



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN POR HORMONAS
SEXUALES DEL HOMÓLOGO DEL ENHANCER DE ZESTE 2 EN CÉLULAS
DERIVADAS DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

AYLIN DEL MORAL MORALES



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra
VOCAL: Profesor: María de los Ángeles Granados Silvestre
SECRETARIO: Profesor: Ignacio Camacho Arroyo
1er. SUPLENTE: Profesor: Claudia Teresa Tovar Palacio
2° SUPLENTE: Profesor: Alberto Ortega Vázquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. VALERIA HANSBERG PASTOR

SUSTENTANTE:

AYLIN DEL MORAL MORALES

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en la Facultad De Química, Universidad Nacional Autónoma De México (UNAM) bajo la autoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

A la Dra. Valeria Hansberg Pastor de la Facultad De Química, UNAM por su apoyo técnico y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Colegio De Profesores de la Facultad De Química, UNAM y a la sección 024 del AAPAUNAM por otorgar la cátedra Dr. Gabriel Siade Barquett (2018) a este proyecto de tesis.

Índice

1.	Abreviaturas	1
2.	Resumen.....	2
3.	Introducción	3
4.	Antecedentes	5
4.1.	Gliomas.....	5
4.1.1.	Generalidades	5
4.1.2.	Glioblastomas.....	8
4.2.	EZH2	9
4.2.1.	Generalidades	9
4.2.2.	Estructura y mecanismos de acción	14
4.2.3.	Papel de EZH2 en cáncer	16
4.2.4.	EZH2 en glioblastomas	19
4.3.	Progesterona (P4).....	21
4.3.1.	Generalidades	21
4.3.2.	Mecanismos de acción	22
4.3.3.	Progesterona y glioblastomas	26
4.4.	Estradiol (E2)	27
4.4.1.	Generalidades	27
4.4.2.	Mecanismo de acción.....	28
4.4.3.	Estradiol y glioblastomas.....	30
5.	Planteamiento del Problema	32
6.	Hipótesis.....	32
7.	Objetivos	33
7.1.	Objetivo general.....	33
7.2.	Objetivos particulares	33
8.	Metodología	34
8.1.	Análisis <i>in silico</i>	34
8.2.	Cultivo Celular y tratamientos hormonales	34
8.3.	Extracción de RNA y RT-qPCR.....	34
8.3.1.	Oligonucleótidos	35

8.4.	Extracción de proteínas y Western Blot.....	36
8.5.	Análisis estadístico	37
9.	Resultados	37
10.	Discusión	41
10.	Conclusiones.....	44
11.	Perspectivas	44
12.	Referencias.....	45
13.	Anexos.....	52

Índice de figuras

Figura 1.	Modificaciones postraduccionales de histonas	11
Figura 2.	Complejo Represor de Polycomb 2.	12
Figura 3.	Dominios caracterizados de la proteína EZH2.....	15
Figura 4.	Mecanismo de acción clásico de la P4.	23
Figura 5.	Mecanismo no genómico de la P4.	25
Figura 6.	Mecanismos genómicos del E2.	28
Figura 7.	Mecanismo no genómico de los receptores a estrógenos.....	30
Figura 8.	Análisis in silico de la secuencia genómica de EZH2.	38
Figura 9.	Expresión basal de EZH2.....	39
Figura 10.	Efecto de las hormonas sexuales en la expresión de EZH2 en la línea celular U87.	40
Figura 11.	Efecto del E2 sobre la cantidad de proteína EZH2.	40

Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación de glioblastomas humanos	6
----------	--	---

1. Abreviaturas

E2- Estradiol

EED - Proteína del desarrollo del ectodermo embrionario (Embryonic ectoderm development protein).

ESC- Célula troncal embrionaria

EZH2 - Homólogo del enhancer de zeste 2 (Enhancer of zeste homolog 2).

GBM- Glioblastoma

GSC- Célula troncal de glioma

IDH- Isocitrato deshidrogenasa

K-Lisina

KMT- Metil-transferasa de lisina

lncRNA- RNA largo no codificante

MAPK- Cinasas activadas por mitógenos.

miRNA- Micro RNA

P4- Progesterona

pb- Pares de bases

PcG -Grupo Polycomb (Polycomb Group)

PRC1-Complejo repressor de Polycomb 1 (Polycomb Repressive Complex 1)

PRC2-Complejo repressor de Polycomb 2 (Polycomb Repressive Complex 2)

SET- Suv(var)3-9, Enhancer-of-zeste y Tritorax

SNC- Sistema Nervioso Central

SUZ12 - Supresor de zeste 12 (Supresor of zeste 12).

V- Vehículo (DMSO 10%)

2. Resumen

El homólogo del enhancer de zeste 2 (EZH2) es la subunidad del complejo represor de Polycomb 2 (PRC2), que cataliza di y trimetilación de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27). Esta marca epigenética se ha asociado con la represión transcripcional de genes tejido-específicos. Se ha reportado que EZH2 está sobre-expresado en varios tipos de cáncer, incluidos los glioblastomas que son los tumores cerebrales primarios más frecuentes y agresivos del sistema nervioso central. La sobre-expresión de EZH2 contribuye a la progresión de estos tumores. Además, se ha demostrado que las hormonas sexuales como la progesterona (P4) aumentan la proliferación, la migración e invasión de las células de glioblastoma; mientras que el estradiol (E2) incrementa su proliferación. Sin embargo, su papel en la regulación transcripcional de EZH2 es desconocido. En este estudio, se realizó un análisis *in silico* para buscar posibles sitios de unión para receptores de hormonas sexuales en los promotores y secuencia del gen EZH2. Se encontró que hay varios elementos de respuesta a hormonas (elementos de respuesta a estrógenos y respuesta a progesterona / glucocorticoides). Para conocer si la P4 o el E2 podrían regular directamente la transcripción de EZH2, primero se determinó su expresión basal en tres líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos (U251, U87 y D54), y se encontró que todas las líneas celulares expresan diferencialmente EZH2, la línea U251 mostró el nivel más alto y U87 el más bajo. Posteriormente, se trataron las células U251 y U87 con P4 10 nM y E2 10 nM durante 12 y 24 horas. La expresión de EZH2 se evaluó por RT-qPCR y Western Blot. Los datos muestran que las tres líneas celulares evaluadas expresan EZH2 de forma variable, además de que el E2 indujo la expresión de EZH2 en la línea celular U87 a nivel de RNA mensajero después de 12 horas de tratamiento.

3. Introducción

Los astrocitomas son los tumores cerebrales malignos más frecuentes del Sistema Nervioso Central (SNC) (Hamza & Gilbert, 2014). La OMS los clasifica en cuatro grados de acuerdo a sus características histopatológicas donde el grado IV (glioblastoma) es el más agresivo (Louis et al., 2016). Actualmente las terapias disponibles (cirugía, quimioterapia y radioterapia) no resultan efectivas, ya que sólo aumentan unos meses la esperanza de vida de los pacientes (Hamza & Gilbert, 2014), por lo que es importante el estudio de estos tumores para comprender su naturaleza y poder establecer un tratamiento eficiente.

Las proteínas que forman parte del Grupo Polycomb (PcG) son represores transcripcionales que modifican la cromatina, controlan la progresión del ciclo celular y participan en el mantenimiento de la diferenciación celular (Sauvageau & Sauvageau, 2010). Este grupo está representado por los complejos represores de Polycomb 1 y 2 (PRC1 y PRC2). PRC2 es el complejo encargado de di y trimetilizar a la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) (Yin, Qiu, & Peng, 2016), marca que es leída por PRC1 el cual se une a la cromatina impidiendo que se lleve a cabo la transcripción. La marca H3K27me3 está asociada a promotores de genes silenciados y a heterocromatina facultativa (Margueron & Reinberg, 2011). La composición de ambos complejos es variable, sin embargo, PRC2 tiene tres componentes constantes: EZH2 que funge como metiltransferasa debido a que posee un dominio catalítico SET; EED que contiene dominios WD40 que sirven para identificar marcas adyacentes en histonas (metilaciones, acetilaciones, etc.) así como para anclar el complejo a la cromatina; y SUZ12 que es una desacetilasa de histonas (Wiles & Selker, 2017). Se sabe que PRC2 es requerido para mantener la identidad y diferenciación celular mediante la represión de genes tejido-específico e inhibidores de la proliferación (Sauvageau & Sauvageau, 2010). La delección del gen EZH2 en células troncales embrionarias impide la formación del complejo PRC2 y afecta de manera significativa su capacidad de diferenciación y autorrenovación (Collinson et al., 2016).

Se ha visto que EZH2 se encuentra desregulado en diversos tipos de cáncer (Scelfo, Piunti, & Pasini, 2015), entre ellos los tumores cerebrales. En glioblastomas, la sobre-expresión de este gen está directamente relacionada con la malignidad del tumor (Zhang et al., 2015) y se ha relacionado con un mal pronóstico de vida. Por otra parte, EZH2 es requerido para el mantenimiento y renovación de las células troncales de glioma (GSC), las cuales se piensa que son responsables de la resistencia a fármacos y de la reincidencia del tumor (Louis et al., 2016). Lamentablemente, aún no se sabe mucho acerca de los factores que están implicados en la regulación de la expresión del gen EZH2. Por otro lado, se sabe que las hormonas sexuales, en específico la progesterona (P4), promueve el crecimiento y desarrollo de los glioblastomas, además de que está involucrada en diversos procesos como la migración e invasión de células derivadas de estos tumores (Piña-Medina, et al, 2016).

Dado que EZH2 se encuentra sobre-expresado en biopsias de glioblastomas y que la P4 participa en diversos procesos importantes para el desarrollo y progresión de estos tumores, es probable que este gen se exprese en líneas celulares derivadas de este tipo de tumores y que su expresión sea regulada por hormonas sexuales como la P4.

4. Antecedentes

4.1. Gliomas

4.1.1. Generalidades

La palabra cáncer tiene su origen en el griego karkinos que significa cangrejo, término que fue acuñado por Hipócrates en el siglo IV a. C. (American Cancer Society, 2014; Mukherjee, 2010). Actualmente se refiere a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la proliferación celular excesiva que es resultado de la alteración de procesos involucrados en la proliferación, muerte y diferenciación celular, así como la evasión de los mecanismos que regulan el ciclo celular. Son invasivas y metastásicas, es decir pueden migrar hacia tejidos e inducir angiogénesis, además de que pueden replicarse indefinidamente (Chow, 2010; Hanahan et al., 2011). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo ya que tan sólo en 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos (OMS, 2017).

Los gliomas son los tumores primarios más frecuentes del Sistema Nervioso Central (SNC) y se clasifican de acuerdo con sus características histológicas, inmunohistoquímicas y moleculares en astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas (Furnari et al., 2007). Los astrocitomas son clasificados por la OMS en cuatro grados de malignidad que se asignan de acuerdo a características histológicas y alteraciones genéticas (Louis et al., 2016)

Los astrocitomas de grado I (también conocidos como pilocíticos) son biológicamente benignos, delimitados, de lento crecimiento y se presentan preferencialmente en niños y adultos jóvenes (Weller et al., 2015). Es característica de estos tumores la activación de la vía de cinasas activadas por mitógenos (MAPK), a tal grado de que se les conoce como “enfermedad de una sola vía”. Pueden ser curados por medio de remoción quirúrgica (Reifenberger, et al., 2016).

Los astrocitomas de grado II, también conocidos como difusos, son los astrocitomas más comunes en adultos jóvenes, se caracterizan por difusión infiltrante hacia el parénquima cerebral y su tendencia inherente a la recurrencia y progresión maligna (Weller et al., 2015). Actualmente, son divididos en dos grupos de acuerdo a su perfil molecular, los que presentan un genotipo astrocítico están caracterizados por mutación en el gen TP53, mientras que los de origen oligodendrocítico presentan co-delección de los brazos cromosómicos 1p y 19q. Ambos genotipos poseen mutaciones en el gen IDH1 (isocitrato deshidrogenasa de citoplasma) la cual podría representar la alteración que da inicio al tumor (Louis et al., 2007; Reifenberger, et al., 2016). Recientemente se ha identificado que una mutación en la histona 3 canónica está presente en gran parte de estos tumores, ésta consiste en la sustitución de la lisina 27 por metionina (H3K27M).

Tabla 1. Clasificación de glioblastomas humanos

GRADO	NOMBRE	DESCRIPCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA	INCIDENCIA*	LOCALIZACIÓN	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES (GENES MUTADOS)	SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS
I	Pilocítico	Biológicamente benignos, delimitados, de lento crecimiento. Se presenta en niños y jóvenes adultos.	0.36	Cerebelo Hipotálamo	BRAF, RAF1, NF1, KRAS, FGFR1, PTPN11	94.1 %
II	Difuso	Bordes irregulares, principalmente se presenta en niños y adultos jóvenes.	0.48	Hemisferios cerebrales	DH1 o IDH2, TP53, ATRX, trisomía de cromosoma 7. H3K27M	50.1 %
III	Anaplásico	Tumor agresivo que invade tejidos cercanos. Puede progresar a grado IV. Adultos entre 40 y 60 años	0.40	Lóbulo frontal, temporal y parietal	IDH1 o IDH2, TP53, ATRX	29.8 %
IV	Glioblastoma	Forma más maligna de cáncer cerebral. tumores altamente anaplásicos e infiltrantes Adultos entre 45 y 75.	3.20	Corteza cerebral	<u>IDH-mutante:</u> TP53, ATRX y delección de CDKN2A <u>IDH-wild-type:</u> TERT, PTEN, TP53, PIK3CA, PIK3R1, NF1.	5.5 %

*Por cada 100,000 habitantes, basado en la población estándar de Estados Unidos en el año 2000. Datos obtenidos del Registro Central de Tumores de Estados Unidos (CETRUS)

Los astrocitomas de grado III o anaplásicos, están preferencialmente localizados en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos de entre 40 y 60 años de edad. Histológicamente se caracterizan por atipia nuclear, aumento en el tamaño celular y alta actividad proliferativa, además de células multinucleadas con anomalías en la mitosis y positivas a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Comúnmente presentan mutaciones en el gen de IDH (Weller et al., 2015).

Los astrocitomas de grado IV, llamados glioblastomas (GBM) son la forma más maligna de cáncer cerebral ya que los pacientes tienen una sobrevida de 14 a 17 meses. Comúnmente se presentan en adultos entre las edades de 45 a 70 años (Kim et al., 1991). Generalmente se localizan en la corteza cerebral (Sarkar, et al., 2009), ganglios basales y tálamo. Estos tumores llegan a medir hasta 5 cm, son altamente anaplásicos y pueden estar compuestos de células con diversas morfologías. Alrededor de la mitad de los astrocitomas diagnosticados son clasificados como GBM (Reifenberger, et al., 2016). Desafortunadamente, las terapias disponibles actualmente para el tratamiento de estos tumores (cirugía, quimioterapia y radioterapia) no resultan efectivas, ya que aumentan sólo unos meses la esperanza de vida de los pacientes (Hamza & Gilbert, 2014).

4.1.2. Glioblastomas

Se denominan GBM primarios a los que se generan *de novo*, es decir, sin evidencia de un tumor previo de menor malignidad, o secundarios si se desarrollaron por progresión a partir de astrocitomas de menor malignidad. Los GBM primarios representan aproximadamente el 80-90% de los casos (Furnari et al., 2007). Los GBM primarios y secundarios son morfológicamente indistinguibles entre ellos. Sin embargo, se sabe que se presentan en rangos de edad diferentes y poseen alteraciones genéticas diferentes. Los GBM primarios se caracterizan por la amplificación y sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) junto con la delección del locus *INK4a/p14ARF* que codifica para dos proteínas que pueden arrestar el ciclo celular en la fase G1 y G2, (Ivanchuk, et al., 2001) mutaciones en el gen que codifica para la fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), amplificación del gen MDM2 y pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10. Generalmente se presentan en personas mayores de 55 años (Louis et al., 2016)

Los GBM secundarios se presentan principalmente en pacientes jóvenes y se derivan de astrocitomas grado II (difusos) o de grado III (anaplásicos), presentan diversas mutaciones en el gen de la proteína tumoral 53 (TP53), la sobre-expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y de su receptor, así como mutaciones en la IDH, además de pérdida alélica de los cromosomas 19q y 10q (Godard et al., 2003; Louis et al., 2016).

Los pacientes con GBM tienen una sobrevida corta y generalmente fallecen dentro del primer año después del diagnóstico (Louis et al., 2007). Estos tumores son resistentes a la radioterapia y a la quimioterapia y debido a su alta capacidad para infiltrarse, en especial al parénquima cerebral, generalmente no es posible realizar resección quirúrgica (Hadjipanayis y Van Meir, 2009).

En general, los primeros síntomas de los GBM pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debido al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, ataques, cambios de personalidad, demencia o problemas con la memoria, el

aprendizaje, la concentración y problemas motores. Los síntomas varían dependiendo de la localización del tumor (Badash, 2009).

La expresión de los receptores a hormonas sexuales en astrocitomas ha sugerido la terapia hormonal como una alternativa terapéutica (Atif, Yousuf, & Stein, 2015). Diversos estudios han demostrado que la progesterona (P4) y sus metabolitos promueven la proliferación, invasión y migración de células derivadas de GBM humanos (Camacho-Arroyo et al., 2000; González-Agüero et al., 2001;2007), también se ha demostrado que el estradiol (E2) induce proliferación, angiogénesis y resistencia a la terapia (González-Arenas et al., 2012; Lappano, Pisano, & Maggiolini, 2014b). Por otra parte también se ha reportado que tanto la P4 como el E2 pueden regular la transcripción de diferentes RNAs no codificantes (Marceau et al., 2015; Smits et al., 2010; Tao, He, & Chen, 2015), que entre otras cosas regulan la expresión de genes involucrados en procesos de proliferación, ciclo celular, resistencia a la terapia invasión y migración, además de que pueden modular la actividad del complejo represor de Polycomb 2(PRC2) el cual está encargado de la regulación de la expresión de genes tejido-específicos.

4.2.EZH2

4.2.1. Generalidades

La epigenética es el estudio de los patrones de expresión génica heredables y que no dependen directamente de la secuencia de DNA. El estudio de la epigenética comenzó con el descubrimiento de la metilación del DNA, marca que está asociada a represión transcripcional, Las células tumorales en general presentan hipometilación global (en el genoma entero) e hipermetilación local, es decir en genes específicos. (Esteller, 2011).

El DNA se encuentra compactado dentro del núcleo gracias a su interacción con las histonas, las cuales conforman un octámero que permite que el DNA se

enrolle formando la cromatina. El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina, consiste en aproximadamente 147 pares de bases (pb) de DNA enrollado en dos giros helicoidales alrededor de las histonas (dos de cada una, H2A, H2B, H3 y H4) (Felsenfeld & Groudine, 2003; Turner, 2005). Los extremos amino-terminal sobresalen del nucleosoma y son accesibles a enzimas que pueden modificarlos químicamente, y así regular el estado de la cromatina mediante un sistema de escritores, lectores y borradores (**Figura 1**, Felsenfeld & Groudine, 2003). Estas modificaciones conforman una especie de código que funciona en conjunto con la secuencia de DNA para determinar el estado de la cromatina, así como establecer y estabilizar los patrones de expresión génica. En células cancerosas estos procesos se encuentran desregulados, lo que ocasiona un cambio en la expresión génica con respecto a células normales (Esteller, 2011).

Varios aminoácidos de las histonas pueden ser modificados, en especial las lisinas que pueden ser acetiladas (ac) metiladas (me) o ubiquitinadas (ub), los residuos de arginina pueden ser metilados y las serinas son fosforiladas. Todas las modificaciones pueden afectar a las otras, y muchas están positivamente o negativamente relacionadas con las otras. La acetilación es una marca que por sí misma tiene una función, ya que al neutralizar la carga de los aminoácidos positivamente cargados (lisina y arginina) disminuye la interacción del nucleosoma con el DNA favoreciendo un estado de cromatina relajado, característico de la eucromatina y los genes transcripcionalmente activos. El resto de las marcas dependen del sistema de escritores y lectores para funcionar (Felsenfeld & Groudine, 2003). Para identificar las modificaciones postraduccionales, éstas reciben un código que inicia con el nombre de la histona, el residuo que es modificado, la posición que este ocupa en la secuencia de aminoácidos, el tipo de modificación y el número en caso de que puedan ser varias. Por ejemplo, la acetilación del residuo 4 de lisina en la histona 3 se abrevia H3K4ac y la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 es H3K27me3.

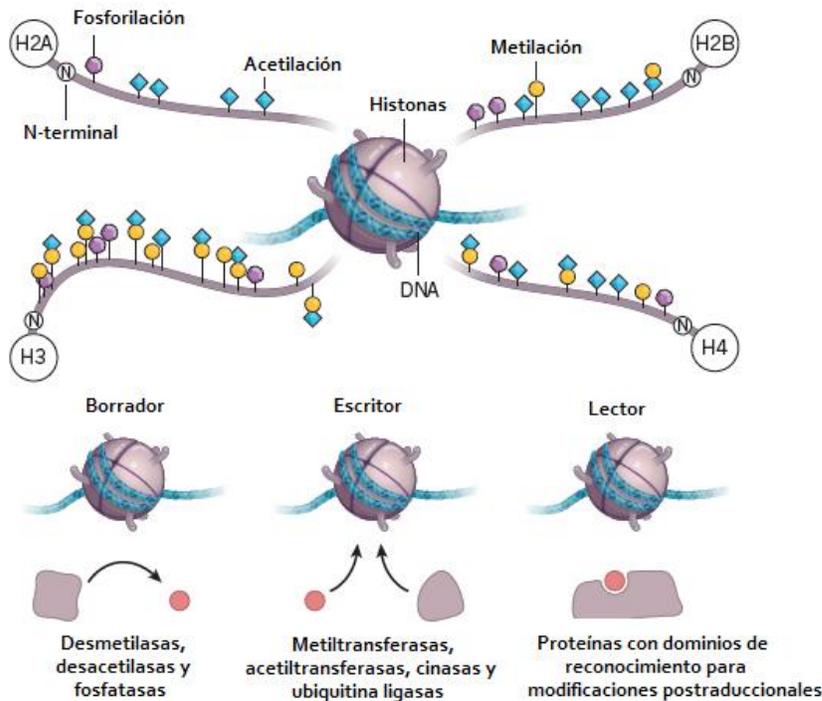


Figura 1. Modificaciones postraduccionales de histonas. La compactación del DNA está regulada por las marcas postraduccionales de las histonas. Los escritores catalizan la inserción de estas marcas. Los borradores son enzimas que remueven las marcas y los lectores son proteínas con dominios de reconocimiento para modificaciones de histonas. Imagen modificada de Helin & Dhanak, 2013.

Las proteínas que forman parte del Grupo Polycomb (PcG) son modificadores postraduccionales de histonas y su acción generalmente está asociada a represión transcripcional. Este grupo está representado por dos complejos: Complejos Represores de Polycomb 1 y 2 (PRC1 y PRC2). PRC2 es el complejo que actúa como escritor ya que está encargado de trimetilizar a la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) (Margueron & Reinberg, 2011). Esta marca está asociada a promotores de genes silenciados y a heterocromatina facultativa (Wiles & Selker, 2017). La H3K27me3 es reconocida por PRC1 (lector) que se une a la cromatina e impide que se lleve a cabo la transcripción al bloquear el reclutamiento de la RNA polimerasa II.

La composición de ambos complejos es muy variable, aunque, algunos elementos se mantienen constantes. El núcleo catalítico de PRC2 (**Figura 2**) se compone del homólogo del Enhancer de Zeste (EZH1/2). En humanos existen dos homólogos del enhancer de Zeste (codificados por genes independientes), sin embargo, EZH2 tiene mayor actividad catalítica que EZH1 (Margueron & Reinberg, 2011). Los otros componentes constantes son el factor de desarrollo ectodérmico embrionario (EED) que contiene dominios WD40 que reconocen la marca

H3K27me3 y ayudan a que se propague, y el supresor de zeste (SUZ12) que mediante el dominio VEFS modula la actividad de PRC2 (Margueron & Reinberg, 2011; Mohammad et al., 2017; Scelfo et al., 2015). PRC1 es un complejo mucho más variable, sin embargo, RING1A y RING1B son componentes constantes y se encargan de ubiquitinar a la lisina 119 de la histona H2A impidiendo el paso a la RNA polimerasa II y compactando la cromatina (Scelfo et al., 2015).

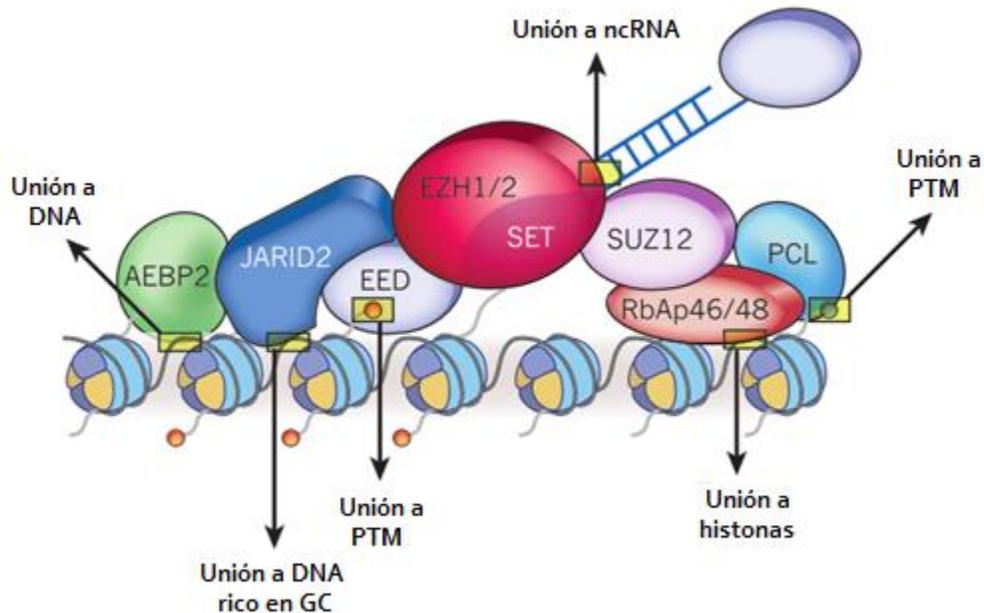


Figura II. Complejo Represor de Polycomb 2. Este complejo tiene tres componentes principales; enhancer de Zeste 2 (EZH2)), Desarrollo de Ectodermo Embrionario (EED) y Supresor de Zeste 12 (SUZ12). Los otros: jumonji, dominio interactivo de sitios ricos en GC 2 (JARID2), proteína de unión potenciadora de adipocitos (AEBP2) y proteína Polycomb-like (PCL) son variables y funcionan como anclaje y reconocimiento de otras marcas epigenéticas (Imagen de Margueron, et al, 2011).

completa (Collinson et al., 2016; Sauvageau & Sauvageau, 2010).

PRC2 mantiene la identidad celular y la diferenciación apropiada al conservar el estado reprimido de los genes que se establece durante el desarrollo más que reprimir de novo (Wiles & Selker, 2017), por lo que ha sido sugerido que en un ambiente estable y controlado este complejo no es requerido para preservar la identidad, es decir en una célula totalmente diferenciada que se encuentra en homeostasis no es indispensable PRC2 para mantener su patrón de expresión génica, sin embargo, cuando las células se ven expuestas a cambios en el medio

extracelular se vuelve importante el papel de PRC2 (Comet, Riising, Leblanc, & Helin, 2016; Scelfo et al., 2015).

Entre los blancos mejor conocidos de EZH2 se encuentran los genes Hox que controlan la identidad celular del eje anteroposterior del plano corporal y están conservados en todos los animales con simetría bilateral (Comet et al., 2016). Se ha reportado que PRC2 puede reprimir la transcripción de genes que están involucrados en múltiples puntos de control del ciclo celular. Por ejemplo, para que se lleve a cabo la transición de la fase G1 a S es requerida la inhibición del locus $p16^{Ink4a}/p19^{Arf}$ mediada directamente por PcG (Sauvageau & Sauvageau, 2010).

EZH2 también regula la reparación del DNA, la sobre-expresión de este gen ocasiona una dramática disminución en la expresión de RAD51 que es una proteína requerida para la recombinación homóloga y reparación de rupturas de doble cadena, esto tiene como consecuencia el decremento en el número de loci de DNA reparados, aumento de aneuploidias y reducción en las tasas de supervivencia de células expuestas a estrés genotóxico (Sauvageau & Sauvageau, 2010).

Debido a que las proteínas que pertenecen a PcG reprimen locus asociados a progresión del ciclo celular, replicación y reparación del DNA, cambios en la concentración de PRC2 podrían romper el equilibrio entre la represión y activación transcripcional, alterar la homeostasis celular, y provocar diversas patologías, entre ellas el cáncer. Se ha observado que la expresión de EZH2 se encuentra desregulada en diversos tipos de cáncer (Scelfo et al., 2015), entre ellos los tumores cerebrales.

Las funciones de PRC2 han sido estudiadas en dos direcciones principalmente, una es su rol en el desarrollo y la otra en su implicación en la proliferación celular y la tumorigénesis. El incremento en la actividad de EZH2 está asociado a un pronóstico negativo en diversos tumores, mientras que la delección de EZH2 en embriones de ratón resulta letal o produce diversos defectos en el desarrollo (Scelfo et al., 2015). Se sabe que está involucrado en procesos como

embriogénesis, inactivación del cromosoma X, modificación de la cromatina, desarrollo de células troncales y progresión tumoral (Lu et al., 2016).

4.2.2. Estructura y mecanismos de acción

La proteína EZH2 está conservada evolutivamente entre especies, desde organismos unicelulares eucariotas hasta plantas, este grado de homología sugiere que tiene un rol muy importante (Wiles & Selker, 2017). EZH2 se compone de diversos dominios, tal como se muestra en la **Figura 3**. SANT (Siglas de: proteína de conmutación defectuosa 3 (Swi3), adaptador 2 (Ada2), correpresor del receptor nuclear (NCoR), factor de transcripción IIIB) es el dominio responsable de la localización subcelular de EZH2 en el núcleo y es importante para el remodelado de la cromatina al promover la unión a los extremos terminales de las histonas (Yan et al., 2017). El dominio SET es el que le confiere la actividad enzimática de histona metiltransferasa (KMT) para regular la expresión de genes (Margueron & Reinberg, 2011; Yan et al., 2017), el dominio recibe este nombre por las siglas de Suv(var)3-9, Enhancer-of-zeste y Tritorax, los tres son proteínas con actividad de KMT, y tienen en común este dominio catalítico que está altamente conservado (Kato, 2015).

Aun no es muy claro el mecanismo mediante el cual PRC2 es reclutado hacia los genes blanco. En *Drosophila*, existen secuencias de DNA conocidas como elementos de respuesta a Polycomb que pueden reclutar a las proteínas del PcG. En mamíferos no hay evidencia que sustente la participación de factores de transcripción que recluten a PRC2, sin embargo, se sabe que EZH2 puede unirse a diversos RNA largos no codificantes (lncRNA) mediante el dominio de unión a RNA no codificante (ncRBD (Margueron & Reinberg, 2011). Se estima que cerca de 3000 RNAs pueden unirse al complejo y regular su actividad. Algunos de los más sobresalientes son HOTAIR, cuya expresión está relacionada con el silenciamiento del locus HOXD y TUG1, un lncRNA inducido por daño a DNA, que recluta a PRC2 para inhibir los genes que regulan mitosis, formación del huso mitótico y progresión del ciclo celular (Sauvageau & Sauvageau, 2010)

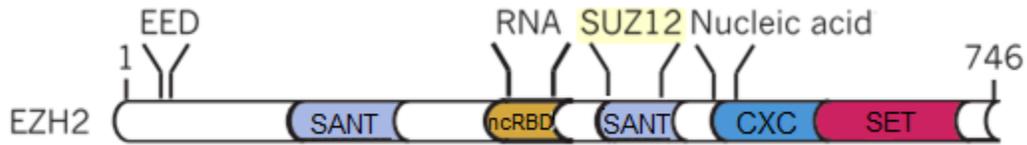


Figura III. Dominios caracterizados de la proteína EZH2. Los dominios de EZH2 caracterizados con funciones potenciales están indicados. CXC es un dominio de unión a DNA rico en cisteína; ncRBD, dominio de unión a RNA no codificante; SANT, dominio de unión de SWI3, ADA2, N-CoR y TFIIB; SET, Su (var) 3-9, enhancer de zeste, trithorax. Modificado de Margueron, et al, Nature (2011).

Jarid2, una proteína que puede formar parte de PRC2, es un miembro de la familia Jumonji de desmetilasas de histonas que no tiene actividad catalítica, que se une a secuencias de DNA ricas en GC reclutando a EZH2 a diversos genes. Del mismo modo, otros componentes variables de PRC2 funcionan como puntos de anclaje para el complejo, tales como RbAp46/48 que se une a las histonas H3 y H4, EED reconoce a H3K27me3 lo que se cree ayuda a propagar la marca y PCL que reconoce otras modificaciones postraduccionales de las histonas (Gall Trošelj, Novak Kujundzic, & Ugarkovic, 2016).

Una vez reclutado, EZH2 puede di, y trimetilar la lisina 27 en la histona 3, sin embargo, no se conoce aún el origen de la monometilación. Anteriormente se creía que era EZH2 el responsable de insertar los tres metilos, pero reciente evidencia ha sugerido que H3K27me1 puede estar presente en la célula aún si se desacopla el complejo, por lo que es posible que otras proteínas sean las encargadas de monometilar este residuo (Margueron & Reinberg, 2011). Al ser una KMT, la acción de EZH2 es dependiente de la disponibilidad de S-adenosil metionina (SAM), molécula donadora de grupos metilo. H3K27me3 es reconocida por PRC1, este complejo se une a la cromatina y monoubiquitina la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub) e impide que la RNA polimerasa II se una a los promotores, además de que compacta la cromatina.

Como ya se mencionó, la acetilación está asociada a la expresión de genes e impide que se metilen los residuos de lisina. Por lo tanto H3K27ac no es compatible con H3K27me3 por lo que es requerido que los residuos sean desacetilados para crea un contexto que sea permisivo a la acción de PRC2, esto

también previene que sean silenciados genes que requieren permanecer activos (Wiles & Selker, 2017).

Las regiones activas del genoma se caracterizan por las marcas H3K4me3 y H3K36me2/3. H3K4me3 y H3K27me3 son mutuamente excluyentes, sin embargo, pueden coexistir de forma bivalente en ciertos dominios de las células troncales embrionarias (ESC) (Wiles & Selker, 2017). El papel de EZH2 en la diferenciación de ESCs está ampliamente estudiado. Mediante estudios genómicos se ha descubierto que los complejos PcG se unen y reprimen varios genes que codifican para reguladores importantes del desarrollo y señalización en ESCs (Zhao et al., 2007). Es característico de estas células que en los promotores de los genes tejido-específicos exista una bivalencia de marcas, es decir coexista la H3K27me3 que es asociada a represión junto con la H3K4me3, marca regulada por el complejo Thritorax y que se asocia a cromatina transcripcionalmente activa. Este estado se conoce como “listo para el arranque” ya que los genes pueden ser activados rápidamente, lo que es fundamental en la diferenciación celular ya que permite que los genes que darán la identidad y linaje a la célula se expresen o repriman según sea el caso (Sauvageau & Sauvageau, 2010).

Adicionalmente reciente evidencia experimental sugiere que PRC2 puede unirse a RNAs nacientes en los promotores de genes activos, lo que inhibe su actividad, por lo que el complejo responde al ambiente de la cromatina y depende de este para establecer los dominios de H3K27me3 (Wiles & Selker, 2017).

4.2.3. Papel de EZH2 en cáncer

La importancia de H3K27me3 para mantener los patrones de expresión génica apropiados a largo plazo se ha demostrado por la amplia variedad de mutaciones en los miembros del complejo PRC2 y de su sustrato H3K27 en cáncer. Las regiones del genoma que poseen la marca H3K27me3 varían entre diferentes etapas del desarrollo, tipos celulares y en tejidos normales con respecto a los patológicos (Wiles & Selker, 2017). EZH2 se encuentra mutado en varios tipos de cáncer como melanoma, linfoma, cáncer de mama y de próstata (Margueron &

Reinberg, 2011; Sørensen & Ørntoft, 2010). La activación aberrante de EZH2 contribuye a la progresión tumoral e inactivación de genes involucrados en la apoptosis y senescencia. Por ejemplo, la represión dependiente de PRC2 de CDH1 (cadherina 1) induce la transición epitelio-mesénquima con la subsecuente invasión y metástasis. La activación mediada por EZH2 de IL6/TNF (interleucina 6 y factor de necrosis tumoral) y represión de IFNGR (receptor de interferón gamma) promueve la tumorigénesis a través del mantenimiento de inflamación crónica y establecimiento de la tolerancia a la inmunidad (Katoh, 2015). En tumores de cáncer de próstata resistentes a la castración y tumores paratiroideos se ha detectado sobre-expresión de EZH2 y amplificación del número de copias del gen (Katoh, 2015).

Los mecanismos mediante los cuales EZH2 es regulado en distintos tipos de cáncer son transcripcionales y postranscripcionales. Por ejemplo, el factor de transcripción E2F (proteína de unión a retinoblastoma) puede unirse al promotor de EZH2 y activar su expresión, promoviendo la proliferación de las células cancerosas. La oncoproteína Myc incrementa la expresión de EZH2, así como otros factores de transcripción conocidos como SOX4, NF-Y, STAT3 y ETS regulan la expresión de esta KMT en diversos tumores. Se ha reportado también que una gran variedad de miRNAs pueden regular directamente la expresión de EZH2 en cáncer, tales como miR-26, miR-32, miR-101, miR-137, miR-138 y miR-506 (Lu et al., 2016). Existen también distintas modificaciones postraduccionales que modifican la actividad de EZH2. En cáncer de mama, la fosforilación en la Ser2 mediada por Akt disminuye los niveles de H3K27me3 y promueve el desarrollo del tumor mediante los blancos no-histona de EZH2 presentes en el citoplasma, tales como STAT3 que es un factor de transcripción involucrado en la respuesta celular a interleucinas y factores de crecimiento que puede ser metilado por EZH2, lo que incrementa su actividad (Kim et al., 2013) La promoción del crecimiento tumoral mediante las proteínas PcG está asociada frecuentemente a su habilidad para reprimir el locus *Ink4a/Arf*, un supresor de tumores y regulador negativo de la progresión del ciclo celular (Scelfo et al., 2015; Yin et al., 2016). Además, EZH2 está relacionado con la resistencia a la terapia y está sobre-expresado en líneas celulares de cáncer, y

promueve la angiogénesis, la invasión, proliferación y migración de diversas células tumorales (Yan et al., 2017)

En adición a las mutaciones o alteraciones que provocan ganancia de función, también se han descubierto mutaciones que conducen a una pérdida de la misma en tumores malignos originados a partir de células mieloides, la mayoría de éstas localizadas en el dominio SET, además de que la pérdida de la actividad de EZH2 promueve el desarrollo de leucemia, lo que conduce a pensar que el papel de esta KMT en el desarrollo del cáncer es más complejo de lo que se piensa. Hay algunos estudios donde se ha asociado la pérdida en los niveles de H3K27me3 a un mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer, incluidos de mama, ovario y pulmonar (Gall Trošelj et al., 2016; Scelfo et al., 2015).

La inhibición de EZH2 es una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer ya que en diversos estudios se ha reportado que el knockdown, knockout o inhibición de este gen reduce la proliferación de líneas celulares derivadas de varios tipos de cáncer como leucemia, linfoma, cáncer de próstata (Comet et al., 2016; Scelfo et al., 2015). En los últimos años se han desarrollado y probado gran diversidad de fármacos inhibidores de EZH2 y se han tenido moderados éxitos en el tratamiento de leucemias (Yan et al., 2017). Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen reportes que indican que la inhibición prolongada de EZH2 en GBM causa un profundo cambio en la célula, induciendo la proliferación, mecanismos de reparación de daño a DNA y activación de genes relacionados con pluripotencialidad que resultan en la alteración de la identidad celular y la progresión tumoral (De Vries et al., 2015)

Por lo tanto, el papel de EZH2 como oncogén o supresor de tumores está determinado por el contexto celular, el tipo de cáncer y la identidad de la célula que da origen a la transformación, de igual forma, este doble papel sugiere que el rol de esta enzima en el cáncer es complejo por lo que requiere de un estudio cuidadoso y detallado que permita conocer sus mecanismos de acción a fin de entender cómo afecta al desarrollo tumoral.

4.2.4. EZH2 en glioblastomas

El papel de EZH2 ha sido ampliamente estudiado en gliomas, donde se sabe que tiene gran importancia. En gliomas pediátricos difusos se ha sugerido que una mutación en la histona 3 canónica (H3.1) que sustituye la lisina 27 por metionina (H3K27M) es importante en el desarrollo de estos tumores ya que reduce la actividad de PRC2 los niveles globales de H3K27me3 y contribuye al desarrollo tumoral. La inhibición farmacológica de EZH2 disminuyó el crecimiento celular en células derivadas de gliomas difusos pediátricos (Mohammad et al., 2017).

En biopsias de GBM, la sobre-expresión de este gen está directamente involucrada en la malignidad del tumor y con una menor esperanza de vida (J. Zhang et al., 2015). También se ha visto que EZH2 participa en la regulación de genes involucrados en la invasión y migración de células derivadas de GBM como el receptor tipo tirosina-cinasa AXL (Ott et al., 2012a; S.-Y. Yen et al., 2017). También se ha visto que influye en la proliferación ya que el silenciamiento de EZH2 provocó un arresto en la fase G1 del ciclo celular y disminuyó el volumen de tumores formados por estas células derivadas de GBM después de su implantación en ratones desnudos (Yin et al., 2016; J. Zhang et al., 2015).

Recientemente se ha sugerido que las células troncales de glioma (GSC) son en parte responsables de la resistencia de los GBM a la remoción quirúrgica y la resistencia a la terapia ya que son capaces de autorrenovarse, diferenciarse y generar nuevos tumores similares al de origen (Singh et al., 2004). EZH2 es requerido para el mantenimiento y renovación de las células troncales de glioma (Yin et al., 2016). GSC obtenidas de biopsias de pacientes y tratadas con el inhibidor farmacológico de EZH2 3-Deazaneplanocin A (DZNep) disminuyó significativamente la proliferación y autorrenovación de éstas (Suvà et al., 2009). Se sabe que EZH2 puede fosforilarse (pEZH2) en la serina 21 (pS21) por medio de la activación de la vía de señalización AKT/PI3K (Ott et al., 2012a), pEZH2 se une a STAT3 y lo metila, lo que aumenta la actividad de este factor de transcripción

involucrado en la autorrenovación de GSC y progresión de los GBM (E. Kim et al., 2013).

También se ha descrito que en células U87 y U251 derivadas de GBM humanos resistentes a temozolomida EZH2 se encuentra sobre-expresado, en comparación con células que son sensibles a este fármaco, además de que el knockdown de EZH2 disminuyó la expresión de varios transportadores ABC involucrados en la resistencia de los tumores a fármacos (Fan et al., 2014).

Por otra parte, los lncRNA participan en la regulación de vías de señalización en GBM, mediante microrreglos se ha encontrado que el perfil de expresión de los lncRNA se encuentra alterado en biopsias de GBM con respecto a tejido normal (Han et al., 2012). HOTAIR es un lncRNA que se une a EZH2 mediante el dominio ncRBD y recluta a PRC2 hacia los genes HOX que están involucrados en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (Marsh, Shah, Cole, & Garcia-Bassets, 2014). HOTAIR se encuentra sobre-expresado en GBM, causando progresión acelerada del ciclo celular, además de que es un indicador de pobre pronóstico para el paciente (Zhang et al., 2015).

Varios miRNAs están involucrados en la regulación de la actividad de EZH2, la expresión de varios de ellos se encuentra desregulada en GBM, un ejemplo es miR-708 cuya expresión en líneas celulares de GBM está disminuida en comparación con tejido normal, la sobreexpresión de este miRNA reduce la expresión de EZH2 e inhibe la proliferación e invasión de líneas celulares de GBM humanos. Similarmente, miR-138 inhibe la expresión de EZH2 en biopsias de GBM como en líneas celulares derivadas de estos tumores (Yin et al., 2016). Se tienen evidencias de que las hormonas sexuales pueden regular la expresión de EZH2 en diferentes tipos celulares, sobre todo en tumores sensibles a hormonas como el cáncer de mama y de próstata (Bhan et al., 2014; Shi et al., 2007; Tamm-Rosenstein, Simm, Suhorutshenko, Salumets, & Metsis, 2013).

4.3. Progesterona (P4)

4.3.1. Generalidades

La progesterona (P4) o 4-pregnen-3,20-diona, es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol; por lo que al igual que éste, contiene un núcleo de ciclopentanohidrofenantreno. Se sintetiza y secreta principalmente en los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), placenta y glándulas adrenales (Henley, et al., 2005). Además, puede ser sintetizada en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, ya sea de *novo* o a partir del colesterol (González-Agüero, et al, 2001). Debido a su estructura lipofílica, esta hormona puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y así poder interactuar con el receptor específico intracelular a P₄ (RP) en una gran variedad de células del SNC (Camacho-Arroyo, et al, 2017) .

Es comúnmente conocida por ser una hormona reproductiva femenina, sin embargo, también es producida por los hombres en la glándula adrenal. Además del embarazo, la P4 participa en diversos procesos como la conducta sexual, el embarazo, la ovulación, la respuesta inmune, la memoria y el aprendizaje (M Schumacher et al., 2014).

La P₄ actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos de acción, el clásico (genómico; **Figura 4**) y no clásico (no genómico; **Figura 5**), se cree que estos pueden ocurrir simultáneamente en la misma célula lo que otorgaría un control más fino de los efectos (Schumacher, et al, 1999). El mecanismo clásico involucra la interacción de la hormona con su receptor intracelular (RP, **Figura 4**), el cual es un factor de transcripción activado por ligando, éste comprende todos los efectos a largo plazo, los cuales están modulados por dicho receptor, mismo que regula la expresión de genes blanco. El mecanismo no clásico requiere de la activación de receptores de membrana (mRPs,) éste ocurre en la membrana y genera los efectos a corto plazo al modificar la conductancia de iones, inducir la formación de segundos mensajeros como el AMPc, y activar cinasas como la proteína cinasa C (PKC) y las cinasas activadas por mitógenos (González-Agüero et al., 2001).

4.3.2. Mecanismos de acción

Mecanismo de acción clásico o genómico de la P₄

El mecanismo clásico involucra a un receptor intracelular (PR) el cual actúa como un factor de transcripción activado por ligando (tal como se muestra en la Figura 4) (Camacho-Arroyo, et al, 2017; M Schumacher, et al., 2014). En ausencia de la hormona los receptores se encuentran en una conformación que tiene alta afinidad por la hormona y se asocia a diversas chaperonas como las proteínas de choque térmico (Hsp 70/90). Gracias a su alto carácter lipofílico, la P₄ puede atravesar mediante difusión simple la membrana celular para interactuar con el RP, lo que provoca un cambio conformacional en el receptor que promueve a su vez la disociación de las proteínas chaperonas, la dimerización del receptor y su posterior fosforilación (**Figura 4**). Finalmente, la forma activa del receptor se une a elementos de respuesta a P₄ (PRE) localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco y modulan su expresión mediante el reclutamiento de moléculas correguladoras (ejemplo SRC-1) y el reclutamiento de la Pol II (Camacho-Arroyo et al., 2017).

Este mecanismo media efectos a largo plazo en las células, tales como reproducción, memoria, aprendizaje, comportamiento sexual, entre otros. Sin embargo, también se ha visto involucrado en procesos fisiopatológicos como el cáncer (Schumacher et al., 2014). En el caso de los GBM, se ha reportado que la P₄ incrementa significativamente la infiltración y el área del tumor formado por células derivadas de GBMs humanos (Germán-Castelán, et al, 2016). En biopsias de pacientes con astrocitomas, la expresión del RP es notablemente mayor conforme avanza el grado de malignidad tumoral, lo que ha sugerido que la P₄ está involucrada en el desarrollo de estos tumores (Hansberg, González, & Camacho-Arroyo, 2014).

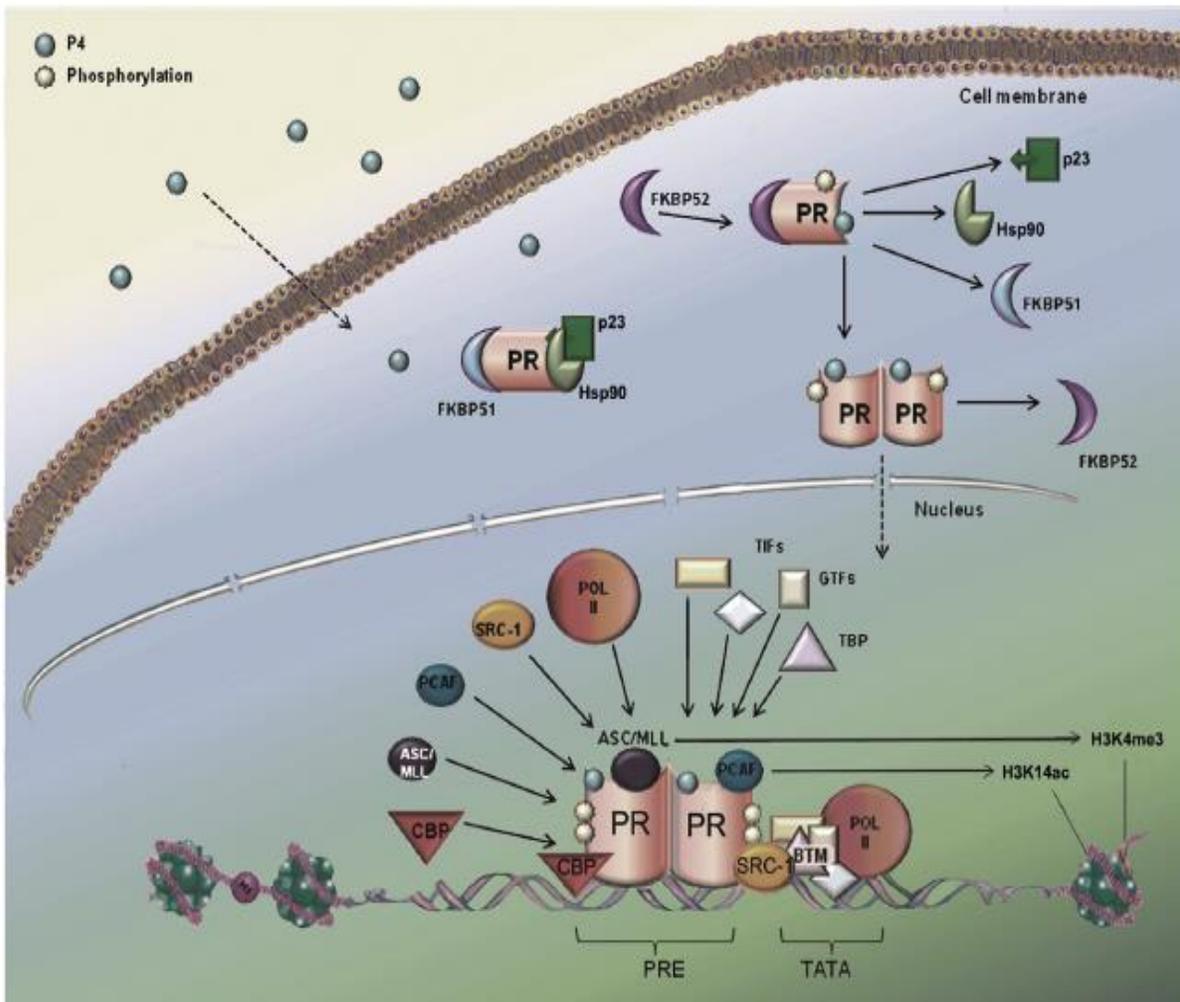


Figura IV. Mecanismo de acción clásico de la P₄. En ausencia de hormona, PR interactúa con Hsp90, FKBP51 y p23. SRC-1 y CBP actúan como coactivadores así como el factor asociado a p300 / CBP (PCAF) y el complejo ASC/MLL que promueven la acetilación de la histona H3 (H3K14ac). TIF, factor de iniciación de la transcripción; GTF, factor de transcripción general; TBP, proteína de unión a TATA; Pol II, ARN polimerasa II. Imagen tomada de Camacho-Arroyo, et al, 2017.

En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, se caracterizó el efecto de la hormona y de un antagonista del RP (RU486) sobre el crecimiento de dos líneas celulares (U251 y UD54) derivadas de GBM humanos. Se demostró que el tratamiento con P₄ (10 nM) incrementó el número de células y la tasa de proliferación en ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con el RU486 (10 μM), logró bloquear parcialmente el efecto de la hormona. Esto sugiere que el efecto de la P₄ puede estar mediado tanto por el receptor nuclear como por los receptores membranales a P₄ (mPRs) (Piña-Medina, et al., 2016).

Mecanismo de acción no clásico o no genómico

Los mecanismos no genómicos son rápidos y no requieren que el receptor interactúe directamente con el material genético, sino que produce sus efectos mediante la activación de diversas vías de señalización como la vía de cinasas activadas por mitógeno, la vía de PI3K/AKT, entre otras (**Figura 5**) (Garg et al., 2017).

La acción no genómica tiene las siguientes características:

1. Acciones a corto plazo (minutos o segundos).
2. Independientes de la síntesis de mRNA y de proteínas.
3. Efectos que no son bloqueados por inhibidores de la transcripción, tales como la Actinomicina D; e inhibidores de la síntesis de proteínas, como la cicloheximida.
4. Reproducibilidad de los efectos de análogos de las hormonas esteroides que no son permeables a la célula (Garg et al., 2017; Levin, 2008).

A pesar de que los mecanismos de acción son rápidos, las acciones desencadenadas pueden ser intensas y sostenidas. La P4 ejerce sus efectos neuroprotectores y actúa como modulador del crecimiento tumoral a través de mecanismos no clásicos que pueden ser regulados por los receptores membranales a progesterona (mPRs), por el PR o por las proteínas componentes de los receptores membranales a progesterona (PGRMC) (Garg et al., 2017).

Los mPRs no están relacionados con el receptor intracelular a P4, se ha predicho que son estructuras con 7 dominios intermembranales que podrían estar directamente acoplados a proteínas G (M Schumacher et al., 2014). En humanos los mPRs son codificados por diferentes genes y el estradiol (E2) puede regular la expresión de éstos. Los mPRs modifican la cantidad de Ca^{2+} intracelular lo que sugiere que están acoplados a proteínas $G_{\alpha i}$, también pueden estimular la vía de PI3K/Akt y activar receptores β -adrenérgicos e incluso inducir la expresión de genes

regulados por el PR (Hansberg, González, & Camacho-Arroyo, 2014; Valadez-Cosmes et al, 2016).

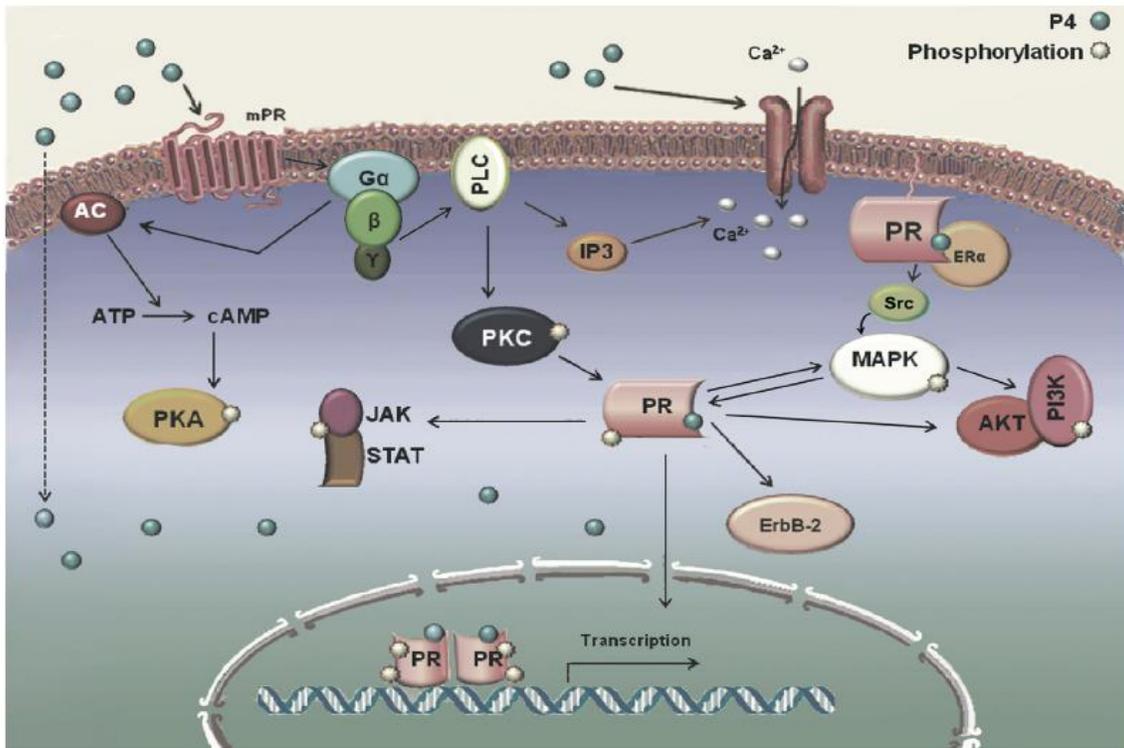


Figura V. Mecanismo no genómico de la P4. En presencia de P4, el PR anclado a membrana interactúa con ER α y activa la tirosina quinasa Src que a su vez activa la ruta de señalización MAPK. Además, PR indirectamente activa otras vías de señalización, como las vías PI3K / AKT, JAK / STAT y ErbB-2. En el mecanismo de acción independiente del ligando, PR puede activarse mediante modificaciones postraduccionales, como la fosforilación inducida por MAPK y PKC. Otro mecanismo no clásico de acción de P4 es a través de la activación de los receptores de membrana de progesterona (mPR), que son receptores acoplados a proteína G que activa la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC) para producir los segundos mensajeros cAMP y diacilglicerol más inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3), respectivamente. Estos segundos mensajeros pueden a su vez modular la señalización PKA, PKC y MAPK. Imagen tomada de Camacho-Arroyo, et al, 2017.

Adicionalmente el PR puede encontrarse anclado a la membrana donde en presencia de P4 interactúa con el receptor de estrógenos α (ER α) y desencadena cascadas de señalización a través de la tirosina quinasa Src activando la vía de MAPK cinasas. También puede directamente activar vías como PI3K/AKT, JAK/STAT y ErbB-2. De igual forma, en espermatozoides la P4 facilita la fusión con el óvulo al causar una rápida entrada de calcio extracelular y pérdida de cloruro

intracelular mediante la activación del canal CatSper (Camacho-Arroyo, et al., 2017; Garg et al., 2017).

No existe un estudio que evalúe directamente el efecto de la P4 sobre la expresión de EZH2, sin embargo, un estudio en epitelio mamario de ratonas preñadas observó que la trimetilación de H3K27 es un mediador clave de los cambios en la expresión génica que se producen durante el embarazo, además de que la expresión y fosforilación de EZH2 parece estar coordinada por la P4, una hormona clave durante el embarazo (Pal et al., 2013).

4.3.3. Progesterona y glioblastomas

En células derivadas de GBM humanos donde se ha estudiado al PR, se ha demostrado que su expresión es directamente proporcional al grado de malignidad que presenta el tumor, lo que sugiere que la P4 está involucrada en el desarrollo de los astrocitomas (Cabrera-Muñoz et al., 2009), Además en un trabajo realizado previamente por nuestro grupo de investigación se encontró que dos de los subtipos de mRPs (mRP α y mRP β) se encuentran expresados en las células U251 y U87 derivadas de GBM humanos (Valadez-Cosmes et al., 2015).

Se ha demostrado que el tratamiento con P₄ (10 nM) incrementa el número de células y la tasa de proliferación de ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con el RU486 (antagonista de PR) bloquea solo parcialmente el efecto de la hormona, sugiriendo que los efectos de la P₄ podrían no solo estar mediados por el RP sino por aquellas vías de señalización que son dependientes de la interacción de la hormona con los mRPs (Piña-Medina, et al., 2016).

En estudios *in vivo* se demostró que la P4 incrementa la infiltración de células derivadas de GBM humanos implantadas en la corteza cerebral de ratas (Germán-Castelán, et al., 2016). En modelos *in vitro* se ha observado que la P4 (a concentración de 10 nM) induce la migración e invasión de éstas células (Piña-Medina, et al., 2016). También se sabe que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de diversos genes, incluyendo genes fundamentales para el ciclo celular, la proliferación y la angiogénesis, como ciclina

D1, EGFR, VEGF, etc. (Hernández-Hernández, González-García, & Camacho-Arroyo, 2012).

Aún se desconoce el papel de la P4 sobre la expresión de EZH2 en GBM humanos, sin embargo, ambos participan en la regulación de procesos fundamentales para la progresión tumoral, tales como invasión, migración y proliferación, por lo que es probable que la P4 esté involucrada en la regulación de la expresión y actividad de EZH2.

4.4.Estradiol (E2)

4.4.1. Generalidades

El estradiol (E2) es una hormona esteroide sexual femenina. Se sintetiza principalmente en los ovarios a partir de la testosterona por la enzima aromatasa. Además, en hombres puede ser sintetizado en el hígado por la misma enzima (S. S. C. Yen & Jaffe, 1991). El E2 se difunde a través de la membrana celular para unirse y activar al receptor nuclear de estrógenos (ER). El complejo activo se une a los elementos de respuesta a estrógenos en el DNA y activa la transcripción de genes involucrados en el funcionamiento del sistema reproductor femenino. (Henley et al., 2005).

El E2 también es un neuroesteroide, lo que significa que puede ser sintetizado *de novo* en tejidos neurales donde regula la plasticidad sináptica, la diferenciación sexual del cerebro, el comportamiento reproductivo y el aprendizaje (Rossetti, et al., 2016). La síntesis local de estrógenos en el cerebro es dinámica y es un proceso regulado que varía de acuerdo a la edad, el sexo, el estado fisiológico y difiere entre regiones cerebrales (Oline & J Kelly, 2010). Por otro lado, ha sido demostrado que el E2 modula la diferenciación neuronal, al influenciar la migración celular, supervivencia y plasticidad sináptica (Giretti & Simoncini, 2008)

Se conocen dos mecanismos de acción para el E2, el clásico o genómico y no clásico o no genómico. El mecanismo clásico involucra la interacción de la hormona con su receptor intracelular, el cual es un factor de transcripción activado por

ligando, que puede unirse a elementos de respuesta a estrógenos activando la transcripción de genes blanco (Heldring et al., 2007). Los efectos rápidos o no genómicos del E2 están mediados por receptores membranales.

4.4.2. Mecanismo de acción

Mecanismo genómico del E2

Este mecanismo está mediado por los receptores intracelulares a estrógenos (ER α y ER β). El ER inactivo se encuentra asociado a diversas proteínas que se disocian con la unión del ligando, lo que transforma el receptor a su estado activo (Oline & Kelly, 2010). Después de que receptor se une al ligando en el citoplasma, se dimeriza para formar un complejo que es translocado al núcleo donde funciona como factor de transcripción al unirse a regiones con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) reclutando proteínas coactivadoras y a la maquinaria de transcripción (Schwartz, et al., 2016). La respuesta transcripcional de la célula dependerá de diversos factores correguladores y de las características de los promotores de los genes (Heldring et al., 2007) (**Figura 6**).

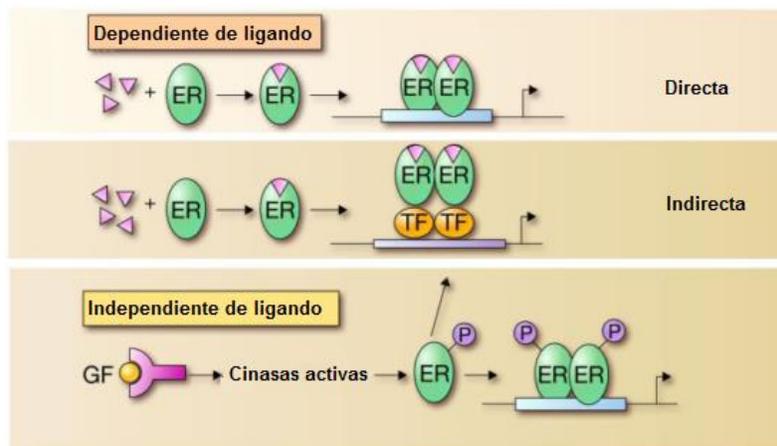


Figura VI. Mecanismos genómicos del E2. La vía clásica (directa) incluye la activación de ligando y una unión directa a elementos de respuesta de estrógeno (ERE). La vía indirecta incluye la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción después de la activación del ligando, y de ese modo la regulación del gen se ve afectada por la unión indirecta al

DNA. La vía independiente del ligando incluye la activación a través de otras vías de señalización, como la señalización del factor de crecimiento (GF). En este caso, las cinasas activadas fosforilan el ER y lo activan para dimerizarlo, unirse al DNA y regular los genes. Imagen modificada de Heldring, et al., 2007

Cuando ambos ER están expresados en la misma célula, ER β puede antagonizar la transcripción dependiente de ER α mediante mecanismos que

actualmente se encuentran en investigación, sin embargo, se sugiere que es mediante la alteración del reclutamiento de coactivadores (Heldring et al., 2007).

Varios genes que claramente son regulados por estrógenos no contienen secuencias ERE, hay evidencia de que tanto ER α como ER β pueden regular la transcripción mediante la interacción con otros factores de transcripción como la proteína de especificidad 1 (SP-1), la proteína activadora 1 (AP-1) y p300 que contienen dominios de unión a DNA (Heldring et al., 2011; Oline & Kelly, 2010).

También ha sido descrito que existe una vía de activación de los ER que no es dependiente de ligando. La señalización de factores de crecimiento conlleva a la activación de cinasas que podrían fosforilar y activar ERs o corre reguladores asociados en la ausencia de E2, lo que podría contribuir al crecimiento independiente de hormonas en algunos tumores (Heldring et al., 2007).

Mecanismo no genómico

Existe una vía de activación denominada no genómica, que está implicada en la generación de las respuestas rápidas a estrógenos y está mediada por ER que después de una serie de modificaciones postraduccionales se anclan a la membrana celular (Romano & Gorelick, 2017). La palmitoilación del receptor permite que sea transportado a la membrana celular. También se sugiere que el ER α al unirse con su ligando puede metilarse en la arginina 260 que pertenece al dominio de unión al DNA lo que promueve su asociación con moléculas señalizadoras como cinasas de adhesión focal, Src y PI3K, las cuáles median la cascada de señalización desencadenada por el ER (**Figura 7**) (Levin, 2008).

Adicionalmente, existe un receptor de E2 acoplado a proteína G (GPER) que consiste en una proteína con siete dominios transmembranales que puede regular la expresión génica indirectamente, al activar proteínas que cambian la actividad de factores de transcripción, en conjunto con la activación de cascadas de señalización intracelular que involucran cinasas como Src, MAPK y PI3K (Barnes, et al., 2004). En cáncer de mama se ha descrito que el GPER está involucrado en diversos procesos como el crecimiento celular, migración e invasión (Lappano, et al., 2014).

También se ha localizado a GPER en el cerebro y su activación por E2 causa neuroprotección en el hipocampo así como liberación del factor liberador de gonadotropinas (GnRH). La actividad de GPER es independiente de ER α y ER β (Oline & J Kelly, 2010).

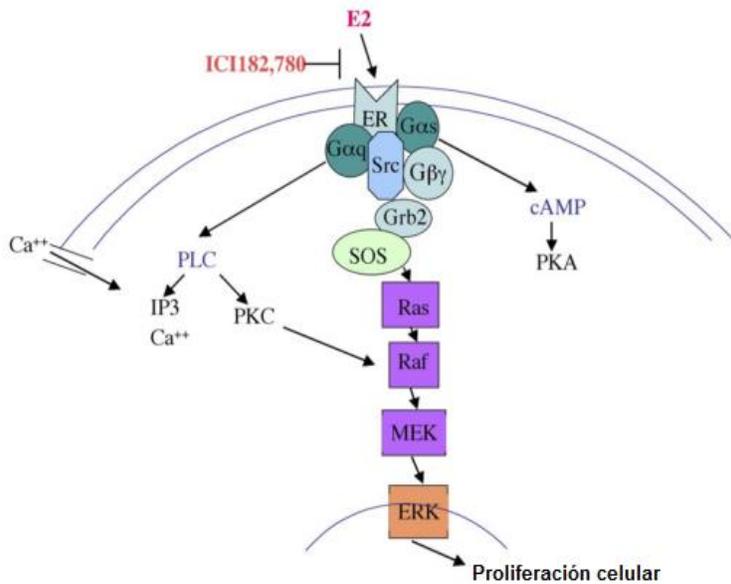


Figura VII Mecanismo no genómico de los receptores a estrógenos. Señalización rápida en células de cáncer de mama. El ER translocado a membrana se dimeriza en respuesta al 17 β -estradiol (E2), lo que da como resultado una rápida activación de la proteína G que a su vez activa cascadas de cinasas. Proteína cinasa activada por mitógeno (MEK); inositol 1,4,5-trisfosfo (IP3); cinasas reguladas extracelularmente (ERK). Imagen modificada de Levin, 2008.

4.4.3. Estradiol y glioblastomas

Ha sido descrito que el E2 promueve el crecimiento celular de líneas celulares derivadas de astrocitomas a través de ER α , además de que regula la expresión de genes que participan en la progresión tumoral como ciclina D1, VEGF y EGFR (González-Arenas et al., 2012). La regulación del movimiento endotelial por el E2 y la P4 es importante para la angiogénesis tumoral ya que representa un factor decisivo para el crecimiento y migración de las células cancerosas. Del mismo modo, se sabe que el E2, a través de sus receptores, activa diversas cascadas de señalización que promueven la remodelación del esqueleto de actina lo que lo que es crucial para el movimiento celular (Giretti & Simoncini, 2008).

También se ha observado que en líneas celulares derivadas de glioblastoma, el E2 regula la expresión tanto de PR como de los mRPs, en ambos casos se observó que al tratar las células con E2 se incrementa la expresión de estos receptores (Hansberg-Pastor, et al., 2017; Valadez-Cosmes et al., 2016), por lo que el E2 podría potenciar los efectos de la P4 en la progresión de los gliomas.

Se ha reportado que ER β se expresa en tumores astrocíticos y su expresión está negativamente relacionada con el grado del tumor (Batistatou et al., 2004). Varios fármacos selectivos para ER β han sido sintetizados y probados para el tratamiento de gliomas. Se piensa que actúa como supresor de tumores ya que el tratamiento de células derivadas de gliomas con agonistas de este receptor redujo el crecimiento tumoral y la proliferación (Sareddy et al., 2012).

Por otra parte ER α ha sido propuesto como un promotor de tumores y ha sido descrito en líneas celulares cancerosas que el E2 a través de ER α puede inducir remodelación de la cromatina y cambios en la regulación epigenética de sus genes blanco (Kundakovic, 2017). En cáncer de mama se ha reportado que el E2 participa en la regulación de la actividad de EZH2. La activación de cinasas a través de los receptores membranales a E2 provoca la fosforilación de EZH2 lo que aumenta la actividad catalítica de esta enzima (Oline & J Kelly, 2010). De igual forma, EZH2 es un gen regulado por estrógenos en cáncer de mama (Bhan et al., 2014) y en un estudio donde se inmunoprecipitó a EZH2, se encontró que el ER α se encuentra asociado a PRC2 (Shi et al., 2007). Además el E2 a través de GPER induce la expresión de HOTAIR, un lncRNA que se une directamente a EZH2 y recluta el complejo Polycomb hacia diversos genes blanco (Tao et al., 2015). Estos datos sugieren que E2 podría regular la actividad de EZH2 en GBM ya que son tumores que han demostrado ser sensibles a tratamientos hormonales, además de que se caracterizan por una alta expresión de EZH2 y de ER α (González-Arenas et al., 2012).

5. Planteamiento del Problema

Se sabe que el gen EZH2 está sobre-expresado en biopsias de GBM, y que esto es un mal pronóstico para el paciente ya que regula diversos procesos involucrados en la malignidad tumoral tales como proliferación, invasión y resistencia a terapia. También se ha reportado que el E2 y la P4 promueven la progresión tumoral al inducir proliferación, migración e invasión en líneas celulares derivadas de GBMs humanos. Sin embargo, se desconoce si las hormonas sexuales regulan la expresión de EZH2 en este tipo de tumores.

6. Hipótesis

Si la P4 y el E2, que se sabe promueven el desarrollo de los GBM, regulan la expresión de EZH2 (que se encuentra sobre-expresado en GBM), entonces la administración de estas hormonas incrementará la expresión de EZH2 en células derivadas de GBM humanos.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de las hormonas sexuales (E2 y P4) sobre la expresión de EZH2 en células derivadas de GBM humanos.

7.2. Objetivos particulares

- Conocer los posibles sitios de unión para los PR y ER en la secuencia promotora del gen EZH2.
- Determinar la expresión basal de EZH2 en las líneas derivadas de GBM humanos U251, D54 y U87.
- Evaluar el efecto de P4 y E2 sobre la expresión de EZH2 en la línea celular U87.

8. Metodología

8.1. Análisis *in silico*

La secuencia del gen EZH2 fue obtenida de la base de datos de National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos (NCBI). Las regiones promotoras y sitios de inicio de la transcripción se obtuvieron de la base de datos Ensembl y se confirmaron por EPD (Eukaryotic Promoter Database). Se buscaron sitios de respuesta a E2 (ERE) y P4 (PRE) usando las bases de datos JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>), UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), Genomatix MatInspector y TRANSFAC. Los datos se analizaron con el software Unipro UGENE v.1.26.3. En todos los casos se estableció como un sitio de unión potencial aquel que fuera predicho por dos o más bases de datos con un valor de score mayor a 0.8 y/o $p < 0.05$.

8.2. Cultivo Celular y tratamientos hormonales

Se cultivaron las células U87, U251 y D54 derivadas de GBM humanos en medio DMEM con rojo de fenol suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), piruvato 1 mM, glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales 0.1 mM, a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada, se sembraron 1×10^5 células por pozo, 24 h antes de los tratamientos, el medio fue cambiado por DMEM sin rojo y suplementado con suero fetal bovino sin hormonas. Las células se trataron con Vehículo (0,01% DMSO), P4 (10 nM), E2 (10 nM) y E2 + P4 a las concentraciones ya mencionadas durante 12 y 24 horas.

8.3. Extracción de RNA y RT-qPCR

El RNA fue extraído utilizando TRI Reagent, se separó la fase acuosa con cloroformo, el RNA se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol. Se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer y su integridad fue determinada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (ThermoFisherScientific, MA, USA). En tubos Eppendorf se colocaron los siguientes componentes (cantidades para una reacción): 1 μ L de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL), 1 μ g de RNA total y 1 μ L de dNTPMix (dATP, dGTP, dCTP y dTTP a una concentración de 10 mM cada uno). La mezcla anterior fue calentada a 65°C durante 5 min y rápidamente transferida a un baño de hielo. Posteriormente se agregaron 4 μ L de buffer de reacción (5X First-Strand Buffer), 2 μ L de ditiotreitól (DTT, 0.1 M) y 1 μ L de agua. Se homogenizó e incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se agregó 1 μ L (200 u) de la enzima M-MLV RT a cada tubo de reacción y se incubó a 37°C durante 50 min. Para inactivar a reacción se calentó a 70°C durante 15 min.

El mRNA se cuantificó mediante qPCR usando el sistema LightCycler y el reactivo FastStart DNA Master SYBR Green I de acuerdo a las especificaciones del fabricante. 2 μ L del cDNA obtenido anteriormente fueron utilizados como templado. El programa utilizado fue el siguiente:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 10 minutos
- 45 ciclos de amplificación (95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s)
- Melting Curve (95°C 0s, 65 °C 15 s, rampa de temperatura 0.1 °C/s hasta 95 °C)

El análisis de los resultados se realizó por el método de Δ CT (Schmittgen & Livak, 2008). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a la subunidad ribosomal 18S, de ahí que los resultados sean expresiones relativas. Se realizaron 4 experimentos independientes (**Anexos II y III**)

8.3.1. Oligonucleótidos

Para amplificar al gen EZH2, se utilizó la secuencia de oligonucleótidos previamente reportada por Fujii, *et al*/ en 2008. Se comprobó la selectividad de éstos mediante la herramienta PrimerBlast de NCBI disponible en la página electrónica:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.

Los oligonucleótidos para la amplificación del gen 18S se diseñaron con PrimerBlast. Para ambos oligos (EZH2 y 18S) se verificaron los parámetros fisicoquímicos con NetPrimer disponible en:

<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>.

Se tomó en cuenta que la longitud de los oligonucleótidos no excediera 24 bases, que su contenido de CG estuviera entre el 50 y 60 %, que la Tm calculada estuviera entre 57 y 60°C y que no hubiera complementariedad entre cada par. Además, se consideró que cada par hibridara en una unión exón-exón

18S

Tamaño del amplificado: 167 pb

- Oligonucleótido sentido (5'→3'): AGTGAAACTGCAATGGCTC
- Oligonucleótido antisentido (5'→3'): CTGACCGGGTTGGTTTTGAT

EZH2 (Reportado por Fujii et al., 2008)

Tamaño del amplificado: 120 pb (**Anexo I**).

- Oligonucleótido sentido (5'→3'): CCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGA
- Oligonucleótido antisentido (5'→3'): ACGTCAGATGGTGCCAGCAATA

8.4. Extracción de proteínas y Western Blot

Después del tratamiento las células fueron lisadas con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 150 mM NaCl, 1% TRITON y 0.01% SDS). Los lisados se cuantificaron con el reactivo Pierce® 660 nm ProteinAssay (ThermoScientific, IL, USA) en el equipo NanoDrop 2000®. 20 mg de proteína total fueron separados mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% con voltaje constante (100 V). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara semi-seca a 60 mA por membrana durante 2 horas y media.

La membrana se bloqueó con una solución de albúmina al 5% en TBS tween 0.1% durante dos horas y media a 37 °C. Se incubó con el anticuerpo primario anti-

EZH2 (CellSignaling, MA, USA) toda la noche a 4 °C y se lavó con TBS-Tween 0.1% (5 lavados de 5 min). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo) acoplado a peroxidasa (HRP) por 45 minutos. Las membranas se lavaron nuevamente con TBS-Tween y se revelaron por quimioluminiscencia mediante el kit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoScientific, IL, USA) en un cuarto oscuro y con placas fotográficas. Posteriormente, las membranas se trataron con glicina a pH ácido (pH 2.5) para remover los anticuerpos y se incubaron con un anticuerpo anti α -tubulina siguiendo el protocolo anteriormente descrito usando como anticuerpo secundario un anti-ratón acoplado a HRP.

Se condujo un análisis densitométrico de las bandas obtenidas con el programa ImageJ®. Como control de carga se utilizó α -tubulina, los resultados se muestran como el cociente entre la densidad de la banda correspondiente a EZH2 y la densidad de la α -tubulina.

8.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el software GraphPad Prism 5 para Windows mediante estadística paramétrica, se usó ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

9. Resultados

Para determinar si el gen EZH2 puede ser regulado por hormonas sexuales, se realizó un análisis *in silico* para buscar ERE y PRE. EL gen EZH2 se encuentra en el cromosoma 7q36.1 y cuenta con 25 exones, además posee más de un promotor y varios sitios de inicio de la transcripción (TSS), en la **Figura 8** se muestran dos promotores y cuatro TSS que podrían ser regulados por E2 o P4 de acuerdo con las predicciones de la base de datos Genomatix MatInspector. Se encontró que el gen EZH2 tiene seis sitios de unión a P4, distribuidos en dos promotores, en particular se encontraron cinco posibles PRE en el promotor que se

encuentra cerca de la mitad del gen (**Figuras 8A y 8B**). En la secuencia promotora localizada al inicio del gen se encontró otro probable PRE. Solamente fue localizado un posible ERE cerca del segundo promotor.

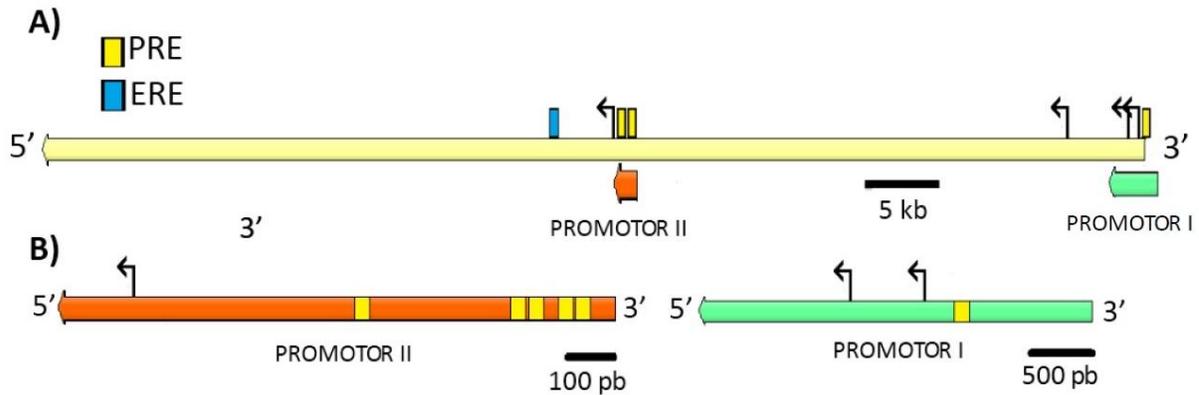


Figura VIII Análisis in silico de la secuencia genómica de EZH2. A) Representación visual del gen EZH2, los sitios de inicio de la transcripción (flechas) y los promotores. Los ERE y PRE están marcados con rectángulos azules y amarillos. El análisis se realizó en cuatro bases de datos diferentes (TRANSFAC, JASPAR, NuBISCAN y Genomatix) y los sitios se consideraron positivos si fueron predichos por dos o más bases de datos con un valor de puntuación de 0.8 o más y $p < 0.05$. B) Ampliación de promotores I y II. Las barras de escala son denotadas.

Posteriormente se determinó la expresión basal del gen EZH2 en tres diferentes líneas celulares derivadas de GBM humanos. Los resultados se muestran en la **Figura 9**. Se encontró que las tres líneas celulares derivadas de GBM humanos (U87, U251 y D54) expresan EZH2 bajo condiciones basales con diferencias significativas entre ellas, siendo U251 la línea que mostró la mayor expresión y U87 la menor. La línea celular HEK-293 derivada de riñón fetal humano se utilizó como control de expresión ya que hay reportes de que expresa EZH2 de forma basal (Su et al., 2005).

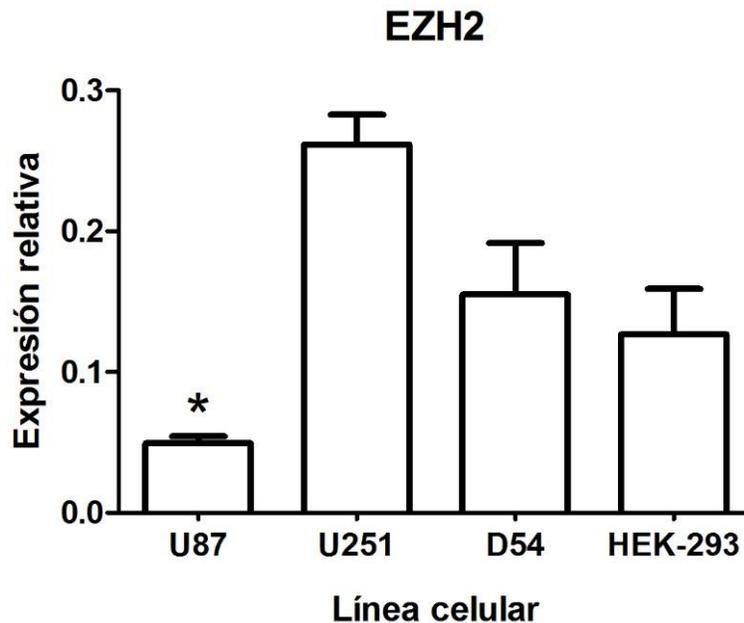


Figura IX. Expresión basal de EZH2. La cantidad de RNA mensajero correspondiente a EZH2 fue determinada mediante RT-qPCR en tres diferentes líneas celulares derivadas de GBM humanos (U87, U251 y D54) cultivadas bajo condiciones basales y usando la línea celular HEK-293 como control positivo. * $p < 0.05$ vs U251. Cada barra representa la media \pm E.E. $n=3$.

Posteriormente se procedió a tratar a la línea celular U87 con P4 y E2, ambos a 10 nM por 12 y 24 horas. Los datos se muestran en la **figura 10**. El tratamiento con P4 no modificó la expresión de EZH2 en ninguno de los tiempos evaluados (en comparación con el vehículo), sin embargo, se observó que el E2 indujo la expresión de dicho gen a las 12 horas. Dicho efecto fue contrarrestado a cuando se administró en conjunto con la P4. En cambio, cuando se trataron las células por 24 horas con P4 y E2 la expresión presentó una tendencia a disminuir con respecto al vehículo, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Del mismo modo, por medio de Western Blot se evaluaron los efectos de los tratamientos hormonales sobre el contenido de EZH2 a las 12 y 24 horas (**Figura 11**).

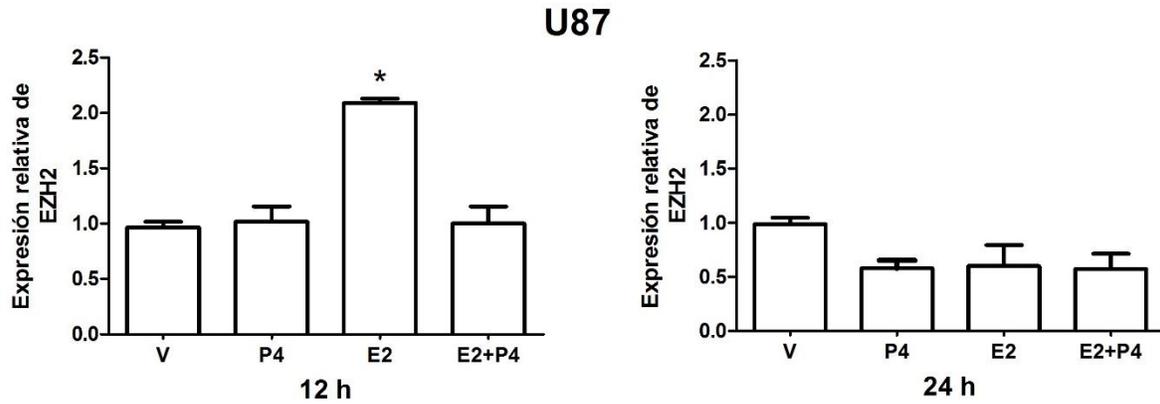


Figura X. Efecto de las hormonas sexuales en la expresión de EZH2 en la línea celular U87. Los cambios en la expresión de EZH2 fueron cuantificados mediante RT-qPCR después de que las células fueron tratadas con V (DMSO 0.01%), P4 10 nM, E2 10 nM y E2+P4 por 12 y 24 horas. * $p < 0.001$ vs. todos los tratamientos. Cada barra representa la media \pm E.E. $n=4$.

El tratamiento con P4 no modificó la cantidad de proteína a ninguno de los tiempos evaluados, con respecto al vehículo. El E2 no modificó significativamente la cantidad de EZH2 con respecto a los otros tratamientos, sin embargo, no se descarta el hecho de que es observable una tendencia del E2 a disminuir la cantidad de proteína a 12 horas. Interesantemente, el tratamiento conjunto tampoco parece tener efecto sobre la cantidad de EZH2.

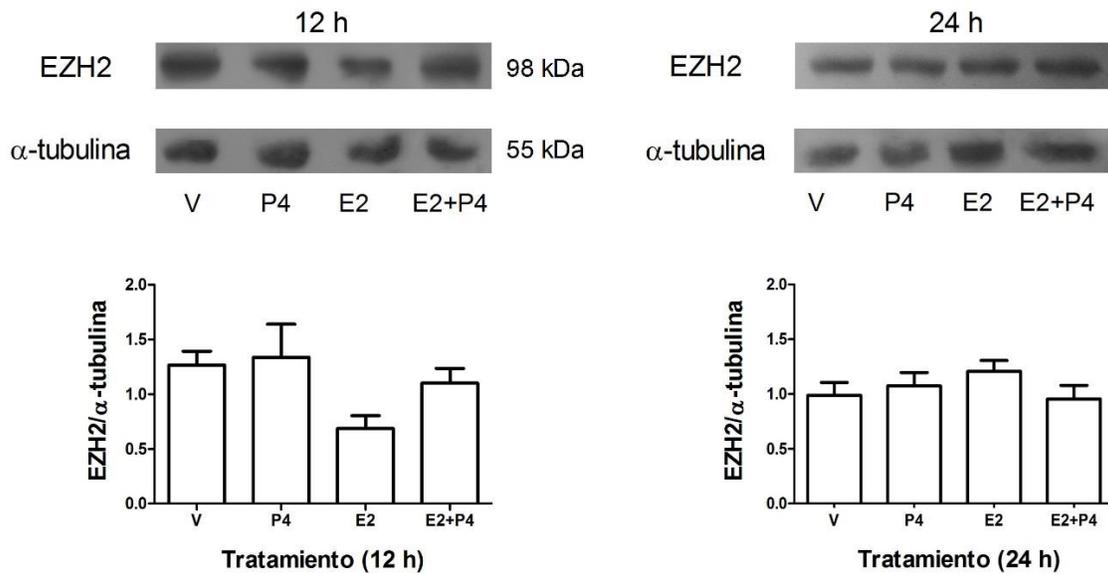


Figura XI. Efecto del E2 sobre la cantidad de proteína EZH2 A Los cambios en la cantidad de EZH2 fueron evaluados mediante Western Blot después de que las células fueron tratadas con V (DMSO 0.01%), P4 10 nM, E2 10 nM y E2+P4 por 12 y 24 horas. Cada barra representa la media \pm E.E. $n=3$.

10. Discusión

Anteriormente ha sido reportado que EZH2 se encuentra expresado en biopsias de pacientes con glioblastoma y que está directamente relacionado con el grado del tumor (J. Zhang et al., 2015), además, se ha demostrado que EZH2 es necesario para el mantenimiento de las GSC (Suvà et al., 2009) y que regula procesos como proliferación, invasión y migración (Yin et al., 2016), que también se ven afectados por tratamientos hormonales en células derivadas de GBM humanos (González-Arenas et al., 2012; Piña-Medina et al., 2016) Además, se ha descrito que este gen se sobre-expresa en cáncer de mama y próstata, que son tumores sensibles a la regulación hormonal (Bhan et al., 2014; Sørensen & Ørntoft, 2010), lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden tener un papel importante en la expresión de EZH2 (Oline & J Kelly, 2010). Para evaluar si EZH2 es regulado por hormona sexuales, se realizó un análisis *in silico*, en el cual se encontraron varios potenciales PRE en los promotores de EZH2 lo que sugiere que la transcripción puede ser regulada por P4 a través del PR, lo cual no ha sido reportado hasta el momento. Por otra parte, sólo se encontró un posible ERE, aunque no se debe descartar el hecho de que el ER puede regular la transcripción de genes que no contienen ERE, por lo que la falta de éstos no descarta del todo una regulación por estrógenos (Oline & J Kelly, 2010)

Para demostrar que EZH2 se expresa en líneas celulares derivadas de GBMs humanos, se evaluó su expresión basal en tres líneas derivadas de este tipo de tumores (U87, U251 y D54), utilizando las células HEK-293 como control positivo ya que en estudios previos se reportó que expresa a EZH2 (Su et al., 2005). Las tres líneas evaluadas expresan a EZH2 de forma basal, la D54 y U251 incluso tienen una mayor expresión que el control positivo (células HEK-293). Las células HEK-293 son derivadas de un riñón fetal humano, por lo que es normal que expresen a EZH2 ya que esta enzima se encuentra muy activa durante el desarrollo embrionario debido a que el complejo PRC2 está encargado de silenciar los genes tejido-específicos, proceso crucial para la diferenciación celular (Margueron & Reinberg, 2011). Sin embargo, en un tejido diferenciado, se espera poca expresión de EZH2,

salvo en algunas excepciones (se expresa en gran medida en linfocitos donde contribuye a la sinapsis inmunológica, Nolz, Gomez, & Billadeau, 2005). La alta expresión de EZH2 en las líneas celulares evaluadas es, en parte, un indicador de que las células tumorales han perdido su identidad y progresado en el grado de anaplasia. La sobre-expresión de esta enzima está relacionada con mayor malignidad del tumor, resistencia a fármacos, alta proliferación, invasión y migración (Fan et al., 2014; Ott et al., 2012. Yen et al., 2017)

Para evaluar el papel de las hormonas sexuales sobre la expresión de EZH2, se realizaron tratamientos con P4 10 nM ya que en estudios previos se ha reportado que a esta concentración se induce la proliferación, migración e invasión de células derivadas de GBM humanos (Piña-Medina et al., 2016), además de que es similar a las concentraciones fisiológicas humanas (M Schumacher et al., 2014). Se observó que este tratamiento no modificó los niveles de expresión de EZH2 a ninguno de los tiempos evaluados, tanto a nivel de mRNA como de proteína, lo que sugiere que la P4 no regula la expresión de EZH2, a pesar de que su región promotora contiene posibles PREs.

Por otra parte, también se realizaron tratamientos con E2 10 nM, concentración a la cual ha sido reportado que se induce el crecimiento de células derivadas de gliomas humanos (González-Arenas et al., 2012). De manera interesante, el tratamiento con E2 aumentó la expresión de EZH2 a nivel del mRNA a las 12 horas, mientras que el tratamiento conjunto de E2+P4 no tuvo efecto significativo. Esto sugiere que el ER regula la transcripción de EZH2 debido a que la expresión se ve abatida al tratar las células con P4 + E2, lo cual es característico de genes regulados por estrógenos, ya que se ha reportado que al tratar las células con P4 el PR secuestra al ER y lo conduce hacia los promotores regulados por PR, disminuyendo la expresión de los genes regulados por estrógenos (Singhal et al., 2016).

En cáncer de mama ha sido reportado que el E2 puede regular la expresión de EZH2 a nivel transcripcional a través del ER (Bhan et al., 2014). También se ha descrito que el E2, a través de sus receptores membranales, puede activar cascadas de cinasas que conllevan a la fosforilación de EZH2, lo que aumenta su

actividad (Lu et al., 2016), por lo que no es necesario que aumente la cantidad de EZH2 total para que se vea un aumento en la actividad de KMT que podría tener un impacto en el estado de la cromatina de la célula.

Es importante tener en cuenta que a 24 horas no se observó un cambio significativo en la cantidad de mRNA para EZH2 con los tratamientos hormonales con respecto al vehículo. Esto podría ser un indicador de que el efecto inducido por el E2 es de corta duración, por lo que sería interesante hacer determinaciones a tiempos más cortos de tratamiento.

Sin embargo, a nivel de proteína parece que el E2 disminuye la cantidad de EZH2 después de 12 horas de tratamiento, aunque la disminución no fue estadísticamente significativa, lo cual sugiere que existe un mecanismo de regulación postranscripcional. Es sabido que EZH2 es regulado por varios miRNAs (Yin et al., 2016), como miR-101, el cual se ha reportado que disminuye la cantidad de EZH2 a nivel de proteína (Smits et al., 2010) por lo que cabe la posibilidad de que el E2 regule la expresión de algún miRNA cuyo blanco sea EZH2, lo cual explicaría el hecho de que aumente el mRNA al mismo tiempo que la cantidad de proteína disminuye.

Los resultados indican que EZH2 puede ser regulado por E2 en GBMs, sin embargo, esta modulación parece ser compleja, lo cual corresponde con el importante papel que desempeña esta enzima en la célula. En estudios recientes se ha descubierto que la inhibición prolongada de EZH2 causa una reversión en el fenotipo celular lo que conduce a la progresión tumoral (De Vries et al., 2015), además de que en otros tipos de tumores, se ha descrito que EZH2 actúa como un gen supresor de tumores (Yan et al., 2017). Se ha especulado que el rol que juega esta enzima en el cáncer depende del tipo de célula que dio origen al tumor y del ambiente en el que este se encuentre inmerso, además de que mantener un equilibrio en la actividad de EZH2 es importante para la homeostasis celular (Scelfo et al., 2015). Sin duda, el papel que tiene EZH2 en GBMs es complejo, pero a la vez es interesante ya que el estudio de esta metiltransferasa de histonas puede ayudar a comprender los procesos que conducen a la progresión maligna de los tumores.

10. Conclusiones

1. EZH2 se expresa de forma basal en líneas celulares derivadas de GBM humanos.
2. El E2 indujo la expresión de EZH2 en la línea celular U87 (derivada de un glioblastoma humano) a nivel de RNA mensajero después de 12 horas de tratamiento.
3. Ninguno de los tratamientos (E2, P4 y E2+P4) afectó la cantidad de proteína correspondiente a EZH2 a los tiempos evaluados.

11. Perspectivas

Dado que se observó que el E2 puede regular la transcripción de EZH2 en U87, se espera realizar experimentos en presencia de antagonistas de ER α con el fin de dilucidar la vía mediante la cual el E2 regula la expresión de EZH2.

También resulta interesante investigar el papel del E2 en la actividad de EZH2 e investigar los genes que modifiquen su patrón de H3K27me3 a fin de comprender los procesos celulares que se ven afectados por el tratamiento hormonal y que probablemente contribuyen a la progresión maligna de los GBM humanos.

12. Referencias

- American Cancer Society. (2014). Early History of Cancer. Retrieved August 31, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html>
- Atif, F., Yousuf, S., & Stein, D. G. (2015). Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 146, 62-73.
- Barnes, C. J., Vadlamudi, R. K., & Kumar, R. (2004). Novel estrogen receptor coregulators and signaling molecules in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci*, 61, 281–291.
- Batistatou, A., Stefanou, D., Goussia, A., Arkoumani, E., Athanasios, A., Papavassiliou, G., & Agnantis, N. J. (2004). Estrogen receptor beta (ERb) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130, 405–410.
- Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K. I., Bobzean, S. A. M., Perrotti, L. I., & Mandal, S. S. (2014). Histone Methyltransferase EZH2 Is Transcriptionally Induced by Estradiol as Well as Estrogenic Endocrine Disruptors Bisphenol-A and Diethylstilbestrol. *Journal of Molecular Biology*, 426, 3426–3441.
- Cabrera-Muñoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., & Camacho-Arroyo, I. (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 113, 80–84.
- Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E. R., & Cerbón, M. (2017). *Mechanism of Progesterone Action in the Brain*. (D. . Pfaff & M. Joëls, Eds.) (3rd ed., Vol. 3). Oxford: Elsevier Inc.
- Chow, A. Y. (2010). Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education*, 3(9), 7.
- Collinson, A., Collier, A. J., Morgan, N. P., Sienerth, A. R., Chandra, T., Andrews, S., ... Rugg-Gunn, P. J. (2016). Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, 17(6), 2700–2714.
- Comet, I., Riising, E. M., Leblanc, B., & Helin, K. (2016). Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(12), 803–810.
- De Vries, N. A., Hulsman, D., Akhtar, W., De Jong, J., Miles, D. C., Blom, M., ... Van Lohuizen, M. (2015). Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. *CellReports*, 10,

383–397.

- Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *Biology Reports*, 6(May), 1–6.
- Fan, T. Y., Wang, H., Xiang, P., Liu, Y. W., Li, H. Z., Lei, B. X., ... Qi, S. T. (2014). Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in Glioblastoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(10): 6662–6670.
- Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 444–448.
- Fujii, S., Ito, K., Ito, Y., & Ochiai, A. (2008). Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17324–32.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., ... Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), 2683–710.
- Gall Trošelj, K., Novak Kujundzic, R., & Ugarkovic, D. (2016). Polycomb repressive complex's evolutionary conserved function: the role of EZH2 status and cellular background. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 55.
- Garg, D., Sin, S., Ng, M., Baig, K. M., Driggers, P., & Segars, J. (2017). Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(9), 656–668.
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Intracellular Progesterone Receptor Mediates the Increase in Glioblastoma Growth Induced by Progesterone in the Rat Brain. *Archives of Medical Research*, 47(6), 419–426.
- Giretti, M. S., & Simoncini, T. (2008). Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement through the actin cytoskeleton. *Steroids*, 73(9–10), 895–900.
- González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, a, Cerbón, M. a, & Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Research Bulletin*, 56(1), 43–48.
- González-Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., ... Camacho-Arroyo, I. (2012). Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(2), 379–386.
- Hadjipanayis, C. G., & Van Meir, E. G. (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in Molecular Medicine*, 15(11), 519–530.
- Hamza, M. A., & Gilbert, M. (2014). Targeted therapy in gliomas. *Current Oncology*

Reports, 16(4), 379.

- Han, L., Zhang, K., Shi, Z., Zhang, J., Zhu, J., Zhu, S., ... Kang, C. (2012). LncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis. *International Journal of Oncology*, 40(6), 2004-12.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., Pan, K. H., Shay, J. W., Cohen, S. N., Taylor, M. B., ... al., et. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hansberg-Pastor, V., Gonz Alez-Arenas, A., & Camacho-Arroyo, I. (2017). CCAAT/enhancer binding protein β negatively regulates progesterone receptor expression in human glioblastoma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439, 317–327.
- Hansberg, V., González, A., & Camacho, I. (2014). Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos. *Mensaje Bioquímico*, 51, 127–144.
- Heldring, N., Isaacs, G. D., Diehl, A. G., Sun, M., Cheung, E., Ranish, J. A., & Kraus, W. L. (2011). Multiple sequence-specific DNA-binding proteins mediate estrogen receptor signaling through a tethering pathway. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(4), 564–74.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., ... Gustafsson, J.-Å. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905-31.
- Helin, K., & Dhanak, D. (2013). Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature*, 502(7472), 480–488.
- Henley, D., Lindzey, J., Korach, K. S., KorachMelmed, S., & Conn, P. M. (2005). *Endocrinology: basic and clinical principles* (2nd ed.). Humana Press.
- Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., & Camacho-Arroyo, I. (2012). Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132, 127–134.
- Ivanchuk, S. M., Mondal, S., Dirks, P. B., & Rutka, J. T. (2001). The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *Journal of Neuro-Oncology*, 51(3), 219–29.
- Katoh, M. (2015). Mutation spectra of histone methyltransferases with canonical SET domains and EZH2-targeted therapy. *Epigenomics*, 4, epi.15.89.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D. H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., ... Lee, J. (2013). Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell*, 23, 839–852.

- Kim, T. S., Halliday, A. L., Hedley-Whyte, E. T., & Convery, K. (1991). Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *Journal of Neurosurgery*, 74(1), 27–37. <https://doi.org/10.3171/jns.1991.74.1.0027>
- Kundakovic, M. (2017). Sex-Specific Epigenetics: Implications for Environmental Studies of Brain and Behavior. *Curr Envir Health Rpt*, 4, 385–391.
- Lappano, R., Pisano, A., & Maggiolini, M. (2014a). GPER function in breast cancer: an overview. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 66. <http://doi.org/10.3389/fendo.2014.00066>
- Lappano, R., Pisano, A., & Maggiolini, M. (2014b). GPER Function in Breast Cancer: An Overview. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 66.
- Levin, E. R. (2008). Rapid signaling by steroid receptors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1425-30.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- Lu, H., Li, G., Zhou, C., Jin, W., Qian, X., Wang, Z., & Pan, H. (2016). Regulation and role of post-translational modifications of enhancer of zeste homologue 2 in cancer development, 6(12), 2737–2754.
- Marceau, K., Ruttle, P. L., Shirtcliff, E. A., Essex, M. J., Susman, E. J., Studies, A., ... Orleans, N. (2015). Progesterone downregulation of miR-141 contributes to expansion of stem-like breast cancer cells through maintenance of progesterone receptor and Stat5a. *Oncogene*, 57(6), 742–768.
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), 343–9.
- Marsh, D. J., Shah, J. S., Cole, A. J., & Garcia-Bassets, I. (2014). Histones and their modifications in ovarian cancer – drivers of disease and therapeutic targets. *Front Oncol*. 12, 4:144.
- Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D. P., H, J. W., Comet, I., ... Helin, K. (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nature Medicine*, 23(4), 483–492.
- Mukherjee, S. (2010). *El emperador de todos los males* (1st ed.). CDMX: Penguin Random House.
- Nolz, J. C., Gomez, T. S., & Billadeau, D. D. (2005). The Ezh2 methyltransferase

complex : actin up in the cytosol, *15*(10), 514–517.

Oline, K. R., & J Kelly, M. (2010). *Mechanism of progesterone receptor action in the brain.* (D. W. Pfaff & M. Joeis, Eds.), *Hormones, Brain and Behavior Online* (3rd ed., Vol. 3). O: Elsevier Inc.

OMS | Cáncer. (2017). *WHO*.

Ott, M., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Rauschenbach, K. J., Tudoran, R., Hartmann, C., ... Platten, M. (2012). Promotion of Glioblastoma Cell Motility by Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Mediated by AXL Receptor Kinase. *PLoS ONE*, *7*(10), 1-10.

Pal, B., Bouras, T., Shi, W., Vaillant, F., Sheridan, J. M., Fu, N., ... Visvader, J. E. (2013). Global Changes in the Mammary Epigenome Are Induced by Hormonal Cues and Coordinated by Ezh2. *Cell Reports*, *3*(2), 411–426.

Piña-Medina, A. G., Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Cerbón, M., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Progesterone promotes cell migration , invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*, *105*, 19–25.

Reifenberger, G., Wirsching, H.-G., Knobbe-Thomsen, C. B., & Weller, M. (2016). Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. *14*(7), 434-452.

Romano, S. N., & Gorelick, D. A. (2017). Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *General and Comparative Endocrinology*. S0016-6480(16)30496-8.

Rossetti, M. F., Cambiasso, M. J., Holschbach, M. A., & Cabrera, R. (2016). Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *28*(7), 1–11.

Sareddy, G. R., Nair, B. C., Gonugunta, V. K., Zhang, Q., Brenner, A., Brann, D. W., ... Vadlamudi, R. K. (2012). Therapeutic significance of estrogen receptor β agonists in gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(5), 1174–82.

Sarkar, C., Jain, a, & Suri, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*, *46*(2), 108.

Sauvageau, M., & Sauvageau, G. (2010). Cell Stem Cell Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. *Stem Cell*, *7*, 299–313.

Scelfo, A., Piunti, A., & Pasini, D. (2015). The controversial role of the Polycomb group proteins in transcription and cancer: How much do we not understand Polycomb proteins? *FEBS Journal*, *282*(9), 1703–1722.

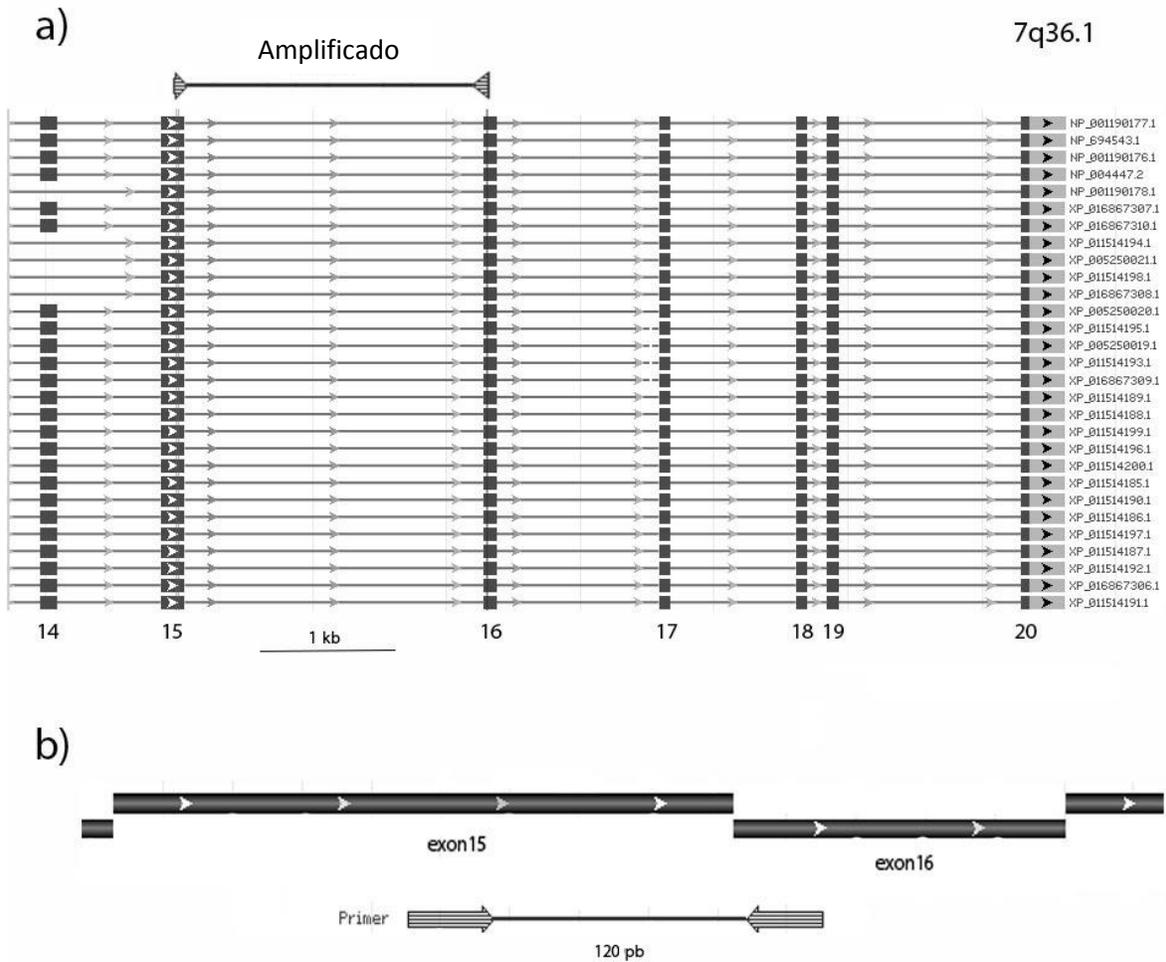
Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108.

Schumacher, M., Coirini, H., Robert, F., Guennoun, R., & El-Etr, M. (1999). Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive

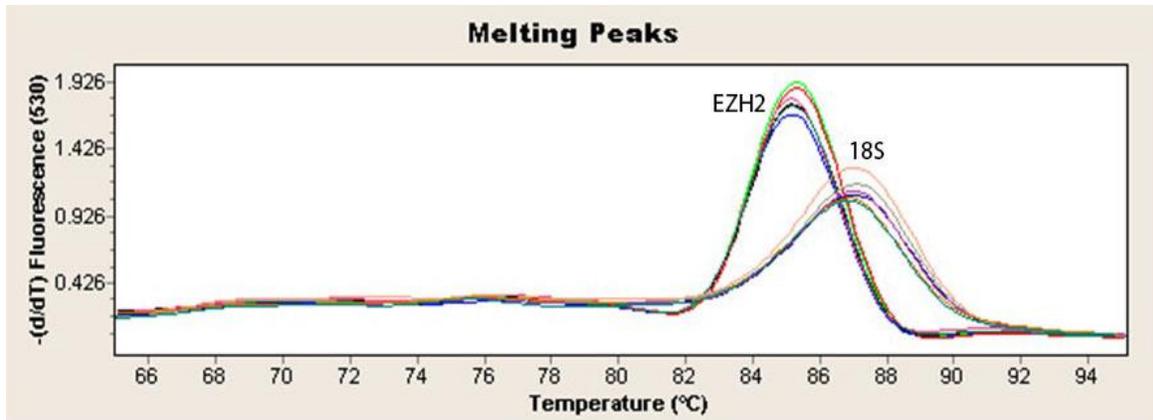
- physiology and behavior. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 37–52.
- Schumacher, M., Mattern, C., Ghomari, A., Oudinet, J. P., Liere, P., Labombarda, F., ... Guennoun, R. (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. *Progress in Neurobiology*, 113, 6–39.
- Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C. B., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2016). Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *BBA - Molecular Cell Research*, 1863, 2289–2298.
- Shi, B., Liang, J., Yang, X., Wang, Y., Zhao, Y., Wu, H., ... Shang, Y. (2007). Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(14), 5105–5119.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401.
- Singhal, H., Greene, M. E., Tarulli, G., Zarnke, A. L., Bourgo, R. J., Laine, M., ... Greene, G. L. (2016). Genomic agonism and phenotypic antagonism between estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Sci. Adv.*, 2(e1501924), 1–14.
- Smits, M., Nilsson, J., Mir, S. E., van der Stoop, P. M., Hulleman, E., Niers, J. M., ... Würdinger, T. (2010). miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget*, 1(8), 710–20.
- Sørensen, K. D., & Ørntoft, T. F. (2010). Discovery of prostate cancer biomarkers by microarray gene expression profiling. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(1), 49–64.
- Su, I., Dobenecker, M., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., ... Tarakhovskiy, A. (2005). Polycomb Group Protein Ezh2 Controls Actin Polymerization and Cell Signaling, 121, 425–436.
- Suvà, M. L., Riggi, N., Janiszewska, M., Radovanovic, I., Provero, P., Stehle, J. C., ... Stamenkovic, I. (2009). EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Research*, 69(24), 9211–9218.
- Tamm-Rosenstein, K., Simm, J., Suhorutshenko, M., Salumets, A., & Metsis, M. (2013). Changes in the Transcriptome of the Human Endometrial Ishikawa Cancer Cell Line Induced by Estrogen, Progesterone, Tamoxifen, and Mifepristone (RU486) as Detected by RNA-Sequencing. *PLOS ONE*, 8(7), 1–12.
- Tao, S., He, H., & Chen, Q. (2015). Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer. *Journal of Translational Medicine*, 13, 131.

- Turner, B. M. (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(2), 110–112.
- Valadez-Cosmes, P., Germán-Castelán, L., González-Arenas, A., Velasco-Velázquez, M. A., Hansberg-Pastor, V., & Camacho-Arroyo, I. (2015). Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 176–185.
- Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E. R., Cerbón, M., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434, 166–175.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., ... Reifenberger, G. (2015). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, (July), 15017.
- Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 31–37.
- Yan, K.-S., Lin, C.-Y., Liao, T.-W., Peng, C.-M., Lee, S.-C., Liu, Y.-J., ... Chou, R.-H. (2017). EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1172.
- Yen, S.-Y., Chuang, H.-M., Huang, M.-H., Lin, S.-Z., Chiou, T.-W., & Harn, H.-J. (2017). n-Butylidenephthalide Regulated Tumor Stem Cell Genes EZH2/AXL and Reduced Its Migration and Invasion in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 372.
- Yen, S. S. C., & Jaffe, R. B. (1991). *Reproductive Endocrinology*. (M. Wonsiewicz, Ed.) (3rd ed.). Philadelphia: Saunders.
- Yin, Y., Qiu, S., & Peng, Y. (2016). Functional roles of enhancer of zeste homolog 2 in gliomas. *Gene*, 576(1), 189–194.
- Zhang, J., Chen, L., Han, L., Shi, Z., Zhang, J., Pu, P., & Kang, C. (2015). EZH2 is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in glioblastoma. *Cancer Letters*, 356(2), 929–936.
- Zhang, K., Sun, X., Zhou, X., Han, L., Chen, L., Shi, Z., ... Kang, C. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget*, 6(1), 537–46.
- Zhao, X. D., Han, X., Chew, J. L., Liu, J., Chiu, K. P., Choo, A., ... Wei, C.-L. (2007). Whole-Genome Mapping of Histone H3 Lys4 and 27 Trimethylations Reveals Distinct Genomic Compartments in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1, 286–298.

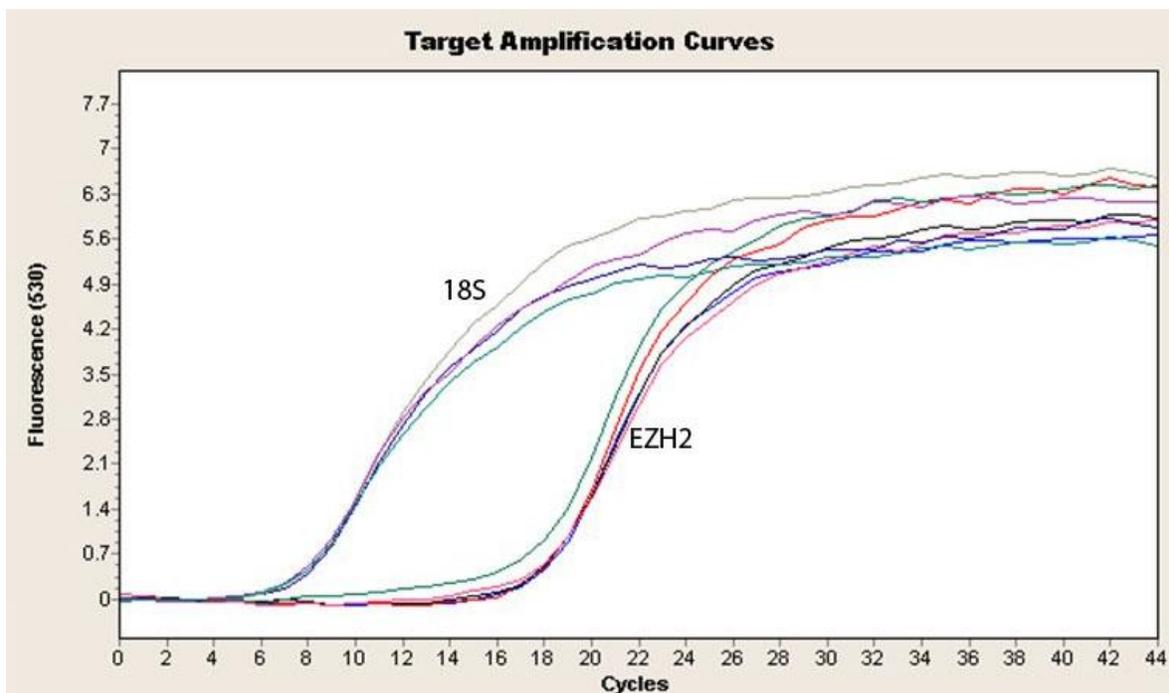
13. Anexos



Anexo I. Localización de los oligonucleótidos (primers) utilizados para amplificar a EZH2. a) Representación de los exones 14 a 20 del gen EZH2, el cual está ubicado en el brazo largo del cromosoma 7. Se muestran las 24 variantes de mRNA encontradas en la base de datos de NCBI. Las cajas oscuras corresponden a los exones y las líneas a intrones. Las cajas claras corresponden a la región 3' UTR. Se indica la sección amplificada mediante RT-qPCR. b) El amplificado (120 pb) se encuentran entre el exón 15 y 16 del gen EZH2, la ubicación de los oligonucleótidos o primers se representó con flechas.



Anexo II. Melting curves para los amplificado de EZH2 y 18S. Curvas obtenidas después de la amplificación de EZH2 y 18S mediante RT-qPCR. Se observó una T_m a 85.2 °C, mientras que para 18S fue de 87.6 °C. Las curvas corresponden a muestras basales de la línea celular U87. El programa seguido para la Melting Curve fue el siguiente: 95°C 0s, 65 °C 15 s, rampa de temperatura 0.1 °C/s hasta 95 °C.



Anexo III. Curvas de amplificación. Se muestra la relación de fluorescencia con respecto al número de ciclos para la amplificación de EZH2 y 18S mediante RT-qPCR en distintas muestras basales de la línea celular U87. Se observó que el gen 18S tiene un mayor C_p que el correspondiente a EZH2. Cada ciclo corresponde al siguiente programa: desnaturalización 95 °C 10 s, alineamiento 60 °C 10 s, elongación 72 °C 10 s.