-1306-3p	0.002	-1.65	-	-	-	-	-	-
hsa-miR-197-5p	0.0158	-1.55	-	-	-	-	-	-
hsa-miR-1293	0.0303	-1.53	-	-	-	-	-	-
miRNAs regulados a la alta por P4								
hsa-miR-4721	0.0028	1.86	0.002	-1.67	-	-	6.46E-05	2.27
hsa-miR-1538	0.0071	1.61	-	-	-	-	0.0085	1.58
hsa-miR-6735-5p	0.0071	1.99	-	-	-	-	0.0254	1.98
hsa-miR-4730	2.22E-05	1.86	-	-	-	-	1.38E-05	1.87
hsa-miR-1244	0.0003	3.56	-	-	-	-	0.0012	3.07
hsa-miR-3178	0.0077	1.56	-	-	-	-	3.69E-05	2.11
hsa-miR-3679-3p	0.0052	1.65	-	-	-	-	0.0022	1.69
hsa-miR-4750-5p	0.0021	2.05	-	-	-	-	0.0051	1.87

## 9.2. Anotación funcional GO y análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los miRNAs regulados por P4.

Las listas de genes obtenidas en la búsqueda de blancos-putativos para los 8 miRNAs de interés fueron usadas como entrada para el análisis de anotación funcional GO y el análisis de enriquecimiento de vías KEGG en Enrichr. La anotación funcional de la ontología de genes (GO) incluye tres categorías: procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Como resultado del análisis, los 367 genes blanco de los miRNAs regulados a la baja por P4 se enriquecieron significativamente en procesos relacionados con la modificación postranscripcional de histonas, el ensamblaje de la cromatina, ensamblaje del nucleosoma, progresión del ciclo celular, unión de RNA, regulación de la transcripción y la traducción, entre otros. Por su parte, los 434 genes blanco de miRNAs regulados a la alta por P4 estuvieron relacionados a procesos como la regulación de la transcripción, modificaciones de la histona H3K4, regulación de la vía TGF-beta, estructura de la cromatina y conformación del citoesqueleto (**Figura 8**).



**Figura 8.** Anotación funcional GO de los genes blanco de los miRNAs regulados a la baja (azul) y a la alta por P4 (rojo). A) Principales procesos biológicos enriquecidos por los genes blanco de los miRNAs regulados por P4; B) Funciones moleculares enriquecidas por los genes blanco de los miRNAs regulados por P4; C) Componentes celulares enriquecidos por los genes blanco de los miRNAs regulados por P4.

En el análisis de enriquecimiento de vías KEGG se obtuvo que los genes blanco de los miRNAs regulados a la baja por la P4 fueron significativamente enriquecidos en lupus eritematoso sistémico y alcoholismo, pero también en procesos como el ciclo celular, la vía de señalización MAPK y vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los genes blanco de los miRNAs regulados a la baja por P4.

<b>Término</b>	<b>Coincidencias</b>	<b>Valor de p</b>
Lupus eritematoso sistémico	14/133	0.0000001245
Alcoholismo	16/180	0.0000001687
Carcinogénesis viral	12/201	0.000291301
Síndrome de Cushing	10/155	0.000503219
Cáncer de vejiga	5/41	0.000798635
Potenciación a largo plazo	6/67	0.001274163
Ciclo celular	8/124	0.001804709
Absorción de minerales	5/51	0.002163061
Vía de señalización MAPK	13/295	0.002737286
Vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre.	8/139	0.003665340

Los genes blanco de los miRNAs regulados a la alta por P4 fueron significativamente enriquecidos en el ciclo de vesículas sinápticas, uniones estrechas, cáncer colorrectal, vía de señalización de TGF-beta, vías de señalización de IL-17, carcinoma renal celular y uniones adherentes, como se muestra en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los genes blanco de los miRNAs regulados a la alta por P4.

<b>Término</b>	<b>Coincidencias</b>	<b>Valor de p</b>
Ciclo de vesículas sinápticas	6/78	0.0028211
Esfuerzo cortante y aterosclerosis	8/139	0.0037271
Uniones estrechas	8/170	0.0120564
Cáncer colorrectal	5/86	0.0195424
Vías de señalización de TGF-beta	5/90	0.0232857
Vías de señalización de IL-17	5/93	0.0263776
Ferroptosis	3/40	0.0349887
Carcinoma renal celular	4/69	0.0357799
Unión adherentes	4/72	0.0408592

### 9.3. Selección de genes hub.

Para tener una mayor idea de la interacción entre los genes blanco de los miRNAs regulados por P4, estos se mapearon en la base de datos STRING y, con base en la información que brindó, se construyeron dos redes de interacción proteína-proteína (PPI) y se analizaron con ayuda del software Cytoscape. El análisis arrojó como resultado 259 y 267 pares de nodos para los genes blanco de los miRNAs regulados a la baja y a la alta por P4, respectivamente.

El top 10 de los genes con mayor peso en la red debido a su gran número de interacciones con otros genes, es decir, los genes hub, fueron determinados por el valor de su grado de conectividad, es decir, el número de nodos (genes) conectados con el nodo individual de interés (gen hub). Se determinaron un total de 20 genes hub blanco de los miRNAs regulados por P4, estos se enlistan en la **Tabla 6** así como su función en un contexto relacionado a la biología del cáncer y de los GBMs.

**Tabla 6.** Genes hub de los miRNAs regulados por P4. La tabla muestra los genes hub acomodados de acuerdo a su grado de conectividad.

<b>Genes hub blanco de los miRNAs regulados a la baja por P4</b>			
<b>miRNA</b>	<b>Gen</b>	<b>Función/Expresión</b>	<b>Grado de conectividad</b>
hsa-miR-1239	HIST2H2BE	La histona H2B tipo 2-E (HIST2H2BE), un componente de los nucleosomas, se encuentra expresada a la baja en la línea celular U87 derivada de GBMs. <sup>117</sup> .	34
hsa-miR-1239	HIST2H2AC	La histona H2A tipo 2-C (HIST2H2AC), se encuentra solo en células no diferenciadas y/o en proliferación, pero también se encuentra expresada en todos los subtipos moleculares del cáncer de mama <sup>118</sup> .	32
hsa-miR-1281	HIST1H2BJ	La histona H2B tipo 1-J (HIST1H2BJ), se encuentra altamente expresada en pacientes con cáncer cervical, lo cual fue asociado con una prolongada supervivencia del paciente <sup>119</sup> . En cáncer de mama, es importante en la regulación del	24

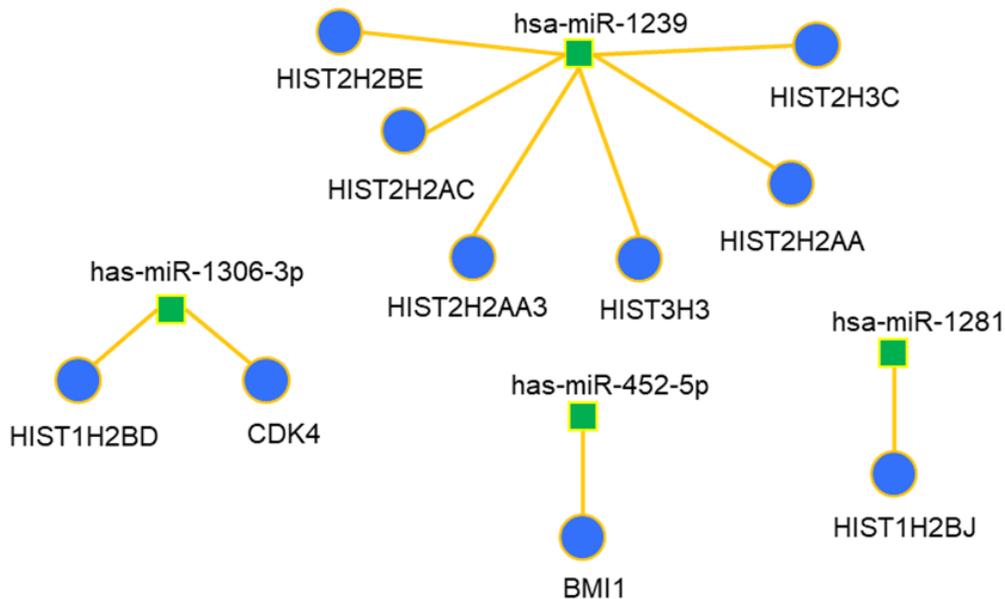
		metabolismo celular <sup>120</sup> .	
hsa-miR-1306-3p	HIST1H2BD	La histona H2B tipo 1-D (HIST1H2BD), al igual que HIST1H2BJ, es expresada en pacientes con cáncer cervical y se relaciona con la prognosis de esta enfermedad <sup>119</sup> . Tanto en osteosarcoma <sup>121</sup> , como en cáncer de próstata <sup>122</sup> , esta histona se encuentra altamente expresada.	24
hsa-miR-1306-3p	CDK4	En células derivadas de GBMs, se ha observado que la P4 provoca el incremento de la actividad y la acumulación de la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) <sup>123</sup> , también se ha visto que CDK4 forma parte del eje regulador CDK4-hsa-miR-124-circMMP9 <sup>124</sup> . En GBM, son frecuentes las alteraciones genéticas en el gen que codifica a CDK4 <sup>37-40</sup> .	20
hsa-miR-1239	HIST2H2AA3	La expresión de la histona H2A tipo 2-A3 (HIST2H2AA3) no ha sido evaluada en ningún cáncer.	20
hsa-miR-1239	HIST3H3	En un estudio se observó que la histona H3.1 (HIST3H3) aumentó su expresión, coincidiendo con la transformación celular neoplásica en cáncer cervical, inducida por la combinación entre el virus del papiloma humano y el tabaco <sup>125</sup> .	20
hsa-miR-1239	HIST2H3C	Las mutaciones de esta histona H3.2 (HIST2H3C) en la lisina 27 (K27M), han sido relacionadas con la respuesta a radioterapia de pacientes con gliomas difusos <sup>126</sup> .	20
hsa-miR-1239	HIST2H2AA	La expresión de la histona H2A tipo 2-A (HIST2H2AA) no ha sido evaluada en ningún cáncer.	20
hsa-miR-452-5p	BMI1	BMI1 forma parte del complejo represivo 1 (PRC1). Es un oncogén sobre-expresado en células de GBMs, particularmente en células troncales de GBMs (GSC); su sobre-expresión se relaciona con un aumento en la proliferación e invasión de las células de GBMs <sup>127,128</sup> . También se ha visto que en líneas celulares y biopsias de GBMs, BMI1 es blanco del hsa-miR-128-1 y del hsa-miR-429 <sup>129,130</sup> .	17

### Genes hub blanco de los miRNAs regulados a la alta por P4

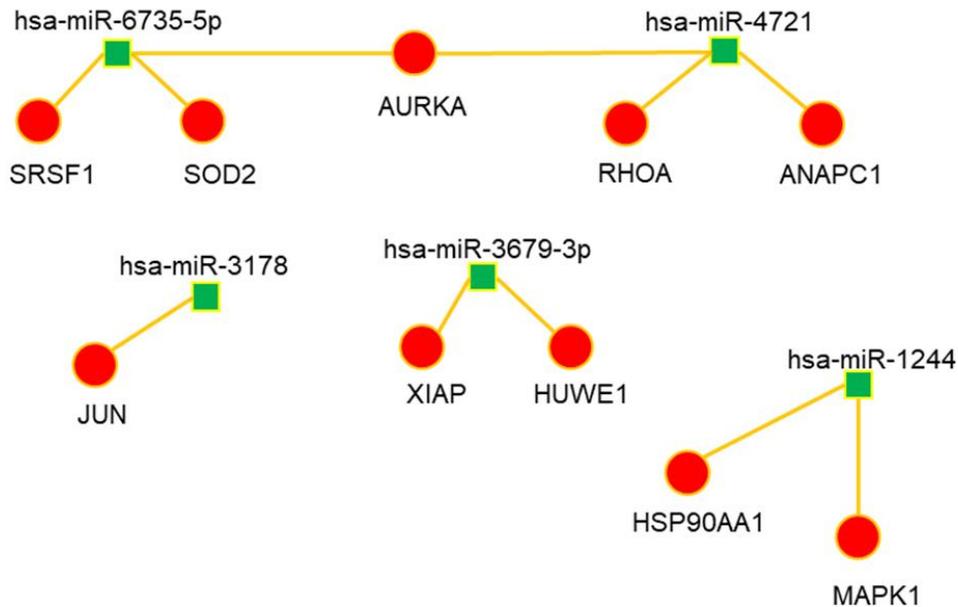
hsa-miR-1244	HSP90AA1	En GBMs se sugirió que la interacción de un conjunto de proteínas, como la proteína de choque térmico HSP 90-alfa (HSP90AA1) y aminoacil-tRNA sintetasas, contribuyen a la distinción de fenotipos de GBMs con diferente prognosis <sup>131</sup> .	30
hsa-miR-1244	MAPK1	La MAP cinasa 1 (MAPK1) fue confirmada como blanco del hsa-miR-129-1 en GBMs. La vía de señalización de las MAPK cinasas ha sido involucrada con un aumento en la proliferación de las células de GBMs <sup>2,132-135</sup> .	29
hsa-miR-3178	JUN	El gen JUN codifica al factor de transcripción AP-1, el cual se encuentra constitutivamente activado en GBMs, contribuyendo a su malignidad <sup>136-138</sup> .	27
hsa-miR-4721	RHOA	El miembro A de la familia Ras homóloga (RHOA), codifica una GTPasa que se ha visto sobre-expresada en GBMs. La señalización de RHOA se ha visto implicada en diferentes procesos que contribuyen a la malignidad de los GBMs <sup>139,140</sup> .	25
hsa-miR-	SRSF1	Factor de Splicing 1 rico en serina y arginina (SRSF1), es conocido por estar altamente expresado en células de GBM y	15

6735-5p		promover su migración, además es blanco del RNA circular circSMARCA5 <sup>141</sup> .	
hsa-miR-4721	ANAPC1	En líneas celulares de cáncer de próstata, se determinó que la subunidad 1 del complejo promotor de anafase (ANAC1), se encuentra sobre-expresada <sup>142</sup> . Mutaciones y alteraciones en las subunidades de este complejo han sido reportadas en diferentes tipos de cáncer como posibles causantes de la inestabilidad cromosómica, típica de esta enfermedad <sup>143</sup> .	15
hsa-miR-3679-3p	HUWE1	Este gen codifica una proteína que contiene un dominio HECT C-terminal que funciona como una ubiquitina ligasa E3. La desregulación de HUWE1 fue asociada con la tumorigénesis y metástasis de diferentes tipos de cáncer, ya sea como oncogén o como supresor tumoral <sup>146,147</sup> .	14
hsa-miR-3679-3p	XIAP	El inhibidor de apoptosis ligado a X (XIAP), se encuentra altamente expresado en biopsias de GBMs, y en la línea celular LN-229, lo que indica que la vía de apoptosis intrínseca se encuentra inhibida en este tipo de tumor <sup>148,149</sup> .	14
hsa-miR-6735-5p	SOD2	La expresión de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) aumenta significativamente, tanto a nivel de mensajero como de proteína, en la línea celular LN-239 y U87 expuestas a estrés oxidativo <sup>150-152</sup> .	14
hsa-miR-4721	AURKA	La cinasa aurora A (AURKA) se encontró expresada a la alta en GBMs, su expresión fue asociada con una pobre supervivencia de los pacientes <sup>153</sup> y ha sido identificada como parte del eje regulador AUKRA-miR-124- circMMP9 <sup>154,124</sup> . AUKRA aumenta la proliferación de las células de GBMs <sup>155</sup> .	13

Para visualizar la interacción entre los genes hub calculados y su miRNA correspondiente, se realizó una red de interacción miRNA-mRNA blanco, la cual se muestra en las **Figura 9** y **Figura 10**.

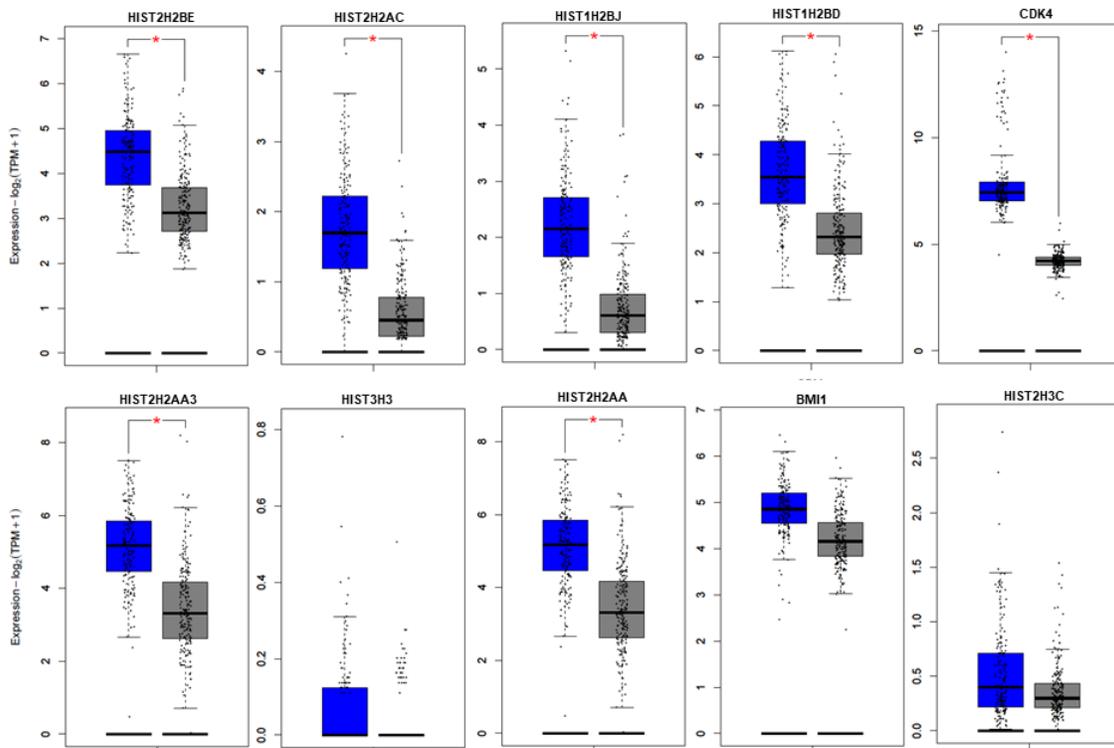


**Figura 9.** Red de miRNA-mRNA para los genes hub de los miRNAs regulados a la baja por P4. En verde se indican los miRNAs y sus genes blanco se muestran en azul.



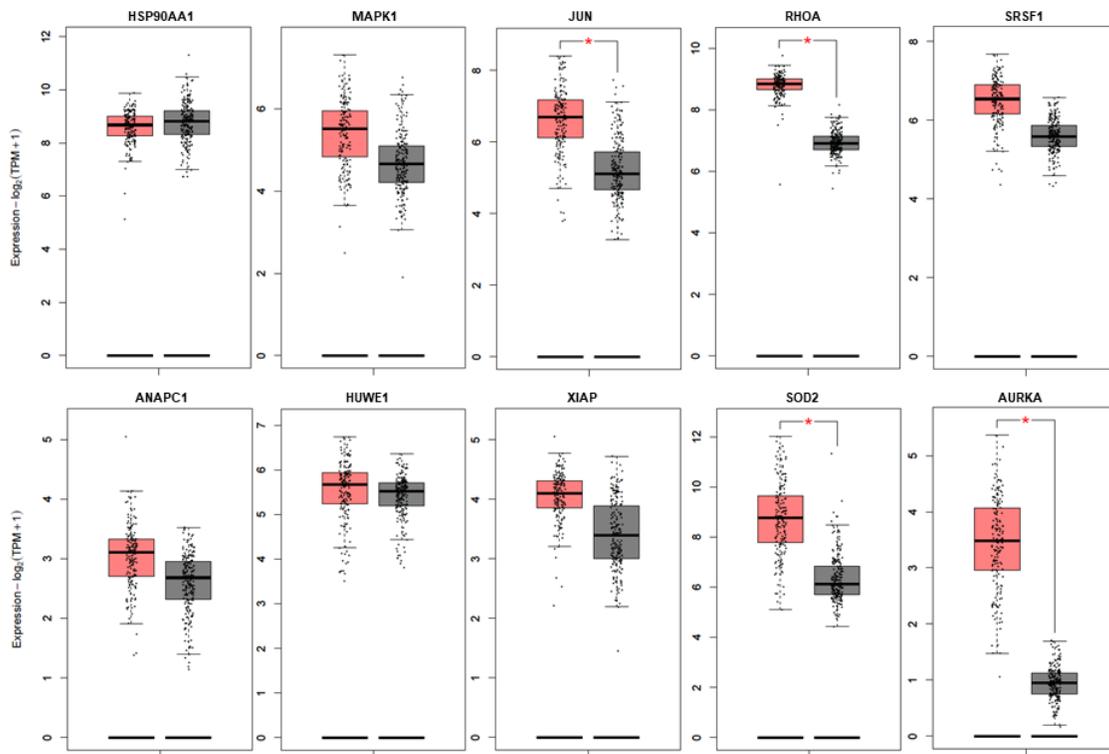
**Figura 10.** Red de miRNA-mRNA para los genes hub de los miRNAs regulados a la alta por P4. En verde se indican los miRNAs y sus genes blanco se muestran en rojo.

Posteriormente, se usó la base de datos GEPIA para comparar los niveles de expresión de los 20 genes hub en GBMs respecto al tejido cerebral de personas sanas. Como se muestra en **Figura 11**, la expresión de 7 genes hub de los miRNAs regulados a la baja por P4 fue significativamente alta en GBM, en comparación con el tejido cerebral de personas sanas.



**Figura 11.** Niveles de expresión de los 10 genes hub de los miRNAs regulados a la baja por P4 en biopsias de pacientes con GBMs. Datos obtenidos de la base de datos GEPIA. Los tumores se encuentran en azul y el tejido cerebral de pacientes sanos se encuentra en gris. \* $p < 0.05$ .

Por otra parte, solo JUN, RHOA, AURKA y SOD2, blanco de los miRNAs regulados a la alta por P4, mostraron un incremento significativo en su expresión en las biopsias de GBMs respecto al tejido cerebral de personas sanas; los 6 genes hub restantes: HAP90AA1, MAPK1, SRSF1, ANAPC1, HUWE1 y XIAP no mostraron cambios significativos en su expresión en GBMs respecto a los controles (**Figura 12**). El aumento de estos 4 genes hub fue contrario a lo que se esperaba.



**Figura 12.** Niveles de expresión de los 10 genes hub de los miRNAs regulados a la alta por P4 en biopsias de pacientes con GBMs. Datos obtenidos de la base de datos GEPIA. Los tumores se encuentran en rojo y el tejido cerebral de pacientes sanos se encuentra en gris. \*P < 0.05.

## 10. DISCUSIÓN

El GBM, un astrocitoma grado IV, es el tumor cerebral más agresivo y común en adultos. Estudios recientes sugieren que alteraciones en la expresión de los miRNAs son un factor importante para la progresión de los GBMs. La alteración en el perfil de expresión de miRNAs por hormonas esteroides ha sido establecida en cánceres de tejidos sensibles a hormonas, pero no en GBM. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de miRNAs regulados por P4 en células derivadas de GBMs.

Encontramos un set de 190 miRNAs totales regulados por alguno de los tratamientos P4, RU486 y P4+RU486 en células U251 derivadas de un GBM humano. De estos 190 miRNAs, solo 16 fueron exclusivamente regulados por P4, cuyo efecto fue bloqueado por RU486 (un antagonista de PR). Otro conjunto de miRNAs presentó cambios en su expresión únicamente con el tratamiento de

RU486, lo que sugiere que el RU486 por si solo podría ejercer un efecto sobre la expresión de los miRNAs, probablemente debido a la afinidad que tiene el RU486 también por el receptor a glucocorticoides<sup>156,157</sup> por lo que estaría interfiriendo en otras vías. En el análisis de los microarreglos también se encontró que el tratamiento de P4+RU486 modificó la expresión de varios miRNAs, lo cual sugiere que el antagonista, RU486, podría actuar como agonista parcial. A este respecto, también podría ser que el antagonista RU486 afecte al PR intracelular pero al añadir P4 lo que se podría estar observando es el efecto dado por la activación de los mPRs (receptores de progesterona membranales).

Al realizar una búsqueda en la literatura de los 16 miRNAs regulados por P4 en células U251, se encontró que únicamente el miRNA hsa-miR-485-3p, regulado a la baja por P4 en el análisis de los microarreglos realizado en este trabajo, ha sido previamente evaluado en células de GBMs. Al igual que en este análisis, Zhang et al., (2019) encontraron que hsa-miR-485-3p se expresa a la baja en biopsias de pacientes respecto al tejido cerebral sano y que su gen blanco es la proteína 35 dedo anular (RNF135). Al silenciar a RNF135, el hsa-miR-485-3p inactivó la vía de MAPK/ERK1/2 en células de GBMs, mientras que ensayos funcionales demostraron que dicho miRNA inhibió la proliferación y la migración de células de GBM, lo que fue revertido por la sobreexpresión de RNF135| sugiriéndose que el miRNA hsa-miR-485-3p tiene una función supresora de tumor en GBMs.

Para evaluar la posible función de los genes blanco de los miRNAs con expresión diferencial en el tratamiento con P4, se realizó una anotación funcional en la ontología de genes (Gene Ontology: GO) y un análisis de enriquecimiento de vías en Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG). Para este análisis se definieron dos sets de genes, uno correspondiente a los genes blanco de los miRNAs regulados a la baja por P4, y el otro a los genes blanco de los miRNAs regulados a la alta. La anotación funcional de genes GO reveló que los genes blanco de los miRNAs regulados a la baja podrían estar involucrados de manera muy general, en procesos como la modificación postranscripcional de histonas, el ensamblaje de la cromatina, ensamblaje del nucleosoma, progresión del ciclo celular, unión de RNA y la regulación de la transcripción; mientras que el análisis de enriquecimiento de vías

KEGG nos brindó algunas vías no relacionadas con el cáncer (Lupus eritematoso sistémico y alcoholismo), así como también nos proporcionó vías previamente caracterizadas en cáncer y específicamente en GBMs, tales como ciclo celular<sup>158</sup>, vías de señalización de MAPK<sup>133,134,159,160</sup> y la regulación de la pluripotencia de las células troncales<sup>133,161,162</sup>.

Respecto a los genes blanco de los miRNAs regulados a la alta por P4, estos se vieron relacionados con términos GO como la regulación de la transcripción, modificaciones de la histona H3K4, regulación de la vía TGF-beta, estructura de la cromatina y conformación del citoesqueleto; dichos procesos GO podrían participar en vías como la de las vesículas sinápticas, la vía que mantiene las uniones estrechas, la vía de señalización de TGF-beta, que coincide perfectamente con el término GO enriquecido por estos genes, y la vía de señalización de IL-17. Particularmente en GBMs, la secreción de VEGF por las células cancerosas, inhibe la formación de las uniones estrechas<sup>163</sup>, e interesantemente, la P4 incrementa la expresión de VEGF en líneas celulares derivadas de GBMs<sup>123</sup>. Con base en estos datos, se podría especular que una posible vía por la cual la P4 incrementa la malignidad de los GBMs, es mediante la regulación de miRNAs que afectan la disponibilidad de VEGF y el mantenimiento de las uniones estrechas. Respecto a la vía de TGF-beta, se sabe que la expresión TGF-beta es regulada a la alta directamente por P4 a través del PR<sup>123</sup>; entonces, podría sugerirse que el aumento en la expresión de este gen podría deberse al silenciamiento de represores de la vía, por la acción de los miRNAs regulados a la alta por P4. Finalmente, al buscar una relación entre la vía de IL-17 y GBMs, se encontró que la expresión de IL-17 se ha relacionado positivamente con la supervivencia de pacientes con GBM<sup>164</sup>; en este caso, podría especularse que la P4 disminuye la expresión de IL-17 mediante la regulación a la alta de miRNAs dirigidos a activadores de esta vía.

El análisis de la red de interacción proteína-proteína (IPP), realizada con los genes blanco de los miRNAs regulados por P4, permitió determinar una lista de genes hub que podrían ser importantes en la regulación de la malignidad de los GBMs. 8 de los 10 genes hub determinados a partir de los blanco de los miRNAs regulados a la baja por P4, corresponden a histonas por lo que se esperaría que estas se

expresen a la alta en GBMs; una forma de confirmar esta deducción fue a través de los datos de expresión obtenidos de la base de datos de GEPIA. De acuerdo con estos datos, se determinó que la expresión de 7 de las 8 histonas corresponde con la expresión de sus miRNAs reguladores; sorpresivamente, de estas 8 histonas, solo 1 ha sido caracterizada previamente en GBMs, la histona HIST2H2BE<sup>117</sup>. Además de las histonas, los genes BMI1 y CDK4 fueron genes hub de los miRNAs regulados a la baja por P4, y de acuerdo con los resultados de su expresión en GEPIA, solo CDK4 se expresa a la alta significativamente; sin embargo, al consultar en la bibliografía, BMI1 también se expresa a la alta en GBMs, específicamente en células troncales de GBMs (GSC)<sup>127-129,161</sup>. La expresión a la alta del conjunto de genes descrito previamente corresponde al perfil de expresión de células en proliferación. Los genes hub de los miRNAs regulados a la alta por P4 son variados, podemos encontrar genes involucrados en el ciclo celular, proliferación, invasión, migración, genes inhibidores de apoptosis, genes que participan en la defensa antioxidante. Sin embargo, al verificar su expresión en la base de datos GEPIA y en la bibliografía, obtuvimos resultados contrarios a lo esperado, es decir que estos genes se encuentran altamente expresado en GBMs, y esto podría ser porque sucede una inhibición traduccional debida a los miRNAs sin la degradación concomitante del mRNA blanco; o a pesar de la predicción realizada por las bases de datos, estos mRNAs podrían no ser blanco de los miRNAs. Además, siguiendo con los resultados no esperados, otra posible explicación podría ser la participación de mecanismos de regulación más complejos, como ejemplo se tiene al gen AUKRA, que ha sido descrito como parte de un eje de regulación entre el RNA circular circMMP9 y el miRNA hsa-miR-124, en donde la RNA circular secuestra al miRNA y evita que cumpla su función de silenciar al gen AUKRA<sup>124</sup>. Con esta evidencia podemos hipotetizar que los miRNAs reguladores de los genes hub podrían someterse a otro nivel de regulación al incluir RNAs circulares<sup>165</sup> o RNAs largos no codificantes (lncRNAs), que también tienen elementos de respuesta a miRNAs<sup>166</sup>. Finalmente, la red de interacción entre genes hub y sus miRNAs permite visualizar un poco la complejidad que existe en la regulación génica por miRNAs, en donde un miRNA puede regular a más de un gen y un gen puede estar regulado por varios miRNAs; además, el valor de la red está en la visualización y demostración de aquellos

miRNAs regulados por P4, que tendrían un mayor peso e importancia en la progresión de los GBMs.

Finalmente, como perspectivas de este trabajo, queda validar los microarreglos mediante RT-qPCR de los miRNAs con mayor tasa de cambio, de manera inicial, y después validar la expresión de los miRNAs con mayor peso en la red de regulación P4-miRNAs en GBMs. Posteriormente, los miRNAs cuya expresión coincida con lo observado en el análisis de los microarreglos, tendrían que ser sometidos a una validación funcional; es decir, se tendría que evaluar la expresión, a nivel de mensajero y de la proteína, de sus genes blanco bajo las mismas condiciones/tratamiento que su miRNA regulador. Este abordaje podrá ayudar a determinar miRNAs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra los GBMs.

## 11. CONCLUSIÓN

Este trabajo presenta de manera general cambios globales en el perfil de expresión de miRNAs en células de GBM humano inducidos por P4. El análisis de expresión de los microarreglos identificó a 8 miRNAs regulados a la baja y a 8 miRNAs regulados a la alta por el tratamiento con P4. Como resultado de los análisis bioinformáticos se encontró que esta hormona a través de regular la expresión de miRNAs podría regular procesos como la proliferación, la progresión del ciclo celular y la migración de las células de los GBMs, a través de una red de interacción de miRNAs-mRNA.

## 12. REFERENCIAS

1. McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*. 2016;34(4):981-998. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.014
2. Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1(15017). doi:10.1038/nrdp.2015.17
3. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary

brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro-oncology*. 2019;19(5):v1-v88. doi:10.1093/neuonc/nox158

4. González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M a, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain research bulletin*. 2001;56(1):43-48. doi:10.1016/S0361-9230(01)00590-1
5. Cabrera-M Noz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, et al. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;113:80-84. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.11.009
6. Valadez-Cosmes P, Germán-Castelán L, González-Arenas A, Velasco-Velázquez MA, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I. Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2015;154:176-185. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.08.006
7. Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*. 2016;105:19-25. doi:10.1016/j.steroids.2015.11.008
8. González-Morán G, Camacho-Arroyo I. Changes in the presence of progesterone receptor isoforms in the oviduct magnum of newly-hatched chicks after gonadotropins treatment. *Life Sciences*. 2003;73(7):871-882. doi:10.1016/S0024-3205(03)00353-9
9. Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *BioMed Research International*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/393174
10. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014;9(1):287-314. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715
11. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5

12. Cittelly DM, Finlay-Schultz J, Howe EN, et al. Progesterin suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4. *Oncogene*. 2013;32(20):2555-2564. doi:10.1038/onc.2012.275
13. Rivas MA, Venturutti L, Huang Y, Schillaci R, Huang TH. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Research*. 2012;14(3):R77. doi:10.1186/bcr3187
14. Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, Howe EN, Bain DL, Richer JK. Progesterin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;355(1):15-24. doi:10.1016/j.mce.2011.12.020
15. Finlay-Schultz J, Cittelly DM, Hendricks P, et al. Progesterone downregulation of miR-141 contributes to expansion of stem-like breast cancer cells through maintenance of progesterone receptor and Stat5a. *Oncogene*. 2015;34(28):3676-3685. doi:10.1038/onc.2014.298
16. Godbole M, Chandrani P, Gardi N, et al. miR-129-2 mediates down-regulation of progesterone receptor in response to progesterone in breast cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*. 2017;18(10):801-805. doi:10.1080/15384047.2017.1373216
17. McFall T, McKnight B, Rosati R, et al. Progesterone receptor A promotes invasiveness and metastasis of luminal breast cancer by suppressing regulation of critical microRNAs by estrogen. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;293(4):1163-1177. doi:10.1074/jbc.M117.812438
18. Muti P, Donzelli S, Sacconi A, et al. MiRNA-513a-5p inhibits progesterone receptor expression and constitutes a risk factor for breast cancer: The hOrmones and Diet in the Etiology of breast cancer prospective study. *Carcinogenesis*. 2018;39(2):98-108. doi:10.1093/carcin/bgx126
19. Nothnick WB, Healy C, Hong X. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. *Endocrine*. 2010;37(2):265-273. doi:10.1007/s12020-009-9293-9
20. Mercatelli N, Galardi S, Ciafrè SA. MicroRNAs as Multifaceted Players in Glioblastoma Multiforme. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol 333. Academic Press; 2017:269-323.

doi:10.1016/bs.ircmb.2017.03.002

21. Novakova J, Slaby O, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;386(1):1-5. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.034
22. Aldaz B, Sagardoy A, Nogueira L, et al. Involvement of miRNAs in the Differentiation of Human Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cells. *PLoS ONE*. 2013;8(10):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0077098
23. Alfardus H, McIntyre A, Smith S. MicroRNA Regulation of Glycolytic Metabolism in Glioblastoma. *BioMed Research International*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/9157370
24. Sana J, Busek P, Fadrus P, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-11. doi:10.1038/s41598-018-20929-6
25. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;334(4):1351-1358. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.030
26. Bronisz A, Godlewski J, Chiocca EA. Extracellular Vesicles and MicroRNAs: Their Role in Tumorigenicity and Therapy for Brain Tumors. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):361-376. doi:10.1007/s11897-014-0247-z.Pathophysiology
27. Brodie C, Buchris E, Lee HK. miRNA Expression and Functions in Glioma and Glioma Stem Cells. In: *MicroRNA Targeted Cancer Therapy*. Springer International Publishing Switzerland 2014; 2014:29-50. doi:10.1007/978-3-319-05134-5
28. Lang MF, Yang S, Zhao C, et al. Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells. *PLoS ONE*. 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0036248
29. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(November):396-401. doi:10.1038/nature03031.1.
30. Sheila K. Singh, Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia

- Hawkins, Jeremy Squire A, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63:5821-5828. doi:10.1073\_pnas.0530291100
31. Lathia J, Mack S. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & development.* 2015;1203-1217. doi:10.1101/gad.261982.115.tumors
  32. Laug D, Glasgow SM, Deneen B. A glial blueprint for gliomagenesis. *Nature Reviews Neuroscience.* 2018.
  33. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
  34. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development.* 2007;21(21):2683-2710. doi:10.1101/gad.1596707
  35. Urbanska K, Sokolowska J, Szmids M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - An overview. *Wspolczesna Onkologia.* 2014;18(5):307-312. doi:10.5114/wo.2014.40559
  36. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-1812. doi:10.1126/science.1164382.An
  37. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology and Therapeutics.* 2015;152:63-82. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005
  38. McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068. doi:10.1038/nature07385
  39. Davis ME. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing.* 2016;20(5):1-8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
  40. Louis DN. MOLECULAR PATHOLOGY OF MALIGNANT GLIOMAS. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2006;1(1):97-117. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100043
  41. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized

- by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):38-46. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.An
42. Brennan CW, Verhaak RGW, Mckenna A, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*. 2013;155:462-477. doi:10.1016/j.cell.2013.09.034
  43. Louis D, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. *WHO Classification of Tumor of the Central Nervous System 4th Edition*. 4 th. (Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, eds.); 2007.
  44. Connelly JM, Malkin MG. Environmental risk factors for brain tumors. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2007;7(3):208-214. doi:10.1007/s11910-007-0032-4
  45. Wilhelmsson U, Eliasson C, Bjerkvig R, Pekny M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*. 2003;22(22):3407-3411. doi:10.1038/sj.onc.1206372
  46. Díaz NF, Díaz-Martínez NE, Velasco I, Camacho-Arroyo I. Progesterone increases dopamine neurone number in differentiating mouse embryonic stem cells. *Journal of Neuroendocrinology*. 2009;21(8):730-736. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01891.x
  47. Genazzani AR, Stomati M, Morittu A, et al. Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Human Reproduction*. 2000;15(SUPPL. 1):14-27. doi:10.1093/humrep/15.suppl\_1.14
  48. Camacho-Arroyo I, Hansberg-Pastor V, Vázquez-Martínez ER, Cerbón M. *Mechanism of Progesterone Receptor Action in the Brain*. Vol 3.; 2017. doi:10.1016/B978-008088783-8.00045-0
  49. Valadez-Cosmes P, Vázquez-Martínez ER, Cerbón M, Camacho-Arroyo I. Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016;434:166-175. doi:10.1016/j.mce.2016.06.027
  50. Faivre EJ, Daniel AR, Hillard CJ, Lange CA. Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Molecular Endocrinology*. 2008;22(4):823-837. doi:10.1210/me.2007-0437

51. Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP. The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Molecular Endocrinology*. 2007;21(2):359-375. doi:10.1210/me.2006-0337
52. Charles NJ, Thomas P, Lange CA. Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPR/PAQR) in Ovarian Cancer Cells: Implications for Progesterone-Induced Signaling Events. *Hormones and Cancer*. 2010;1(4):167-176. doi:10.1007/s12672-010-0023-9
53. Cai Z, Stocco C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology*. 2005;146(12):5522-5532. doi:10.1210/en.2005-0759
54. Kowalik MK, Rekawiecki R, Kotwica J. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reproductive Biology*. 2013;13(4):279-289. doi:10.1016/j.repbio.2013.09.001
55. Karteris E, Zervou S, Pang Y, et al. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(7):1519-1534. doi:10.1210/me.2005-0243
56. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
57. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906. doi:10.1038/35002607
58. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003;9:175-179. doi:10.1261/rna.2146903
59. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probably regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-862.  
<http://www.sciencemag.org/content/294/5543/858.full%0Apapers3://publication/doi/10.1126/science.1065062>.

60. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes Coding for Small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-858. doi:10.1126/science.1064921
61. Llave C. Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *the Plant Cell Online*. 2002;14(7):1605-1619. doi:10.1105/tpc.003210
62. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(90001):109D - 111. doi:10.1093/nar/gkh023
63. Griffiths-Jones S. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(Database):1291-12910. doi:10.1002/0471250953.bi1209s29
64. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(SUPPL. 1):152-157. doi:10.1093/nar/gkq1027
65. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: Regulating the regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;48(1):51-68. doi:10.3109/10409238.2012.738643
66. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419. doi:10.1038/nature01957
67. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, et al. microRNA nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. *Trends Genet*. 2015;21(11):613-626. doi:10.1126/science.1249098.Sleep
68. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(2):126-139. doi:10.1038/nrm2632
69. Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(16):4622-4629. doi:10.1093/nar/gkl458
70. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*. 2003;17(24):3011-3016. doi:10.1101/gad.1158803
71. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Lint E, Tuschl T, Zamore PD. A Cellular Function for the RNA-Interference Temporal RNA Small let-7 Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science*.

2010;293(5531):1-6. doi:10.1126/science.1062961

72. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;4(436):740-744. doi:10.1038/nature03868.TRBP
73. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Catherine P. Dicer–TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*. 2015;57(3):397-407. doi:10.1016/j.molcel.2014.11.030.Dicer
74. Iorio M V., Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*. 2012;4(3):143-159. doi:10.1002/emmm.201100209
75. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009;11(3):228-234. doi:10.1038/ncb0309-228
76. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*. 2005;3(3):0404-0418. doi:10.1371/journal.pbio.0030085
77. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
78. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(23):9667-9672. doi:10.1073/pnas.0703820104
79. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2012;19(6):586-593. doi:10.1038/nsmb.2296
80. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005;7(7):719–723. doi:10.1002/ar.20849.3D
81. Henke JI, Goergen D, Zheng J, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO Journal*. 2008;27(24):3300-3310. doi:10.1038/emboj.2008.244
82. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from Repression to Activation:

- MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*. 2007;318(December):1931-1934.
83. Morin RD, Connor MDO, Griffith M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Research*. 2008;18(4):610-621. doi:10.1101/gr.7179508.4
  84. Liang T, Yu J, Liu C, Guo L. IsomiR expression patterns in canonical and Dicer-independent microRNAs. *Molecular Medicine Reports*. 2017;15(3):1071-1078. doi:10.3892/mmr.2017.6117
  85. Ruby GJ, Jan CJ, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-89. doi:10.1080/10810730902873927. Testing
  86. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*. 2011;93(11):1897–1904. doi:10.1007/s10439-011-0452-9. Engineering
  87. González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*. 2007;32(2):129-135. doi:10.1007/s12020-007-9023-0
  88. Zamora-Sánchez C, del Moral-Morales A, Hernández-Vega A, et al. Allopregnanolone Alters the Gene Expression Profile of Human Glioblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3):864. doi:10.3390/ijms19030864
  89. Zamora-Sánchez CJ, Hansberg-Pastor V, Salido-Guadarrama I, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I. Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids*. 2017;119:36-42. doi:10.1016/j.steroids.2017.01.004
  90. González-Arenas A, Cabrera-Wrooman A, Díaz NF, et al. Progesterone Receptor Subcellular Localization and Gene Expression Profile in Human Astrocytoma Cells Are Modified by Progesterone. *Nuclear Receptor Research*. 2014;1:1-10. doi:10.11131/2014/101098
  91. Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 11):1833-1840. doi:10.1242/jcs.03450
  92. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-

- regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(24):15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
93. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(11):857-866. doi:10.1038/nrc1997
  94. Davison TS, Johnson CD, Andruss BF. Analyzing Micro-RNA Expression Using Microarrays. *Methods in Enzymology*. 2006;411:14-34. doi:10.1016/S0076-6879(06)11002-2
  95. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-838. doi:10.1038/nature03702
  96. Krützfeldt J, Kuwajima S, Braich R, et al. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(9):2885-2892. doi:10.1093/nar/gkm024
  97. Bader AG, Brown D, Winkler M. The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Research*. 2010;7(18):7027–7030. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2010.The
  98. Kim T-M, Huang W, Park R, Park PJ, Johnson MD. A Developmental Taxonomy of Glioblastoma Defined and Maintained By MicroRNAs. *Cancer Research*. 2011;71(9):3387-3399. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4117.A
  99. Godlewski J, Ferrer-Luna R, Rooj AK, et al. MicroRNA Signatures and Molecular Subtypes of Glioblastoma: The Role of Extracellular Transfer. *Stem Cell Reports*. 2017;8(6):1497-1505. doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.024
  100. Xia HF, Jin XH, Song PP, Cui Y, Liu CM, Ma X. Temporal and spatial regulation of let-7a in the uterus during embryo implantation in the rat. *The Journal of reproduction and development*. 2010;56(1):73-78. doi:JST.JSTAGE/jrd/09-088K [pii]
  101. Nie L, Zhao YB, Pan JL, et al. Progesterone-Induced miR-152 Inhibits the Proliferation of Endometrial Epithelial Cells by Downregulating WNT-1. *Reproductive Sciences*. 2017;24(10):1444-1453. doi:10.1177/1933719116689595
  102. Renthal NE, Chen C-C, Williams KC, Gerard RD, Prange-Kiel J, Mendelson CR. miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences.* 2010;107(48):20828-20833.  
doi:10.1073/pnas.1008301107
103. Williams KC, Renthal NE, Condon JC, Gerard RD, Mendelson CR. MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(19):7529-7534.  
doi:10.1073/pnas.1200650109
  104. Aghajanova L, Giudice LC. Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis. *Reproductive Sciences.* 2011;18(3):229-251. doi:10.1177/19337191110386241
  105. Zhou M, Fu J, Xiao L, et al. MiR-196a overexpression activates the MEK/ERK signal and represses the progesterone receptor and decidualization in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Human Reproduction.* 2016;31(11):2598-2608. doi:10.1093/humrep/dew223
  106. Wendler A, Keller D, Albrecht C, Peluso J, Wehling M. Involvement of let-7/miR-98 microRNAs in the regulation of progesterone receptor membrane component 1 expression in ovarian cancer cells. *Oncology reports.* 2011;25:273-279. doi:10.3892/or
  107. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, et al. DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Research.* 2018;46(D1):D239-D245.  
doi:10.1093/nar/gkx1141
  108. Dweep H, Gretz N, Sticht C. MiRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in Molecular Biology.* 2014;1182:289-305.  
doi:10.1007/978-1-4939-1062-5\_25
  109. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research.* 2013;41(Web Server issue):W169-73.  
doi:10.1093/nar/gkt393
  110. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife.* 2015;4(AUGUST2015):1-38.  
doi:10.7554/eLife.05005
  111. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5

- gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14. doi:10.1186/1471-2105-14-128
112. Blake JA, Christie KR, Dolan ME, et al. Gene ontology consortium: Going forward. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(D1):D1049-D1056. doi:10.1093/nar/gku1179
113. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D353-D361. doi:10.1093/nar/gkw1092
114. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*. 2017;45. doi:10.1093/nar/gkw937
115. Higurashi M, Ishida T, Kinoshita K. Identification of transient hub proteins and the possible structural basis for their multiple interactions. *Protein Science*. 2008;17(1):72-78. doi:10.1110/ps.073196308
116. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(W1):W98-W102. doi:10.1093/nar/gkx247
117. Berenguer-Daizé C, Astorgues-Xerri L, Odore E, et al. OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, displays in vitro and in vivo antitumor effects alone and in combination with conventional therapies in glioblastoma models. *International Journal of Cancer*. 2016;139(9):2047-2055. doi:10.1002/ijc.30256
118. Monteiro FL, Vitorino R, Wang J, et al. The histone H2A isoform Hist2h2ac is a novel regulator of proliferation and epithelial–mesenchymal transition in mammary epithelial and in breast cancer cells. *Cancer Letters*. 2017;396:42-52. doi:10.1016/j.canlet.2017.03.007
119. Li X, Tian R, Gao H, et al. Identification of a histone family gene signature for predicting the prognosis of cervical cancer patients. *Scientific Reports*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-16472-5
120. Chen Q, Wang L, Jiang M, et al. E2F1 interactive with BRCA1 pathway induces HCC two different small molecule metabolism or cell cycle regulation via mitochondrion or CD4+T to cytosol. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(2):1213-1221. doi:10.1002/jcp.25988

121. Huang XC, Maimaiti XYM, Huang CW, et al. Synergistic effects of arsenic trioxide combined with ascorbic acid in human osteosarcoma MG-63 cells: a systems biology analysis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2014;18(24):3877-3888.
122. Lin HP, Jiang SS, Chuu CP. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 cip1 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS ONE*. 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0031286
123. Hernández-Hernández OT, González-García TK, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2012;132(1-2):127-134. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.04.005
124. Wang R, Zhang S, Chen X, et al. EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis. *Molecular Cancer*. 2018;17(1). doi:10.1186/s12943-018-0911-0
125. Prokopczyk B, Sinha I, Trushin N, Freeman WM, El-Bayoumy K. Gene expression profiles in HPV-immortalized human cervical cells treated with the nicotine-derived carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Chemico-Biological Interactions*. 2009;177(3):173-180. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.051
126. Castel D, Philippe C, Calmon R, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathologica*. 2015;130(6):815-827. doi:10.1007/s00401-015-1478-0
127. Jin X, Kim LJY, Wu Q, et al. Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition. *Nature Medicine*. 2017;23(11):1352-1361. doi:10.1038/nm.4415
128. Elango R, Vishnubalaji R, Manikandan M, et al. Concurrent targeting of BMI1 and CDK4/6 abrogates tumor growth in vitro and in vivo. *Scientific Reports*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-50140-0
129. Peng G, Liao Y, Shen C. miRNA-429 Inhibits Astrocytoma Proliferation and

- Invasion by Targeting BMI1. *Pathology and Oncology Research*. 2017;23(2):369-376. doi:10.1007/s12253-016-0113-2
130. Shan Z, Tian R, Zhang M, et al. miR128-1 inhibits the growth of glioblastoma multiforme and glioma stem-like cells via targeting BMI1 and E2F3. *Oncotarget*. 2016;7(48). doi:10.18632/oncotarget.12385
  131. Kim YW, Kwon CH, Liu JL, Kim SH, Kim S. Cancer Association Study of Aminoacyl-tRNA Synthetase Signaling Network in Glioblastoma. *PLoS ONE*. 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0040960
  132. Zhang Y, Sui R, Chen Y, Liang H, Shi J, Piao H. Downregulation of miR-485-3p promotes glioblastoma cell proliferation and migration via targeting RNF135. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019;18(1). doi:10.3892/etm.2019.7600
  133. Nicolas S, Abdellatef S, Haddad M Al, Fakhoury I, El-Sibai M. Hypoxia and EGF Stimulation Regulate VEGF Expression in Human Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells by Differential Regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK Pathways. *Cells*. 2019;8(11):1397. doi:10.3390/cells8111397
  134. Yang PY, Kang W, Pan YW, Zhao XJ, Duan L. Overexpression of HOXC6 promotes cell proliferation and migration via MAPK signaling and predicts a poor prognosis in glioblastoma. *Cancer Management and Research*. 2019;11:8167-8179. doi:10.2147/CMAR.S209904
  135. Kouhkan F, Mobarra N, Soufi-Zomorrod M, et al. MicroRNA-129-1 acts as tumour suppressor and induces cell cycle arrest of GBM cancer cells through targeting IGF2BP3 and MAPK1. *Journal of Medical Genetics*. 2015;53(1):24-33. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103225
  136. Antonyak MA, Kenyon LC, Godwin AK, et al. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene*. 2002;21(33):5038-5046. doi:10.1038/sj.onc.1205593
  137. Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkB transcription factors. *Journal of Neurochemistry*. 2007;102(2):522-538. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04633.x
  138. Tsuiki H, Tnani M, Okamoto I, et al. Constitutively active forms of c-Jun NH2-terminal kinase are expressed in primary glial tumors. *Cancer Research*.

2003;63(1):250-255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517805>.  
Accessed February 21, 2020.

139. Yu OM, Benitez JA, Plouffe SW, et al. YAP and MRTF-A, transcriptional co-activators of RhoA-mediated gene expression, are critical for glioblastoma tumorigenicity. *Oncogene*. 2018;37(41):5492-5507. doi:10.1038/s41388-018-0301-5
140. Liu G, Yan T, Li X, et al. Daam1 activates RhoA to regulate Wnt5a-induced glioblastoma cell invasion. *Oncology Reports*. 2018;39(2):465-472. doi:10.3892/or.2017.6124
141. Barbagallo D, Caponnetto A, Cirnigliaro M, et al. CircSMARCA5 inhibits migration of glioblastoma multiforme cells by regulating a molecular axis involving splicing factors SRSF1/SRSF3/PTB. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2). doi:10.3390/ijms19020480
142. Kim SH, Ho JN, Jin H, et al. Upregulated expression of BCL2, MCM7, and ccne1 indicate cisplatin-resistance in the set of two human bladder cancer cell lines: T24 cisplatin sensitive and T24R2 cisplatin resistant bladder cancer cell lines. *Korean Journal of Urology*. 2016;57(1):63-72. doi:10.4111/iku.2016.57.1.63
143. Melloy PG. The anaphase-promoting complex: A key mitotic regulator associated with somatic mutations occurring in cancer. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2020;59(3):189-202. doi:10.1002/gcc.22820
144. Su C, Wang T, Zhao J, Cheng J, Hou J. Meta-analysis of gene expression alterations and clinical significance of the HECT domain-containing ubiquitin ligase HUWE1 in cancer. *Oncology Letters*. 2019;18(3):2292-2303. doi:10.3892/ol.2019.10579
145. Yang D, Cheng D, Tu Q, et al. HUWE1 controls the development of non-small cell lung cancer through down-regulation of p53. *Theranostics*. 2018;8(13):3517-3529. doi:10.7150/thno.24401
146. Kao SH, Wu HT, Wu KJ. Ubiquitination by HUWE1 in tumorigenesis and beyond. *Journal of Biomedical Science*. 2018;25(1). doi:10.1186/s12929-018-0470-0
147. Adhikary S, Marinoni F, Hock A, et al. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation.

*Cell*. 2005;123(3):409-421. doi:10.1016/j.cell.2005.08.016

148. Tirapelli DP da C, Lustosa IL, Menezes SB, et al. Alta expressão de XIAP e Bcl-2 pode inibir morte celular programada em glioblastomas. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2017;75(12):875-880. doi:10.1590/0004-282x20170156
149. Carrasco-Garcia E, Martinez-Lacaci I, Mayor-López L, et al. PDGFR and IGF-1R Inhibitors Induce a G2/M Arrest and Subsequent Cell Death in Human Glioblastoma Cell Lines. *Cells*. 2018;7(9):131. doi:10.3390/cells7090131
150. Kusaczuk M, Krętowski R, Naumowicz M, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2018;13:2279-2294. doi:10.2147/IJN.S158393
151. Cholia RP, Kumari S, Kumar S, et al. An in vitro study ascertaining the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose oxidase in modulation of antioxidant potential and cancer cell survival mechanisms in glioblastoma U-87 MG cells. *Metabolic Brain Disease*. 2017;32(5):1705-1716. doi:10.1007/s11011-017-0057-6
152. Tanaka H, Mizuno M, Katsumata Y, et al. Oxidative stress-dependent and -independent death of glioblastoma cells induced by non-thermal plasma-exposed solutions. *Scientific Reports*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-50136-w
153. Zhong S, Jiang SS, Peng Y Da, Chen Y. Further Investigation About Copy Number Variations and Methylation of AURKA, KIF4A, and NUSAP1 in Glioblastoma. *World Neurosurgery*. 2018;110:513-514. doi:10.1016/j.wneu.2017.11.180
154. Qiao W, Guo B, Zhou H, et al. miR-124 suppresses glioblastoma growth and potentiates chemosensitivity by inhibiting AURKA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;486(1):43-48. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.120
155. Zumber CT, Usubalieva A, King PD, et al. The CNS penetrating taxane TPI 287 and the AURKA inhibitor alisertib induce synergistic apoptosis in glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*. 2018;137(3):481-492. doi:10.1007/s11060-018-2755-2

156. Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annual review of medicine*. 1997;48:129-156. doi:10.1146/annurev.med.48.1.129
157. Catalano RD, Yanaihara A, Evans AL, et al. The effect of RU486 on the gene expression profile in an endometrial explant model. doi:10.1093/molehr/gag060
158. Yang W, Warrington N, Taylor S, et al. Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Science translational medicine*. 2019;11:1-14.
159. Zhou L, Tang H, Wang F, et al. Bioinformatics analyses of significant genes, related pathways and candidate prognostic biomarkers in glioblastoma. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(5):4185-4196. doi:10.3892/mmr.2018.9411
160. Zhang S, Wan Y, Pan T, et al. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma U251 stem cells to chemotherapeutic drug temozolomide. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;47(2):346-356. doi:10.1007/s12031-012-9759-8
161. Shan ZN, Tian R, Zhang M, et al. miR128-1 inhibits the growth of glioblastoma multiforme and glioma stem-like cells via targeting BMI1 and E2F3. *Oncotarget*. 2016;7(48):78813-78826. doi:10.18632/oncotarget.12385
162. Gal H, Pandi G, Kanner AA, et al. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(1):86-90. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.107
163. Wen L, Tan Y, Dai S, et al. Vegf-mediated tight junctions pathological fenestration enhances doxorubicin-loaded glycolipid-like nanoparticles traversing bbb for glioblastoma-targeting therapy. *Drug Delivery*. 2017;24(1):1843-1855. doi:10.1080/10717544.2017.1386731
164. Cui X, Xu Z, Zhao Z, et al. Analysis of CD137I and IL-17 expression in tumor tissue as prognostic indicators for glioblastoma. *International Journal of Biological Sciences*. 2013;9(2):134-141. doi:10.7150/ijbs.4891
165. Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016;1859(1):163-168. doi:10.1016/j.bbagr.2015.07.007

166. Paraskevopoulou MD, Hatzigeorgiou AG. Analyzing MiRNA–LncRNA interactions. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1402. Humana Press Inc.; 2016:271-286. doi:10.1007/978-1-4939-3378-5\_21