



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
ZEB1 Y SU REGULACIÓN POR PROGESTERONA EN CÉLULAS DERIVADAS DE
GLIOBLASTOMAS HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANA MARÍA HERNÁNDEZ VEGA



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: Dra. María de los Ángeles Granados Silvestre
VOCAL: Dr. Ignacio Camacho Arroyo
SECRETARIO: Dra. Verónica Garrocho Villegas
1er. SUPLENTE: M. en C. Francisca Morayna Gutiérrez Luna
2do. SUPLENTE: M. en C. Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Valeria Hansberg Pastor

SUSTENTANTE: Ana María Hernández Vega

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó gracias al financiamiento brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto número 250866, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología- Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

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

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dra. María de los Ángeles Granados Silvestre y Dra. Verónica Garrocho Villegas, por su interés al revisar y comentar esta tesis.

ÍNDICE

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Antecedentes.	4
3.1 Tumores del sistema nervioso central (SNC).	4
3.1.1 Características generales del glioblastoma multiforme (GBM).	6
3.2 Transición epitelio-mesénquima (TEM) en la tumorigénesis del GBM.	7
3.2.1 Mecanismos moleculares de la TEM.	9
3.2.1.1 Regulación de la TEM por factores de transcripción.	9
3.2.1.1.1 Familia de factores de transcripción ZEB.	9
3.2.1.1.1.1 Efectos de la expresión de ZEB1 en GBM.	11
3.2.1.2 Vías de señalización que conducen a la TEM.	13
3.2.1.2.1 Regulación de la expresión de ZEB1 por hormonas sexuales.	14
3.3 El papel de las hormonas esteroides en el SNC y en la progresión de GBM.	15
3.3.1 Progesterona (P4).	16
3.3.1.1 Mecanismos de acción de la P4.	16
3.3.1.2 Funciones del receptor intracelular a P4 (RP).	17
3.3.1.3 Antagonistas de la P4.	20
3.3.1.4 Efectos de la P4 en GBM.	20
4. Planteamiento del problema.	22
5. Hipótesis.	22
6. Objetivos.	23
6.1. Objetivo general.	23
6.2. Objetivos particulares.	23
7. Metodología.	24
7.1. Análisis in silico.	24
7.2. Cultivo celular.	24
7.3. Tratamientos.	25
7.4. Extracción de RNA total.	25
7.5. RT-qPCR.	25

7.6.	Extracción de proteínas y Western Blot.	26
7.7.	Análisis estadístico.	27
8.	Resultados.	28
8.1.	La región reguladora de la transcripción de ZEB1 contiene trece potenciales sitios de unión al RP.	28
8.2.	La P4 incrementa la expresión de ZEB1.	30
8.3.	El efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 es mediado por el RP.	30
9.	Discusión.	34
10.	Conclusiones.	38
11.	Perspectivas.	39
12.	Referencias.	40
13.	Anexos.	54
13.1.	Características de los oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR.	54
13.2.	Elementos de Respuesta a P4 (ERPs) localizados en la región reguladora de la transcripción de ZEB1.	55

1. Resumen

El factor de transcripción ZEB1 (*Zinc finger E-Box 1*) es un importante regulador de la plasticidad celular que determina diversos procesos celulares como la transición epitelio-mesénquima (TEM), la diferenciación, la senescencia, la proliferación, la apoptosis y la supervivencia celular; por lo que se ha determinado que su papel es crucial en los procesos del desarrollo y la progresión del cáncer. En el glioblastoma (GBM), el tumor cerebral maligno más frecuente del Sistema Nervioso Central, ZEB1 se encuentra sobreexpresado y le confiere al tumor mayores propiedades invasivas. La expresión de ZEB1 puede ser inducida por diversas vías de señalización que actúan dependiendo del contexto biológico y del tejido. En algunos tejidos se ha determinado que la expresión de ZEB1 puede ser regulada de forma positiva por hormonas esteroideas como la progesterona (P4), sin embargo, aún no se sabe si esto sucede en el GBM. La P4 es un neuroesteroide capaz de promover la proliferación, la invasión y la migración de células de GBM, principalmente a través del receptor intracelular a P4 (RP), un factor de transcripción activado por ligando. En este estudio, se analizó el efecto que tiene la progesterona (P4) sobre la expresión de ZEB1 en células derivadas de GBM humano. Un análisis *in silico* en la región reguladora de la transcripción de ZEB1 demostró que existen trece potenciales sitios de unión al RP. Por lo tanto, se evaluó el efecto que tiene la P4 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) sobre la expresión de ZEB1 por RT-PCR en las células U251 y U87, derivadas de GBM. En ambos tipos de células, las cuatro concentraciones de P4 aumentaron significativamente la expresión de ZEB1 con respecto al vehículo. Para determinar si el efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 es mediado a través del RP, se usó un antagonista del RP, el RU486 (1 μ M), en conjunto con la P4 (10 nM) a 12 y 24 h, para evaluar la regulación de la expresión génica por RT-PCR y a las 24 y 48 h, para el análisis de la expresión a nivel de la proteína por Western Blot. En las células U251, el RU486 bloqueó totalmente el efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 tanto a nivel de mRNA como de la proteína en los dos tiempos de tratamiento estudiados. Sin embargo, en las células U87, el efecto de la P4 es abatido completamente por el antagonista solamente a 12 h, ya que a tiempos más prolongados el bloqueo es parcial. Nuestros resultados indican que en las células derivadas de GBM la P4 incrementa la expresión de ZEB1 a través del RP.

2. Introducción

Los astrocitomas son los tumores cerebrales malignos más frecuentes del Sistema Nervioso Central (SNC) y constituyen una de las principales causas de muerte relacionadas con el cáncer. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los astrocitomas en cuatro grados de malignidad con base en sus características histopatológicas y parámetros moleculares, de forma que el astrocitoma de grado IV es el más agresivo debido a su naturaleza altamente invasiva (Louis et al. 2016).

El astrocitoma de grado IV, también conocido como glioblastoma multiforme (GBM), se manifiesta principalmente en adultos y se caracteriza por ser altamente proliferativo, invasivo, vascularizado y por presentar extensas áreas de necrosis (Davis 2016). La infiltración profunda de las células de GBM hace difícil la extirpación quirúrgica completa y las terapias adyuvantes contemporáneas han tenido poco impacto en la supervivencia a largo plazo. La naturaleza invasiva del GBM es promovida por la desregulación de múltiples vías de señalización que son capaces de alterar el funcionamiento normal de factores de transcripción, resultando en cambios de la expresión génica. Por lo tanto, existe un creciente interés en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan estas vías, ya que éstos podrían proporcionar el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (Carlsson et al. 2014).

Las células de cáncer invasoras pueden adoptar diferentes modos de motilidad y, específicamente, el GBM utiliza el modo mesenquimal, que está asociado con un fenotipo altamente invasivo (Brennan et al. 2013). La transdiferenciación de células epiteliales a células móviles mesenquimales -un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM)- es esencial durante el desarrollo embrionario y procesos de cicatrización y regeneración de tejidos, y su desregulación contribuye patológicamente a la progresión tumoral (Kalluri et al. 2009). Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la TEM, son llevados a cabo a través de un preciso programa de regulación transcripcional, el cual involucra a tres importantes familias de factores de transcripción: SNAIL, ZEB y TWIST (Peinado et al. 2007). Hasta ahora, se ha demostrado que la desregulación funcional de estos factores de transcripción tiene un importante papel en todas las etapas de la progresión del cáncer; desde la iniciación, crecimiento del tumor primario, invasión, diseminación y metástasis; hasta la colonización celular así como la resistencia a la terapia (T. Brabletz et al. 2018). ZEB1 no sólo ha destacado por ser un factor crucial y determinante de la TEM, sino también por poseer

funciones pleiotrópicas al regular de manera central otros procesos celulares que definen el destino celular, como los son la diferenciación, proliferación y supervivencia (Brabletz et al. 2010). Se ha mostrado que la expresión de ZEB1 es diferencialmente regulada entre tejidos y la dinámica de sus funciones depende enteramente del tipo y contexto celular. Un ejemplo de esto último, es la regulación por hormonas sexuales esteroides como los progestágenos (Richer et al. 2002; Renthall et al. 2010), los estrógenos (Liebert et al. 2004) y los andrógenos (Anose et al. 2011), quienes regulan la expresión de ZEB1 de forma diferencial en células de cáncer de distintos tejidos reproductivos, como el de mama, endometrio, miometrio y ovario (Voutsadakis 2016). Sin embargo, aún se desconoce cómo es regulada la expresión de ZEB1 en otros tejidos que también son receptivos a estas hormonas, como el SNC.

La progesterona (P4) es un neuroesteroide que regula varias funciones en el SNC como el comportamiento sexual, la memoria, la neuroprotección, la regeneración neural y la progresión del cáncer (M. Schumacher et al. 2014). En referencia a esto último, se sabe que la expresión del receptor intracelular a P4 (RP) es directamente proporcional al grado de malignidad de los astrocitomas (Khalid et al. 1997). Además, se ha demostrado que la P4 incrementa el crecimiento de las células de GBM tanto *in vitro* (González et al. 2001) como *in vivo* (Germán et al. 2014) y promueve su infiltración a través de diversos mecanismos (Piña et al. 2016), en donde el mecanismo clásico, mediado por el RP, es el más estudiado.

Considerando que ZEB1 se encuentra sobreexpresado en GBM (Siebzehnruhl et al. 2013) y que la P4 es una hormona involucrada en la progresión de este tipo de tumor; entonces, se sugiere que si la expresión de ZEB1 puede ser activada de forma positiva por P4, este efecto podría representar uno de los diversos mecanismos que determinan las características invasivas del GBM.

3- Antecedentes

El cáncer es un término genérico que abarca un amplio y variado grupo de enfermedades en donde existe un desequilibrio entre la tasa de proliferación y la muerte celular. De acuerdo con la OMS, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2015, representó 8,8 millones de muertes a nivel mundial y se esperan cerca de 23 millones de casos nuevos para el 2030 (*World Health Organization*, 2018, <http://www.who.int>).

A pesar de que las causas de muchos tipos de cáncer permanecen desconocidas hasta ahora, se han establecido ciertos factores de riesgo externos e internos que inducen su aparición y desarrollo. Los factores externos están determinados por todos los elementos que constituyen el entorno al que están expuestas las células. En cambio, los factores internos están dados por las características propias de las células, como la constitución genómica y su regulación tanto a nivel genético como epigenético. Estos factores de riesgo pueden actuar simultáneamente o a través de una serie de pasos secuenciales que inician y/o promueven el desarrollo del cáncer, en un proceso denominado carcinogénesis, en el cual se lleva a cabo la transformación progresiva de células normales en derivados altamente malignos, denominados neoplasmas o tumores (Sharma et al. 2009). Un tumor es un tejido complejo compuesto de múltiples tipos de células que interaccionan entre sí. En este sitio, se reclutan células sanas que forman un estroma asociado al tumor y contribuyen al desarrollo y a la expresión de ciertas capacidades particulares de las células cancerosas (Tabassum et al. 2015). Estas características comprenden capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del tumor, entre ellas se encuentran el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los mecanismos supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacidad replicativa ilimitada, inducción de angiogénesis, activación de la invasión al tejido adyacente y/o metástasis, desequilibrio metabólico, inflamación, evasión de la respuesta inmune e inestabilidad genómica (Hanahan et al. 2011).

3.1- Tumores de Sistema Nervioso Central

Los tumores del SNC tienen una incidencia de 6.4 por cada 100 mil individuos (*SEER, National Cancer Institute*, 2018, <https://seer.cancer.gov/>). Comparado con tumores de otros tejidos (como el pulmón, próstata y mama), los tumores cerebrales no tienen una incidencia tan alta en la población. No obstante, representan una significativa causa de mortalidad y morbilidad por cáncer (McNeill 2016). Los tumores que se forman dentro del cerebro son llamados

tumores primarios. Este tipo de tumores pueden invadir rápidamente las áreas adyacentes que lo rodean; sin embargo, esto sólo sucede localmente dentro del tejido cerebral y rara vez se propagan hacia otros tejidos. Otro tipo de tumores que se encuentran en el cerebro son llamados tumores secundarios, ya que estos han iniciado en otra parte del cuerpo y llegaron al cerebro a través de un proceso llamado metástasis (por ejemplo, el cáncer de pulmón). Los tumores primarios representan del 85% al 90% de todos los tumores del SNC, de los cuales los gliomas y meningiomas son los tipos más comunes (Ostrom et al. 2017).

Los gliomas son tumores que tienen características de células gliales. Los de tipo maligno son incurables debido a que su naturaleza altamente invasiva imposibilita la resección quirúrgica completa, con casos de recurrencia en la mayoría de los casos (Young et al. 2015). Además, estos tumores son resistentes a los tratamientos de radiación y quimioterapia convencionales, por lo que se han tenido que desarrollar terapias combinadas (Gallego 2015; Stupp et al. 2005). Los gliomas representan casi el 30% de todos los tumores cerebrales primarios, y el 80% de todos los tumores malignos. Además, los gliomas son responsables de la mayoría de las muertes por tumores cerebrales primarios. La OMS clasifica a los gliomas de acuerdo a sus características histopatológicas en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas, basados en similitudes morfológicas con los tipos de células gliales que se encuentran en el tejido cerebral sano; como los astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias, respectivamente. Una clasificación adicional se produce en función de la ubicación (por ejemplo, en el puente o el nervio óptico), los patrones de diferenciación característicos (como la pilocítica o mixopapilar), las características de la anaplasia (que incluyen alta actividad mitótica, proliferación microvascular o necrosis), la capacidad de invasión y las características de marcadores moleculares (Weller et al. 2015). Los astrocitomas son los gliomas más frecuentes, ya que representan aproximadamente el 75% de todos los gliomas y pueden ocurrir en la mayoría de las diferentes regiones del cerebro. Los astrocitomas están clasificados en cuatro grados de malignidad: pilocíticos (grado I), difusos (grado II), anaplásicos (grado III) y GBM (grado IV). Mientras que los astrocitomas de grado I y II son tumores que presentan un mejor pronóstico y mayor supervivencia para el paciente, los tumores de grado III y IV son más agresivos e incurables, por lo que también son denominados astrocitomas de alto grado de malignidad.

3.1.1. Características generales del glioblastoma multiforme (GBM)

El GBM representa el 80% de todos los tumores malignos del SNC y el 60-75% de todos los astrocitomas. Afecta predominantemente a adultos mayores de 50 años de edad; sin embargo, los GBMs también pueden ocurrir en niños, adolescentes y adultos jóvenes (Ostrom et al. 2017). Los GBMs se localizan preferentemente en la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo; y pueden originarse a partir de astrocitomas grado II o III (GBM secundario), aunque el caso más frecuente (~90% de los casos) es que se originan de *novo* (GBM primario); de hecho, se piensa que estos últimos provienen de células troncales cancerosas, ya que existe evidencia que este tipo de GBM presenta un contenido significativamente alto del marcador molecular CD133+ y que está asociado con la formación de neuroesferas, lo que no sucede en el subtipo secundario (Ohgaki et al. 2013).

En general, el GBM se caracteriza por presentar proliferación descontrolada, infiltración profunda, propensión a la necrosis, angiogénesis, resistencia a la apoptosis e inestabilidad genómica (Urbańska et al. 2014). Actualmente, la resección quirúrgica máxima más radioterapia y quimioterapia con temozolomida (TMZ) -un agente alquilante del DNA- es el tratamiento estándar en pacientes menores de 70 años con GBM recién diagnosticado (Bai et al. 2011). La naturaleza altamente invasiva del GBM hace prácticamente imposible la extirpación quirúrgica total del tumor, además de que es resistente a la quimio y/o radioterapia (Cuddapah et al. 2014; Weathers et al. 2014). Como resultado, la esperanza de vida de los pacientes no sobrepasa los 15 meses (en promedio), por lo que es el tipo de glioma más agresivo (Candece L. 2010).

El proyecto del atlas del genoma del cáncer (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) clasificó las anomalías moleculares recurrentes en el GBM y, mediante estudios de perfiles genómicos a gran escala, se sugiere que el GBM comprende cuatro subgrupos moleculares que se caracterizan por distintos tipos de mutaciones. Estos subtipos se denominan *Clásico*, *Mesenquimal*, *Proneural* y *Neural*. El GBM *clásico* presenta una sobreexpresión del gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), amplificación del cromosoma 7, pérdida del cromosoma 10 y un perfil de expresión de tipo astrocítico. El subtipo *mesenquimal* posee mutaciones en los genes de la neurofibromina (NF1), en el supresor de tumoral homólogo de fosfotensina (Phospho-Tensin, PTEN) y en el promotor de la transcriptasa inversa telomerasa TERT (*Telomerase Reverse*

Transcriptase); además de presentar un perfil de expresión mesenquimal y astrocítico. El subtipo *proneural* se define por la amplificación del gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor Receptor- α* , PDGFR α), mutaciones en el gen que codifica la proteína supresora de tumores p53 (TP53) y en el gen que codifica para la enzima *isocitrato deshidrogenasa* (IDH1), así como un perfil de expresión oligodendrocítico. Finalmente, el subtipo *neural* presenta marcadores típicos neuronales, como NEFL, GABRA1, SYT1 y SLC12A5, y un perfil de expresión tanto astrocítico como oligodendrocítico (Verhaak et al. 2010). Estos subtipos correlacionan con el fenotipo clínico y su respuesta al tratamiento terapéutico. De esta manera, se ha visto que el mesenquimal es el subtipo que presenta los fenotipos más agresivo y el que tiene el peor pronóstico entre los pacientes afectados (Olar et al. 2014).

Colectivamente, las alteraciones genéticas en los GBMs convergen en la activación aberrante de varias vías promotoras de tumores, incluidas las cascadas de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK) y de la proteína cinasa B (también conocida como AKT). Además, las vías supresoras de tumores importantes están alteradas, en particular la regulación de la apoptosis y la progresión del ciclo celular dependientes de p53 y de la proteína de retinoblastoma 1 (RB1) (McLendon et al. 2008). El rápido crecimiento tumoral que conduce a la hipoxia tisular no solo causa necrosis, sino que también regula las dos isoformas del factor inducible por hipoxia (Hypoxia-Inducible Factor 1/2, HIF1/2), que incrementan la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor, VEGF), el factor clave que impulsa la angiogénesis en el GBM (Plate et al. 1992). Otra característica importante de la patogénesis del GBM, es la influencia del tumor en el sistema inmune, incluida la supresión de una respuesta inmune antitumoral eficaz, por ejemplo, mediante la regulación positiva del factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor- β , TGF β)(Frei et al. 2015).

3.2 Transición epitelio-mesénquima (TEM) en la tumorigénesis del GBM

Una de las características más relevantes del GBM es que este tipo de tumor presenta un alto potencial migratorio e invasivo. Se ha propuesto que el proceso de la transición epitelio-mesénquima (TEM) es uno de los mecanismos que confieren a las células de GBM esta propiedad invasiva. La TEM es un proceso celular desencadenado por un complejo programa molecular que desempeña importantes funciones en la fisiología de todos los tejidos epiteliales;

particularmente durante el desarrollo embrionario, los procesos inflamatorios, la regeneración de tejidos y la formación de neoplasias. El proceso de la TEM está definido por la transición que sufre una célula al perder sus características epiteliales y adquirir características móviles mesenquimales. Durante la TEM, las células pierden sus uniones epiteliales y la polaridad apical-basal; llevan a cabo la reorganización del citoesqueleto de actina cortical a uno que permita el alargamiento celular dinámico y la motilidad direccional; además de que reprograman su perfil de expresión génica (**Figura 1**) (Lamouille et al. 2014). Este proceso de diferenciación se denomina *transición* para enfatizar su naturaleza transitoria; la transición mesénquima-epitelio (TME) describe el proceso inverso. La capacidad de las células epiteliales para convertirse en células mesenquimales, y de regreso -parcial o totalmente-, ilustra una plasticidad inherente del fenotipo epitelial. Dependiendo del contexto celular, la plasticidad del fenotipo epitelial permite a las células realizar transiciones a través de múltiples rondas de TEM y TME (Kalluri et al. 2009).

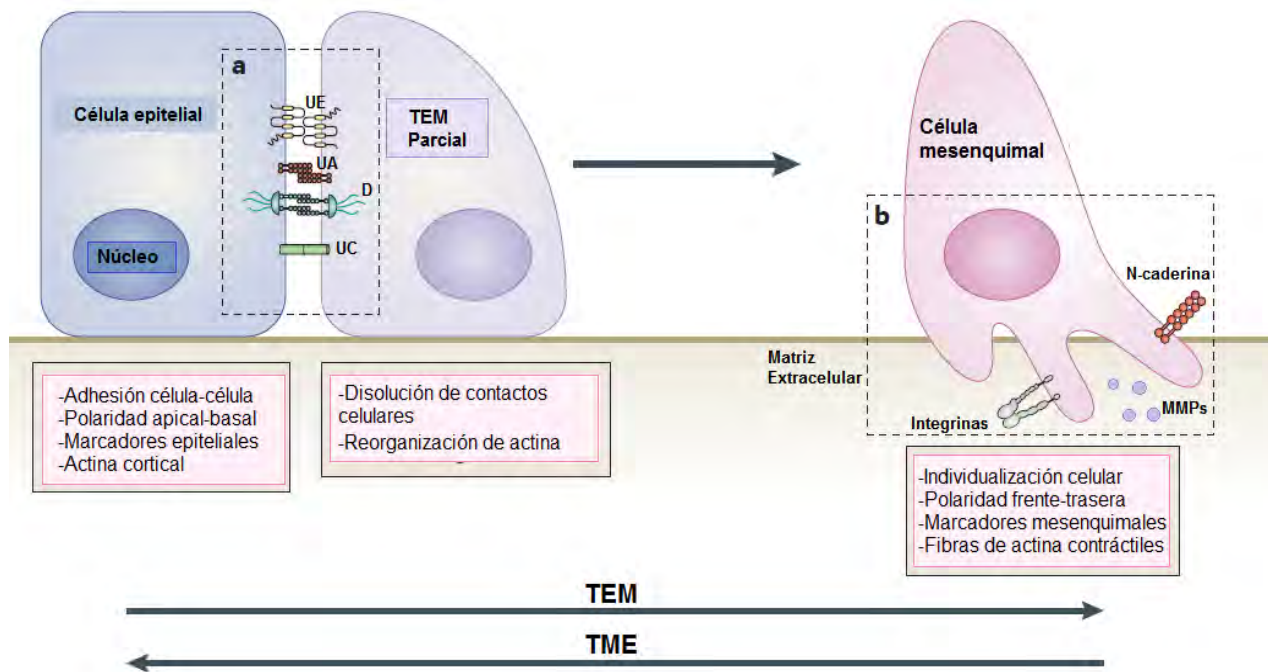


Figura 1. Eventos celulares que ocurren durante la transición epitelio-mesénquima (TEM). La TEM es un mecanismo celular reversible que al ser llevado de forma parcial en células tumorales abre un amplio espectro del fenotipo epitelial-mesénquimal durante el proceso invasivo. a) Las células epiteliales se mantienen unidas mediante complejos de uniones estrechas (UE), uniones adherentes (UA), desmosomas (D) y uniones comunicantes (UC). Durante la TEM se pierden los complejos de unión célula-célula y la polaridad celular. Después, la arquitectura de los microfilamentos de actina se reorganiza y las células adquieren motilidad y capacidades invasivas por la formación de proyecciones citoplasmáticas que se extienden desde el extremo directriz de la célula en migración. La célula mesenquimal sobreexpresa metaloproteinasas (MMPs), integrinas y N-caderinas. Modificado de Lamouille et al. 2014.

3.2.1 Mecanismos moleculares de la TEM

3.2.1.1 Regulación por factores de transcripción

Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y la activación del fenotipo mesenquimal son llevados a cabo por los denominados factores de transcripción activadores de la TEM (FT-TEM), principalmente por las familias SNAIL, TWIST y ZEB. Como estos FT-TEM tienen distintos perfiles de expresión, sus contribuciones a la TEM dependen del tipo de célula o tejido involucrado y de las vías de señalización que inician la transición. En conjunto, los FT-TEM coordinan la represión de los genes epiteliales y la inducción de genes mesenquimales, y con frecuencia, los mismos factores de transcripción dirigen tanto la represión como la activación (Peinado et al. 2007).

Hasta ahora, muchos estudios han determinado que los FT-TEM desempeñan un papel importante en todas las etapas de la progresión del cáncer. Se ha demostrado que los FT-TEM mantienen la expresión de marcadores de células troncales y que están implicados en la reparación del DNA de doble cadena, en el escape de la senescencia y en la inducción de un fenotipo antiapoptótico y pro-superviviente, lo que resulta ser una ventaja en condiciones de estrés (Zhang et al. 2015). Por lo tanto, los FT-EMT apoyan la progresión maligna además de la motilidad celular. Estas acciones predisponen a los FT-TEM a ejercer una resistencia terapéutica intrínseca o adquirida (Voulgari et al. 2009). Diversas líneas de investigación han demostrado que las tres principales familias de FT-TEM están involucradas en la patogenia del GBM (Myung et al. 2014; Mikheeva et al. 2010; Qi et al. 2012; Siebzehnrubl et al. 2013). Sin embargo, en los últimos años se ha mostrado que los dos miembros de la familia ZEB (ZEB1 y ZEB2) tienen un papel particularmente crucial en la progresión tumoral del GBM, ya que estos dos FT-TEM son mediadores de la plasticidad celular necesaria para que las células tumorales adapten rápidamente su fenotipo de acuerdo a las condiciones ambientales, lo que supone una gran ventaja en sus propiedades invasivas y de resistencia a la terapia (Brabletz et al. 2018).

3.2.1.1.1. Familia de factores de transcripción ZEB

La familia de factores de transcripción ZEB (*Zinc finger E-Box*) consta de dos miembros: ZEB1 (124 kDa) –codificado en el cromosoma 10p11.22– y ZEB2 (136 kDa) –codificado en el cromosoma 2q22.3–. Estas dos proteínas son altamente homólogas y se caracterizan por

tener dos conjuntos separados de residuos de cisteína e histidina (Cys2-His2, C2H2) que se coordinan con iones de zinc y dan lugar a la formación estructural de motivos de dedos de zinc, con un homeodominio ubicado en el centro (**Figura 2**). Tanto ZEB1 como ZEB2 se unen a las secuencias de la *caja potenciadora* (*Enhancer box* o E-box) CANNTG –ubicadas en las regiones promotoras de los genes blanco– con una alta afinidad de unión a las secuencias específicas de CACCT o CACCTG (Vandewalle et al. 2009). La represión transcripcional mediada por la familia ZEB a menudo implica el reclutamiento de la proteína correpresora de unión al dominio carboxilo terminal (CtBP), que puede reprimir la transcripción por medio del reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs), las cuales a su vez actúan removiendo el grupo acetilo de los extremos N-terminal de las histonas, lo que causa la condensación de la cromatina y el bloqueo de la entrada de factores iniciadores de la transcripción. Sin embargo, en algunas células cancerosas, ZEB1 reprime la expresión génica independientemente de CtBP mediante el reclutamiento de la ATPasa BRG1, componente central del complejo SWI/SNF, que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para repositionar a los nucleosomas y modificar la estructura de la cromatina, inhibiendo de esta forma la transcripción de genes blanco. Por el contrario, la represión mediada por ZEB2 es únicamente dependiente de CtBP. ZEB1, a diferencia de ZEB2, también puede interactuar con los coactivadores transcripcionales PCAF y p300, que actúan como acetiltransferasas de histonas para descondensar la estructura de la cromatina y permitir la entrada de la maquinaria de transcripción.

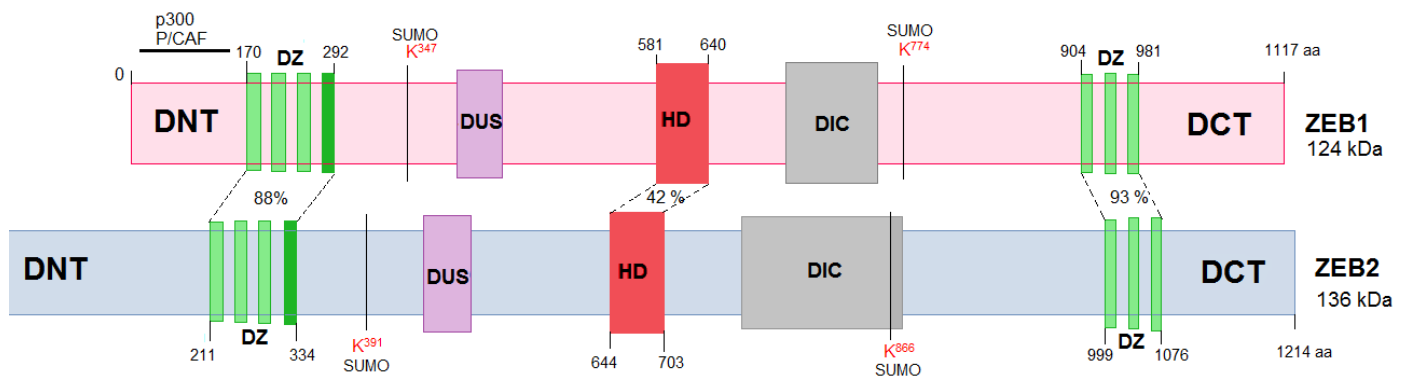


Figura 2. Representación esquemática de los dominios que componen a ZEB1 y ZEB2. Estos dos factores de transcripción están caracterizados por la presencia de dos grupos de dedos de Zn (DZ) y un homeodominio (HD) ubicado en el centro. Los dominios de unión a proteínas son el dominio de unión a los factores Smad (DUS) y el dominio de interacción con CtBP (DIC). En ZEB1, se encuentra un dominio de activación transcripcional con un sitio de unión para los coactivadores p300 y PCAF en la región del dominio N-terminal (DNT). Ambas proteínas ZEB son modificadas post-traduccionalmente por SUMOilación (SUMO), lo que puede afectar su actividad represora o activadora. Los porcentajes indican el grado de conservación entre ZEB1 y ZEB2.

La expresión de ZEB1 y ZEB2 es regulada por la familia de micro RNAs –miRNAs– miR-200, la cual está compuesta por cinco miembros: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-41 y miR-429. Estos miRNAs actúan uniéndose a secuencias complementarias de la región 3´-UTR de ZEB1 y ZEB2, por lo que impiden su traducción a proteína ya sea por la degradación del mRNA o por bloqueo de su entrada al ribosoma. De forma recíproca, existen sitios de unión a ZEB en la región promotora de los genes que codifican a los cinco miRNAs de la familia miR-200, en donde ZEB reprime su transcripción. Esta interacción recíproca entre ZEB1/2 y los miembros de la familia miR-200 forma un importante circuito de retroalimentación negativa que regula la plasticidad y la diferenciación celular (Bracken et al. 2008). Dependiendo de las señales extracelulares, dicho bucle puede cambiar fácilmente de un lado al otro y estabilizar un fenotipo epitelial o mesenquimal. Además, en los últimos años se ha demostrado que este circuito ZEB/miR-200 no sólo regula el proceso TEM/TME, sino también otras funciones y estados cruciales de la célula, como la troncalidad/diferenciación, longevidad/senescencia, arresto del ciclo celular/proliferación y supervivencia/apoptosis. Por lo tanto, se ha propuesto que el bucle ZEB/miR-200 podría ser un interruptor central que regula procesos intracelulares que tienen un importante efecto en el destino celular (Brabletz et al. 2010).

3.2.1.1.1 Efectos de la expresión de ZEB1 en GBM

Los datos de RNA-seq (secuenciación del RNA que conforma el transcriptoma completo de una célula) generados por el TCGA muestran que, entre otros 16 tipos de cáncer, los gliomas (particularmente el GBM) son los tumores que contienen una mayor cantidad del mRNA de ZEB1 (www.cancergenome.nih.gov, 2018). Con base en este criterio, se han realizado análisis de supervivencia que demuestran que existe una correlación negativa entre los niveles del mRNA de ZEB1 y la supervivencia de los pacientes diagnosticados con GBM. Asimismo, análisis de inmunoreactividad realizados por el Atlas Humano de la Proteína (*The Human Protein Atlas*, HPA) con dos de los anticuerpos más utilizados contra ZEB1 (HPA027524 y CAB058686) en tumores de diversos tejidos, han mostrado que el GBM presenta una fuerte positividad nuclear a ZEB1 en comparación con los otros tipos de tumores (www.proteinatlas.org, 2018). Por lo tanto, ZEB1 ha sido propuesto como un indicador de mal pronóstico en pacientes diagnosticados con GBM así como un potencial blanco terapéutico (Siebzehnrubl et al. 2013; Zhang et al. 2016). Además, también se ha mostrado en estudios independientes que la expresión a nivel de la proteína de ZEB1 aumenta en los gliomas de alto grado de malignidad (Kahlert et al. 2015).

La expresión y las funciones de ZEB1 han sido ligadas a diversas características malignas del GBM. Experimentos en xenoinjertos de células derivadas de GBM en cerebros de ratón han mostrado que ZEB1 se expresa preferencialmente en el frente de invasión del tumor con una regulación a la baja de N-caderina, en comparación con la masa tumoral central. Por lo tanto, el silenciamiento de ZEB1 reduce considerablemente la invasión de las células tumorales. En este mismo estudio, también se mostró que la expresión de ZEB1 aumenta la quimioresistencia a TMZ de las células de GBM a través de la regulación indirecta de la expresión de la proteína de reparación del DNA O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa –MGMT– (Siebzehnruhl et al. 2013). Asimismo, se han identificado sitios de unión a miR-200c y miR-200a en la región 3´-UTR de los factores de transcripción que promueven las características de troncalidad, como son SOX2 y OLIG2, así como en el marcador de superficie CD133/PROM1. Por lo tanto, el silenciamiento de ZEB1 disminuye los niveles de expresión de SOX2, OLIG2 y CD133, mientras que la sobreexpresión de ZEB1 tiene efectos opuestos (Siebzehnruhl et al. 2013). Otros estudios han mostrado que el microambiente local hipóxico de los tumores de GBM es capaz de inducir la expresión de ZEB1 a través de los factores inductores de hipoxia HIF α y HIF β , lo que incrementa la migración e invasión de las células de GBM (Kahlert et al. 2015; Justin et al. 2015).

Por otro lado, la inducción de la expresión de ZEB1 está asociada con las vías de señalización de los receptores tirosina-cinasa (RTKs) desregulados en el GBM. En células que muestran una alta amplificación del EGFR –subtipo clásico del GBM– se ha mostrado que esta vía de señalización regula a la alta la expresión de ZEB1 y a la baja la de miR-200c (Serna et al. 2014). Igualmente, otro estudio mostró que el PDGFR α –que se encuentra amplificado en el subtipo proneural del GBM– induce a la alta la expresión de ZEB1 y a la baja la del miR-200a por medio de los efectores PI3K y SHP-2 (Zhang et al. 2016). En estos experimentos, al inducir la expresión de ZEB1 por estas vías de señalización, se observó un aumento de la invasión *in vitro* de células de GBM, autorrenovación de células troncales cancerosas, supervivencia, marcadores moleculares y características morfológicas del proceso de TEM así como el crecimiento del tumor *in vivo*.

3.2.1.2. Vías de señalización que conducen a la TEM

La progresión de la TEM es regulada por diversas vías de señalización que pueden cooperar entre sí para inducir distintos niveles de respuesta. Las principales vías de señalización que han mostrado estar involucradas en la inducción de la TEM son las que implican a los receptores de TGF β , WNT, RTKs, hormonas esteroides e hipoxia (**Figura 3**). En el GBM, las vías de transducción de señales intracelulares que se ha demostrado regulan la expresión de ZEB1 incluyen las vías de señalización activadas por el PDGFR α como PI3K/AKT, SHP-2-Erk1/2 (L. Zhang et al. 2016) y AKT/mTOR (Chen et al. 2017), citocinas como el TGF- β que activa factores SMAD (J. V. Joseph et al. 2014), la vía canónica WNT/ β -catenina (Kahlert et al. 2012), la activación del factor nuclear-kappa B (NF- κ B) (Edwards et al. 2011) así como condiciones hipóxicas que activan al factor inducible por hipoxia α (HIF α) (Justin et al. 2015).

En general, todas estas vías de señalización inducen de forma diferencial la expresión de los FT-TEM. La vía de TGF β puede actuar de forma dependiente o independiente de los factores SMAD para inducir la TEM. La señalización dependiente de SMAD favorece especialmente la expresión de SNAIL y de ZEB. La vía independiente de SMAD conduce a la señalización de PI3K-AKT-mTOR o de MAPK (Lamouille et al. 2014). Por otro lado, la activación de la vía canónica de WNT en líneas celulares de GBM ha mostrado que aumenta la expresión de ZEB1, TWIST1 y SNAIL1/2, dando como resultado un aumento significativo de la migración e invasión de estas células. La vía canónica WNT es llevada a cabo por la unión de ligandos a los receptores *rizados* (*frizzled*), lo que provoca la inhibición de GSK-3 β (que normalmente fosforila a la β -catenina para su degradación), llevando a la acumulación de β -catenina en el citoplasma, la cual finalmente se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes blanco (Iser et al. 2017). Los factores de crecimiento que actúan a través de la unión con RTKs pueden inducir a la TEM. La unión de estos ligando a sus receptores induce la autofosforilación del receptor, lo que les permite activar la vías de PI3K-AKT y MAPK-ERK. Otros factores adicionales en el microambiente del tejido o tumor facilitan la iniciación de la TEM. Por ejemplo, las condiciones hipóxicas de tumores como el GBM facilitan la TEM por inducción de los factores de transcripción HIF α / β , que pueden activar la expresión de ZEB, SNAIL y TWIST (Justin et al. 2015; Kahlert et al. 2015).

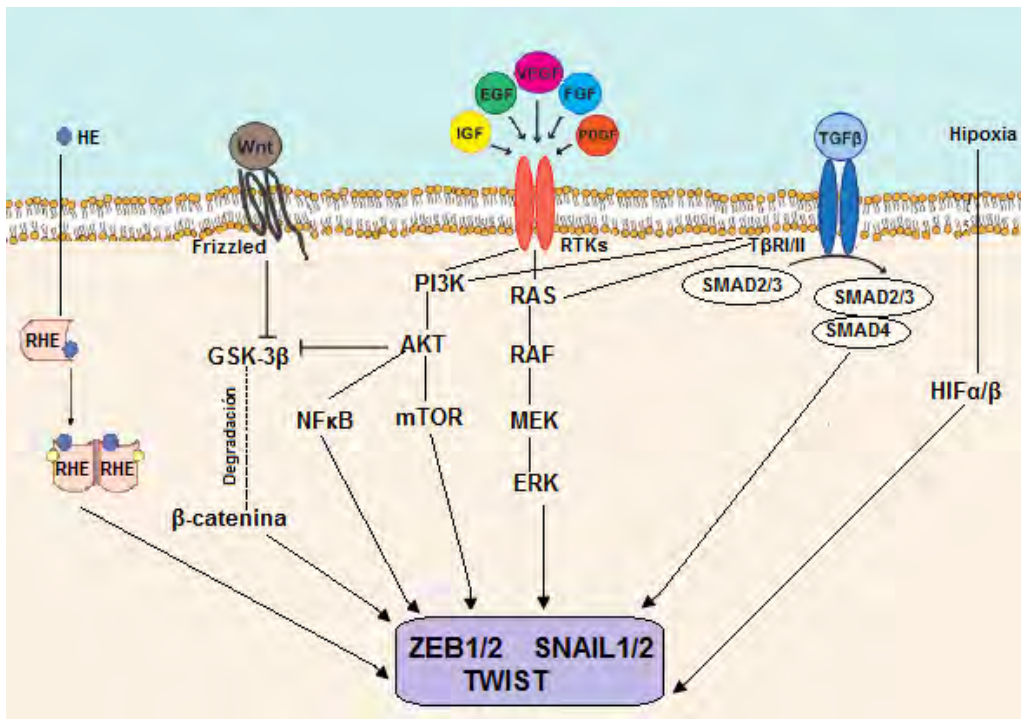


Figura 3. Vías de señalización involucradas en la activación de la TEM. El proceso de la TEM puede activarse por diversas vía de señalización que se comunican entre sí para generar diferentes magnitudes del efecto. Las principales vías que aumentan la expresión de los FT-TEM son las de los factores SMAD, RAS-RAF-MEK-ERK (también conocida como MAPK), PI3K-AKT-mTOR, WNT/ β-catenina y factores de transcripción activados por ligando; las cuales son importantemente inducidas por el TGFβ, factores de crecimiento, ligandos WNT, hormonas esteroideas y condiciones hipóxicas. HE: hormona esteroide; RHE: receptor a hormona esteroide; GSK-3β: Glucógeno Sintasa Cinasa 3 beta; RTK: Receptor Tirocinasa. Modificado de Iser et al. 2017.

3.2.1.2.1 Regulación de la expresión de ZEB1 por hormonas sexuales

Las hormonas sexuales son moléculas esteroideas lipofílicas que pueden difundir en las células, unirse a sus receptores intracelulares y regular la transcripción de genes blanco. Estos genes de respuesta primaria a menudo codifican para factores de transcripción que son capaces de regular a los genes de respuesta secundaria. A pesar de que existe limitada evidencia al respecto, ZEB1 ha demostrado ser un efector clave en las cascadas de señalización de hormonas esteroideas como los estrógenos (Liebert et al. 2004), progestágenos (Richer et al. 2002; Renthal et al. 2010) y andrógenos (Anose et al. 2011). La expresión de ZEB1 puede ser notablemente inducida por estrógenos en tan solo una hora en el oviducto del pollo (Chamberlain et al. 1999), en células de miometrio humano (Spoelstra et al. 2006) y en células de prepucio humano (Qiao et al. 2011). En células de cáncer de ovario, ZEB1 no es inducido por el tratamiento con estrógenos en las líneas celulares OVCAR3 y Caov-3, pero si puede

expresarse rápidamente después de una hora en la línea celular OV266 bajo el mismo tratamiento hormonal (Hurt et al. 2008). Estos datos sugieren que la regulación de la expresión de ZEB1 es dependiente del tipo de células, incluso en el mismo tipo de cáncer. La expresión de ZEB1 también puede ser inducida por P4 a través del RP en células de cáncer de mama (Richer et al. 2002) y en células de miometrio tanto en condiciones fisiológicas (Renthal et al. 2010) como durante la progresión maligna del cáncer (Spoelstra et al. 2006). Asimismo, ZEB1 es inducido por el receptor a andrógenos en células de cáncer de próstata (Anose and Sanders 2011) y en células de cáncer de mama (Anose et al. 2011).

3.3 El papel de las hormonas esteroides en el SNC y en la progresión de GBM

Las hormonas sexuales actúan sobre una amplia gama de tejidos y tienen diversas funciones. Estas hormonas son sintetizadas en las gónadas, en las glándulas adrenales y en el SNC. En el cerebro, las hormonas sexuales como el estradiol (E2) y la P4, actúan como esteroides neuroactivos que regulan la función de estructuras neuroendocrinas diencefálicas, corticales, límbicas y mesencefálicas (Barth et al. 2015), lo que influye en diferentes procesos del SNC como la memoria (Liu et al. 2008), el aprendizaje (Frick et al. 2015), el estado emocional (Sakaki et al. 2012) y los procesos cognitivos (Berman et al. 1997). Además, varias líneas de investigación apoyan que existe un importante efecto de las hormonas sexuales durante el desarrollo embrionario y la plasticidad neuronal (Díaz et al., 2009; Díaz et al., 2007; Remage et al. 2007). Los efectos estructurales específicos del E2 y la P4 en el SNC incluyen el crecimiento de neuritas, sinaptogénesis, la ramificación dendrítica (Haraguchi et al. 2012; Hansberg et al. 2015) y la mielinización (Schumacher et al. 2012).

Una serie de estados patológicos, en particular el cáncer, han sido ligados a las acciones del E2 y la P4. Por ejemplo, diversos estudios epidemiológicos han mostrado que la P4 incrementa el riesgo de desarrollar tumores en cáncer de mama (Diep et al. 2015). De hecho, varios estudios han demostrado que la proporción de las dos isoformas del receptor a P4 (RP) está frecuentemente alterada tanto en cáncer de mama (Kariagina et al., 2008) como en otros tipos de cáncer, como el de endometrio (Kim et al. 2013) y en astrocitomas de alto grado de malignidad, particularmente en el GBM (Camacho et al. 2011). Por lo tanto, con base en lo anterior y debido a las características invasivas y de recurrencia del GBM; se han buscado alternativas terapéuticas basadas en el tratamiento con hormonas sexuales o antagonistas de sus receptores, ya sea como terapias adyuvantes o paliativas (Ramaswamy et al. 2012). Sin

embargo, para el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del GBM, es necesaria una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que induce la P4 en este tipo de tumor.

3.3.1- Progesterona (P4)

La progesterona (4-pregnan-3,20-diona o P4) es una hormona de naturaleza química esteroide y una de las formas más activas de los progestágenos endógenos en humanos y en otras especies. En las mujeres, la P4 es sintetizada a partir del colesterol dentro del cuerpo lúteo de los ovarios y en la placenta. Sin embargo, las glándulas adrenales secretan P4 en ambos sexos bajo el control de la adrenocorticotropina (ACTH). Además, la P4 también puede ser sintetizada localmente dentro del SNC y en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) por neuronas y células gliales, por lo que también se le denomina *neuroesteroide* (Schumacher et al. 2012). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los mecanismos de acción precisos así como los genes regulados por esta hormona en el cerebro.

3.3.1.1- Mecanismos de acción de la progesterona

La P4 presenta diferentes mecanismos de acción mediados por la unión con sus receptores específicos. Estos mecanismos pueden alternarse y/o ocurrir simultáneamente y, dependiendo de la expresión tejido-específico de los receptores, tener consecuencias biológicas muy variadas. El llamado *mecanismo clásico* de acción de la P4 implica su unión a receptores intracelulares selectivos a P4 (RP) con una potente afinidad ($K_D = 1$ nM) (Josimovich J. 2013). El RP es un factor de transcripción cuya actividad reguladora de la expresión génica está mediada por la unión de la P4. En la regulación de la transcripción, el RP interactúa directamente con correguladores y factores remodeladores de la cromatina para activar a la maquinaria transcripcional (DeMAYO et al. 2002).

Sin embargo, también se ha mostrado que la P4 es capaz de activar vías *rápidas* de señalización intracelular. Estos efectos ocurren después de un periodo de exposición a la hormona relativamente corto y son conocidos como *mecanismos no clásicos* de acción. La rápida activación de vías de señalización intracelular mediadas por P4 puede ocurrir por diversos mecanismos. Uno es a través del RP asociado a la membrana plasmática, el cual puede interactuar con las proteínas tirosinas cinasas c-Src y activar la vía Src/MAPK (Boonyaratankornkit et al. 2001). Además, existen dos tipos de proteínas no relacionadas al

RP que están asociadas a la superficie celular: los receptores membranales a P4 (mRPs) y los componentes del receptor de membrana de progesterona 1 y 2 (*Progesterone Membrane Receptor Component 1 and 2*, PGRMC1/2). En los primeros, se han descrito cinco subtipos de mRPs (α , β , γ , δ y ϵ), con un peso un molecular de ~ 40 kDa, caracterizados por tener 7-8 dominios transmembranales acoplados a proteínas G y que son capaces de unirse con una gran afinidad a la P4 ($K_D=5$ nM) (Pang et al. 2013; Zhu et al. 2003). La unión de la P4 a los mRPs regula la activación de la vías de MAPK, PKC y PI3K/Akt/mTOR; vías de señalización que están directamente involucradas en la quiescencia celular, proliferación, cáncer y longevidad (Thomas et al. 2012). Hasta ahora, se ha caracterizado la expresión de los receptores mPR α , mPR β and mPR γ en las células derivadas de GBM U87 y U251 y se ha determinado que su expresión puede ser regulada de forma diferencial por P4 y E2 (Valadez et al. 2015, 2016).

3.3.1.2- Funciones del receptor intracelular a P4 (RP)

El RP es un factor de transcripción activado por ligando que es parte de la superfamilia de receptores nucleares dentro de la clase de receptores a hormonas esteroides. En los seres humanos existen dos isoformas principales del RP: RP-A (94 kDa) y RP-B (114 kDa). La proporción de estas dos isoformas es esencial para los efectos específicos de la P4 en un tejido, por lo que tienen diferente función y regulación dependiendo del contexto celular. Las isoformas de RP humanas se transcriben a partir de un único gen (11q22-23) bajo el control de dos promotores distintos, que se localizan en -711 a +31 pb (PR-B) y +464 a +1105 pb (PR-A) con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) (**Figura 4A**). La estructura primaria del RP está dividida estructural y funcionalmente en varios dominios. El dominio N-terminal (DNT) es el dominio menos conservado y cuenta con dos funciones de activación (AF-1 y AF-3) que participan en la regulación de la transcripción de los genes blanco. En cambio, el dominio de unión al DNA (DUD) es el más conservado y se caracteriza por tener dos dedos de zinc que actúan en la dimerización del receptor y en su unión al DNA. En el dominio de horquilla (H) se encuentran las secuencias de localización nuclear (SLN) y de unión a chaperonas. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (DUL), la región de unión a correguladores y chaperonas así como una función de activación (AF-2) dependiente del ligando (Hansberg et al. 2017) (**Figura 4B**).

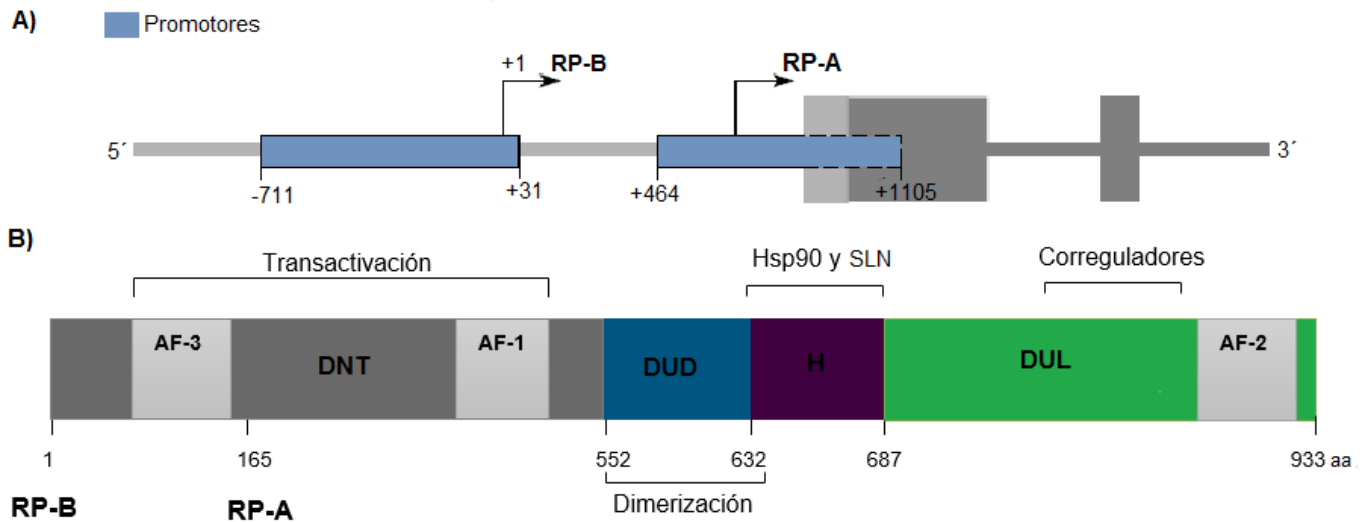


Figura 4. Estructura del RP. A) Las dos isoformas (RP-A y RP-B) del RP humano se transcriben a partir de un único gen que contiene dos promotores para cada isoforma B) El receptor contiene distintos dominios con funciones específicas. El dominio N-terminal (DNT) cuenta con dos funciones de activación (AF-1 y AF-3); mientras que el dominio de unión al DNA (DUD) contiene dos dedos de zinc así como el dominio de dimerización. El dominio de horquilla (H) contiene las secuencias de unión a chaperonas (como Hsp90) y la señal de localización nuclear (SLN). En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (DUL), una región de unión a correguladores y una función de activación (AF-2) dependiente de ligando. El esquema muestra el número de aminoácidos (aa) que contiene la proteína y sus diferentes dominios, así como el tamaño de las dos isoformas. Modificado de Hansberg et al. 2017.

El RP es fundamental en el mecanismo clásico de acción de la P4 que ocurre de la siguiente manera: En ausencia de la hormona, el RP se encuentra inactivo en el citoplasma unido con una alta afinidad a proteínas chaperonas (Hsp90/Hsp70/Hsp40) y co-chaperonas (FKBP51 y p23). Cuando la P4 entra a la célula, interactúa con el RP e induce un cambio conformacional que provoca su fosforilación por cinasas como las MAPK; la disociación con el complejo de chaperonas; la dimerización con otro RP y la translocación nuclear. El receptor en su forma activa dentro del núcleo celular se une a elementos de respuesta a P4 (ERPs) ubicados dentro de las regiones reguladoras de los genes blanco. Sin embargo, se ha visto que genes que carecen de ERPs también pueden ser inducidos por P4 a través de la interacción de factores de transcripción como Sp1, C/EBP, CBP, p300, NFκB y AP-1. El inicio de la transcripción comienza mediante el reclutamiento de coactivadores como los de la familia p160 (SRC1/2/3) y complejos remodeladores de la cromatina como la acetiltransferasa PCAF, que aumenta la procesividad de la maquinaria de transcripción. Una vez que el receptor se disocia del ADN, se marca su degradación a través del proteasoma 26S (Camacho et al. 2017) (**Figura 5**).

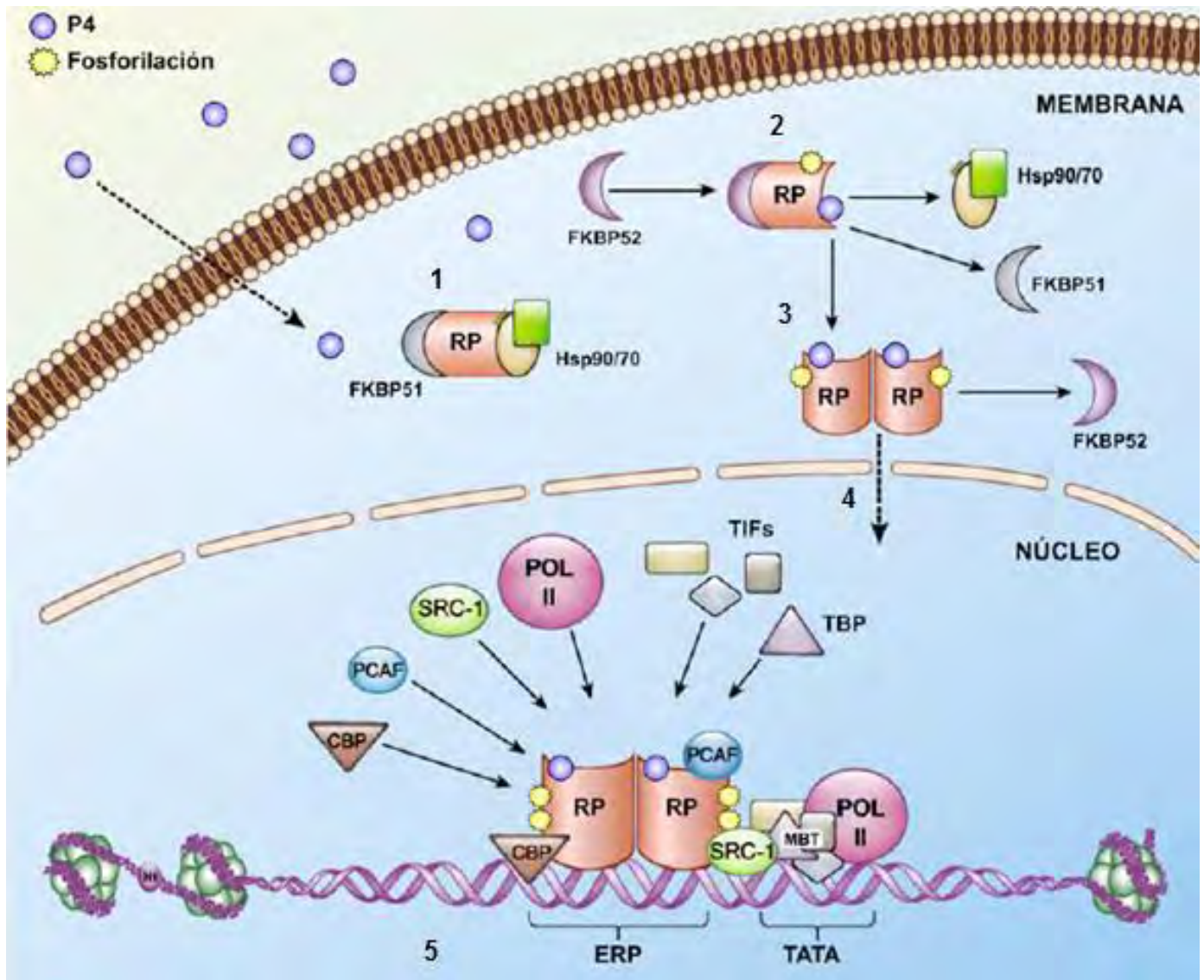


Figura 5. Mecanismo de acción clásico del RP. 1) Sin P4, el RP se encuentra inactivo en asociación con complejos de chaperonas (Hsp90/70) y co-chaperonas (FKBP51, p23). 2) Cuando la P4 entra al citoplasma, interactúa con el RP y produce un cambio conformacional que promueve la fosforilación del RP, su disociación con el primer complejo de chaperonas y su asociación con FKBP52, 3) quien facilita la dimerización con otro RP. 4) Después el RP es translocado al núcleo, y 5) es dirigido hacia los elementos de respuesta a P4 (ERPs) localizados en las regiones reguladoras de los genes responsivos a P4. La inducción de la transcripción sucede por la interacción del RP con coactivadores y remodeladores de la cromatina, como SRC1, CBP y PCAF; complejo que permite la unión de la maquinaria de transcripción basal (MTB), conformada por factores de inicio de la transcripción (TIFs), proteínas de unión a cajas TATA y RNA polimerasa II. Modificado de Camacho et al. 2017.

3.3.1.3- Antagonistas de la P4

Muchas de las actividades selectivas de la P4 son mediadas por el RP. Por lo tanto, se han descrito varios antagonistas del RP clínicamente útiles que bloquean las acciones de la P4 (Spitz 2000). Desde el descubrimiento de la antiprogestina RU486 (*Mifepristona*), se han sintetizado cientos de compuestos similares, que se pueden agrupar en una gran familia de ligandos del RP. El RU486 es un compuesto beta-arilo sustituido derivado de la 19-nortestosterona que actúa como un antagonista incompleto y tiene una actividad agonista parcial bien documentada que depende del contexto celular y del promotor (Meyer et al. 1990). El RU486 se ha usado más extensamente en entornos clínicos por su actividad de antagonista del RP y hasta ahora, se ha mantenido bajo investigación para su uso como agente antineoplásico (Klijn et al. 2000). El RU486 compite por el sitio de unión al receptor (con una $K_D=1.4$ nM) y reprime la actividad de la P4. Además, promueve muchos de los mismos pasos de activación del RP por P4, incluyendo la disociación de proteínas chaperonas, dimerización, fosforilación específica de sitio y la unión a los ERPs. El RP unido al DNA en presencia del RU486 tiene una capacidad alterada para transmitir una señal transcripcional debido a que el antagonista induce una conformación distinta en AF2, localizada en el dominio de unión al ligando, lo que promueve tanto el bloqueo de la interacción con coactivadores así como el reclutamiento de correpresores, tales como el correpresor de receptores nucleares (*Nuclear receptor Corepressors*, NCoR) y el mediador silenciador para receptores de hormonas tiroideas y retinoides (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*, SMRT) (Wardell et al. 2005).

3.3.1.5- Efectos de la P4 en glioblastomas

Actualmente, varias líneas de investigación han demostrado que la P4 y su receptor intracelular, el RP, tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo de los astrocitomas. En modelos *in vitro*, una concentración de P4 10 nM promueve el crecimiento y la proliferación de células U373 (derivadas de un astrocitoma de grado III) y D54 (derivadas de un astrocitoma de grado IV o GBM) (González et al. 2007). También se ha mostrado que esta misma concentración de P4 promueve la migración y la invasión de células U87 y U251 – ambas derivadas de GBMs humanos– (Piña et al. 2016) y que además, dicha hormona regula la expresión de los genes VEGF, EGFR y ciclina D, genes involucrados en estas capacidades celulares malignas (Hernández et al. 2012). En un modelo *in vivo* en donde se xenoinjertaron

células U373 en la corteza cerebral de ratas, se mostró que la P4 (10 nM) promueve tanto el crecimiento como la infiltración de estas células (Germán et al. 2014). En estos estudios el tratamiento con RU486 bloqueó los efectos de la P4, sugiriendo la participación del RP. La expresión del RP se ha correlacionado directamente con el grado de evolución de los astrocitomas, lo que sugiere un fuerte potencial oncogénico del receptor en estos tumores. Existen investigaciones en donde se ha estudiado la expresión del RP por inmunohistoquímica (Khalid et al. 1997) y niveles de mRNA (Carroll et al. 1995) en astrocitomas de diferentes grados de malignidad, y se ha mostrado que los derivados de alto grado de malignidad (III y IV) expresan en mayor proporción el RP (en donde la isoforma RP-B fue la predominante) que los astrocitomas de grado I y II. Por lo tanto, tomando en cuenta la aparente relación que existe entre la expresión del RP y el grado de malignidad de los astrocitomas, es necesario tener un panorama más amplio de los genes que regula la P4 a través del RP y que son esenciales para determinar las características proliferativas e invasivas de tumor.

En este contexto, se ha descrito la importancia del papel que tiene ZEB1 como un regulador central de diversos procesos que determinan el destino celular y cuya desregulación apoya la progresión maligna. Aunque de manera muy limitada, la regulación de la expresión de ZEB1 por P4 a través del RP ha sido evaluada en algunos tejidos responsivos a esta hormona. Sin embargo, aún se desconoce mucho acerca de los mecanismo precisos por los cuales podría ocurrir esta regulación así como un panorama más amplio de los efectos biológicos que esta podría tener en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas como el cáncer.

4. Planteamiento del problema

El factor de transcripción ZEB1 es un regulador de la plasticidad celular que está sobreexpresado en las células de GBM y le confiere características potencialmente malignas como mayor invasión, proliferación y resistencia citotóxica. A pesar de que se ha comprobado que la inducción positiva de la expresión de ZEB1 en el GBM puede ser mediada por los factores TGF β , EGF, PDGF, hipoxia y agonistas WNT, aún se desconoce cómo las hormonas esteroides regulan la expresión de dicho factor de transcripción en este tipo de tumor. Considerando que existe fuerte evidencia de que la P4 promueve la progresión tumoral del GBM al inducir su proliferación, invasión y migración; es posible que, entre otros mecanismos, esta hormona pueda ejercer tales efectos al regular la expresión de ZEB1.

5. Hipótesis

Si la administración de P4 en células derivadas de GBM aumenta la expresión de ZEB1 a través del RP, entonces, dicho efecto disminuirá por la administración de un antagonista del receptor como el RU486.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 en células derivadas de GBM humanos.

6.2 Objetivos particulares

- Analizar la región reguladora de la transcripción de ZEB1 para conocer los posibles sitios de unión al RP (ERPs).
- Determinar la expresión basal de ZEB1 en las líneas celulares U251 y U87, ambas derivadas de GBM humanos.
- Evaluar el efecto de la concentración de P4 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1µM) sobre la expresión de ZEB1 en las células U251 y U87.
- Determinar si el efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 es mediado a través del RP, a través del efecto que tiene el antagonista RU486.

7. Metodología

7.1 Análisis *in silico*

Para analizar la región reguladora de la transcripción del gen ZEB1, localizado en el cromosoma 10p11.22, se obtuvo la secuencia en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI, USA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6935>) y se determinó la localización de la región promotora central y proximal de acuerdo con la base de datos de Ensembl (*European Bioinformatics Institute*) (<http://www.ensembl.org/>). La secuencia se analizó para predecir posibles sitios de unión al RP (Elementos de Respuesta a P4 o ERPs), los cuales se determinaron con las siguientes herramientas bioinformáticas:

- JASPAR CORE de vertebrados (Khan et al. 2018) (<http://jaspar.genereg.net/>)
- TRANSFAC de GeneXplain GmbH (Wingender 2008) (<https://portal.genexplain.com/cgi-bin/portal/login.cgi>)
- UCSC Genome Browser Track Hubs (Casper et al. 2018) (<http://genome.ucsc.edu/>)
- MatInspector de Genomatix (Cartharius et al. 2005) (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/eldorado/main.pl>)

Se consideraron como positivos los sitios de unión que tuvieran un valor mayor a 0.80 en la matriz de similitud y que fueran predichos por al menos dos de los cuatro programas utilizados. Los datos obtenidos se analizaron con el software Unipro UGENE versión 1.29 (Okonechnikov et al. 2012) (<http://ugene.net/>).

7.2 Cultivo celular

Las líneas celulares U87 y U251, derivadas de GBM humanos, fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). Estas células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*, Cat N° L0107-500) con rojo de fenol, enriquecido con glucosa y suplementado con suero fetal bovino al 10% (Cat N° S1650), piruvato 1 Mm (Cat N° L0642-100), antibiótico 1 mM (Estreptomina 10 g/l, Penicilina G 6.028 g/l y Amfotericina B 0.025 g/l, Cat N° L0010) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Cat N° X0557-100) (todos de *Biowest*); con una temperatura de 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂. Para la dos líneas celulares, se sembraron un total de 80 000 células por pozo en placas de cultivo de 6 pozos. El medio se cambió cada 48 h hasta obtener una confluencia del 70-80%. Un día antes de

agregar los tratamientos a las células, el medio se cambió por *DMEM* libre de rojo de fenol y de hormonas.

7.3 Tratamientos hormonales en la células U251 y U87

Se realizaron dos esquemas de tratamientos. En el primero, para determinar el efecto que tiene la P4 sobre la expresión génica de ZEB1, las células U87 y U251 fueron tratadas con vehículo (ciclodextrina al 0.01%) y con cuatro concentraciones de P4 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) por 12 h. Con el fin de evaluar si el efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 es mediado por el RP, se realizó una segunda serie de tratamientos con vehículo, P4 10 nM, RU486 (1 μ M) y el tratamiento conjunto de P4+RU486 a las 12 y 24 h para evaluar los niveles de mRNA y, a 24 y 48 h para cuantificar el contenido a nivel de la proteína de ZEB1. Se realizaron cuatro experimentos independientes por cada tiempo y línea celular.

7.4 Extracción de RNA total

El RNA total de las células tratadas se obtuvo usando el método *fenol/isotiocianato de guanidina/cloroformo* con el reactivo Trizol-Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo el protocolo del proveedor. La concentración del RNA obtenido fue medida a través de la absorción UV con el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y la pureza se verificó con las proporciones 260/280 y 260/230 de la densidad óptica. La integridad del RNA fue verificada electroforéticamente con 1 μ g del RNA extraído en un gel de agarosa al 1.5 % con buffer Tris-Borato (TB 0.5X), en el cual se identificó la apropiada intensidad e integridad de las bandas del rRNA 28S y 18S.

7.5 RT-qPCR para medir la expresión génica de ZEB1

Con el fin de determinar el efecto de la P4 sobre la expresión génica de ZEB1, se realizó la cuantificación de la expresión de ZEB1 relativa al gen de referencia 18S a través de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. Los oligonucleótidos fueron diseñados usando las herramientas bioinformáticas de NCBI (Primer-BLAST), Ensembl (Autoprime), Genome Browser (UCSC-PCR *in Silico*) y Premier Biosoft (NetPrimer) (**Anexo I**).

Se obtuvo el DNA complementario (cDNA) del RNA extraído por medio de una retrotranscripción (*RT*) con la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del protocolo recomendado por el proveedor. Posteriormente, se

realizó la amplificación de los genes de ZEB1 y 18S en el equipo LightCycler (Roche, UK) empleando 2 μ L de cDNA y el reactivo fluorescente *SYBR Green*. Las condiciones de reacción programadas en el equipo fueron las siguientes: un ciclo de pre-incubación (95°C/10 min), 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C/10 s, alineación a 63°C/5 s, extensión a 72°C/10 s), un ciclo para el análisis de la temperatura de disociación del amplificado (desnaturalización a 95°C/0 s, alineación a 65°C/15 s, fusión a 95°C/0 s) y un ciclo de enfriamiento (40°C/1 min). Para determinar la expresión de ZEB1 relativa al gen de referencia 18S, se utilizó el método ΔC_t con los resultados obtenidos (Schmittgen et al. 2008; Pfaffl 2001).

7.6 Extracción de proteínas y Western Blot para medir la expresión de la proteína Zeb1

Para determinar el efecto de la P4 sobre el contenido de Zeb1, las células tratadas se homogenizaron con buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%) complementado con un coctel de inhibidores de proteasas (p8340, Sigma-Aldrich, USA). Se obtuvo la solución con proteínas totales por centrifugación a 14 000 g a 4°C por 15 min y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Se utilizó una concentración de 50 μ g de proteína para separarlas por electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida SDS-PAGE en gradiente de 7.5-12.5% a 80 V. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Milipore, USA) durante 10 h a 35 mA en una cámara semi-húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo (leche libre de grasa al 3% y albúmina al 2% en buffer TBS-tween 0.1%) durante 2 h a 37° en agitación constante (~50 rpm).

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-Zeb1 (policlonal de conejo, HPA027524, Sigma-Aldrich, Merck, USA) a una dilución de 1:500 (2 μ g/ml) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS-tween 0.1% tres veces cada 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:15000) acoplado a la peroxidasa de rábano (IgG-HRP, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 45 min a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS-tween 0.1%. Las proteínas se identificaron mediante quimioluminiscencia con el sustrato para la peroxidasa *Supersignal West Femto* (Thermo Fisher Scientific, USA) y se revelaron por autorradiografía (*BioMax Light Film*, Kodak).

Para normalizar las posibles diferencias en la proteína cargada, se utilizó a la proteína γ -tubulina como control de carga. Las membranas se incubaron en una solución de glicina a pH

ácido (0.1 M, pH 2.5) durante 1 h a temperatura ambiente; se lavaron con TBS-tween 0.1%; se incubaron con solución de bloqueo por 2 h a 37°C y se les agregó el anticuerpo primario anti γ -tubulina (policlonal de conejo, T3195, Sigma-Aldrich, Merck, USA) a una dilución 1:1000 (0.5 μ g/ml) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra (1:15000) acoplado a la peroxidasa de rábano (IgG-HRP, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 45 min a temperatura ambiente y en agitación constante. Las proteínas nuevamente se identificaron por quimioluminiscencia y las membranas se revelaron por autorradiografía como se describió anteriormente. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital de 14.1 megapíxeles (SD1400IS, Canon, Mex) y se analizaron por densitometría con el programa ImageJ 1.45S (National Institutes of Health, USA).

7.7 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos del RT-qPCR y del Western Blot fueron analizados y graficados usando el software *GraphPad Prism* para Windows XP. El análisis estadístico fue realizado usando una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se realizaron dos replicas para los cuatro experimentos tanto para la cuantificación por RT-qPCR como para el análisis por Western Blot.

8 Resultados

8.1- La región reguladora de la transcripción de ZEB1 contiene trece potenciales sitios de unión al RP

Se realizó un análisis *in silico* en la región reguladora de la transcripción de ZEB1 para analizar la probabilidad de la participación del RP en la regulación de la expresión de este gen. En la **figura 6** se muestra una representación esquemática del contexto genómico de ZEB1 así como sus principales sitios de regulación transcripcional. ZEB1 se encuentra localizado dentro de la banda cromosómica 11.22 del brazo corto del cromosoma 10, en la posición que va de 31,318,495 a 31,529,814 pb (**figura 6A**). El gen de ZEB1 se encuentra ubicado de forma contigua al locus que produce dos RNAs largos no codificantes –lncRNA– (ZEB1-AS1 –antisentido- y AL356258.1) y un pseudogen del RNA ribosomal 5S (RNA5SP309). Además, ZEB1 tiene un promotor bidireccional compartido con ZEB-AS1 (**figura 6B**). El promotor de ZEB1 produce diferentes variantes de transcritos (cuarenta verificados experimentalmente) con sitios de inicio de la transcripción (SIT) variables. En la **figura 6C-D** se muestran los ERPs identificados dentro de la región promotora y en sitios adyacentes a regiones de cromatina abierta con las herramientas de JASPAR, TRANSFAC, Genome Browser (UCSC) y Genomatix MatInspector. Los sitios de unión se consideraron positivos si al menos dos de los cuatro programas los predecían. Se encontró que el gen de ZEB1 tiene cinco ERPs situados en los dos flancos proximales del promotor. De forma interesante, los dos ERPs localizado antes de los SITs fueron predichos por tres de las cuatro bases de datos utilizadas, lo que indica que existe una alta probabilidad de ser sitios de unión funcionales. La figura 6 también muestra que aproximadamente a 25 kb delante del promotor se encuentran regiones abiertas de cromatina que fueron determinadas por *DNase-seq* y que están reportadas en la base de datos de *Ensembl*. Las regiones abiertas de cromatina se caracterizan por la depleción de nucleosomas que a menudo albergan sitios de unión a factores de transcripción que están asociados con elementos reguladores del DNA activo (Q. Zhang et al. 2017). Nuestros resultados muestran ocho ERPs en los sitios adyacentes a las primeras dos regiones de cromatina abierta, dos de los cuales fueron predichos por tres de los cuatro programas utilizados (**Anexo II**).

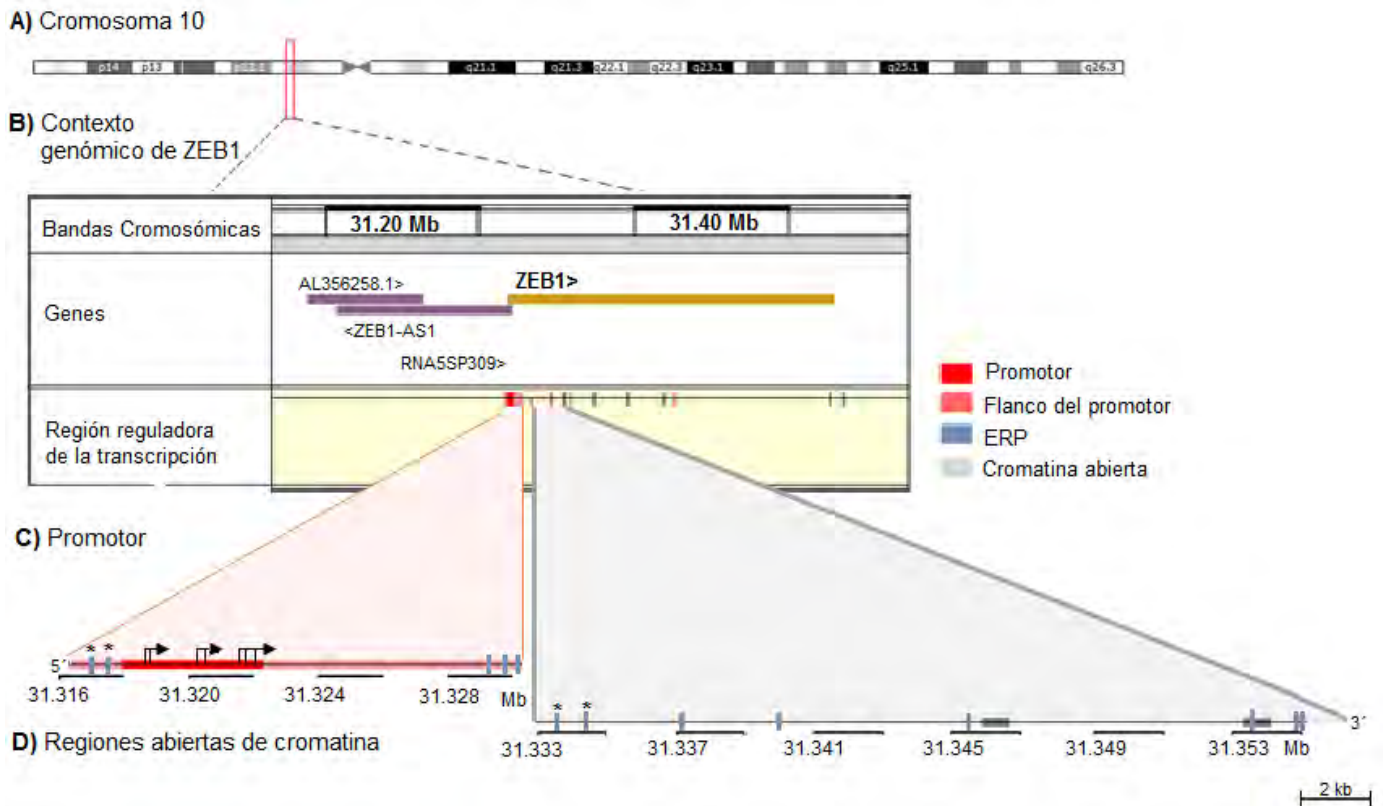


Figura 6. Representación esquemática de los ERPs en la región reguladora transcripcional de ZEB1. **A)** ZEB1 se encuentra localizado en el cromosoma 10p11.22. **B)** El gen de ZEB1 está situado de forma contigua al locus que produce al lncRNA ZEB-AS1, con el cual comparte un promotor bidireccional. De acuerdo al catálogo de *Ensembl*, la región reguladora describe a las regiones que están involucradas en la regulación transcripcional de los genes, como lo es el promotor y las regiones abiertas de cromatina. Se realizó un análisis *in silico* en la región regulatoria de la transcripción del gen de ZEB1 para buscar probables sitios de unión para el RP utilizando las herramientas de JASPAR, TRANSFAC, UCSC y MatInspector. Los sitios se consideraron positivos si fueron predichos por al menos dos de las cuatro bases de datos con un valor de puntuación de la similitud de la matriz mayor a 0.8. **C)** El promotor de ZEB1 contiene cinco ERPs distribuidos en los dos flancos. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción (SITs). **D)** En las zonas en donde existen regiones abiertas de cromatina justo delante del promotor, se encontraron ocho ERPs. *ERP predicho por tres de las cuatro bases de datos utilizadas.

8.2 La P4 incrementa la expresión de ZEB1.

Se determinó la expresión basal del gen ZEB1 en dos diferentes líneas celulares derivadas de GBM humanos (U251 y U87). Los resultados muestran que estas células expresan a ZEB1 tanto a nivel del mRNA (**figura 7A**) como de la proteína (**figura 7B-C**) sin una diferencia significativa entre ambas líneas celulares.

Dado que en el análisis *in silico* se encontraron varios ERPs en la región reguladora de la transcripción de ZEB1, se evaluó el efecto de la P4 sobre la expresión génica de ZEB1 en las células U251 y U87 que fueron tratadas con P4 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) por 12 h. Nuestros resultados muestran que la P4 indujo la expresión de ZEB1 en ambos tipos de células. En la **Figura 7D** se observa que las cuatro concentraciones de P4 promovieron la expresión de ZEB1 de forma estadísticamente significativa con respecto al vehículo en ambas líneas celulares. En el caso de las células U251 se observa que el aumento progresivo de la expresión de ZEB1 se correlaciona con el aumento en la concentración de P4 hasta llegar a la concentración de 1 μ M, en donde la expresión de ZEB1 comienza a disminuir. A diferencia de las células U251, en las células U87 no hubo un efecto relacionado con la concentración de P4, ya que las cuatro concentraciones aumentaron la expresión de ZEB1 de manera similar sin diferencia estadística significativa entre cada una de ellas.

8.3 El efecto de la P4 sobre la expresión de ZEB1 es mediado por el RP.

Para determinar si la inducción de la expresión de ZEB1 por P4 es llevada a cabo por el mecanismo clásico a través del RP se utilizó el antagonista RU486. Las células U251 y U87 fueron tratadas con vehículo, P4 10 nM, RU486 1 μ M y el tratamiento conjunto P4+RU486 a 12 y 24 h para medir los niveles del mRNA de ZEB1 y; a 24 y 48 h para determinar el efecto en la expresión a nivel de la proteína. Se utilizó la concentración de P4 10 nM porque es la que induce cambios en proliferación, migración e invasión de las células estudiadas e induce significativamente la expresión de ZEB1 (Germán et al., 2014; González et al., 2007; Piña et al., 2016) y que se asemeja a las concentraciones fisiológicas de P4 en el cerebro (Schumacher et al. 2014; Bixo et al. 1997).

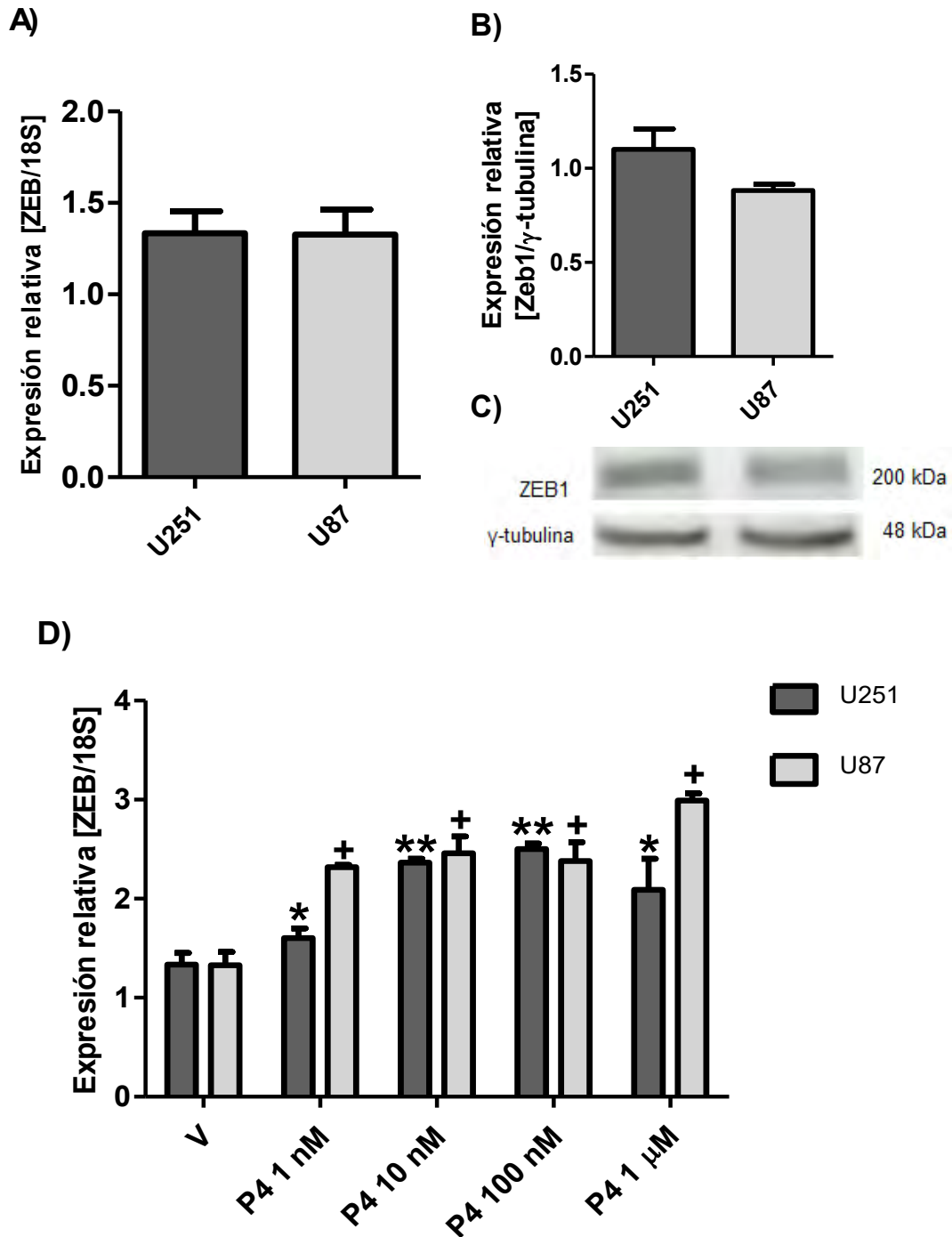


Figura 7. Efectos de la P4 sobre la expresión génica de ZEB1. A) La expresión basal del mRNA de ZEB1 relativa al gen de referencia 18S en las células U251 y U87 se cuantificó por RT-qPCR. B) Análisis densitométrico de la cantidad basal de Zeb1 evaluada mediante Western Blot usando γ -tubulina como control de carga. C) Bandas representativas de la expresión basal de Zeb1. Cada barra representa la media \pm E.E.M, n=4. No se observó diferencia significativamente estadística entre la expresión de ZEB1 en las células U251 y las U87. D) Las células U251 y U87 se trataron con P4 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) y vehículo (ciclodextrina 0.01%) a 12 h. Posteriormente se cuantificó la expresión de ZEB1 relativa al gen de referencia 18S por RT-qPCR. Cada barra representa la media \pm E.E.M. Células U251: n=3 *p<0.05 vs V; **p<0.05 vs V y P4 1 nM. Células U87: p<0.05 vs V.

En la **Figura 8A** se muestran los niveles de la expresión relativa de ZEB1 que se obtuvieron por RT-qPCR a 12 y 24 h de tratamiento con P4, RU486 Y P4 + RU486. Se observa que en las células U251 la P4 aumentó de forma significativa la expresión de ZEB1 con respecto a todos los demás tratamientos desde las 12 h. El tratamiento con RU486 no ejerció un efecto significativo sobre la expresión de ZEB1 por sí solo, pero al combinarlo con P4 (P4+RU486), bloqueó el efecto de esta última. En las células U87 sucede lo mismo que en las U251 a las 12 h, mientras que a las 24 h, el RU486 tuvo una actividad de antagonista parcial, ya que aumentó la expresión de ZEB1 con respecto al vehículo y al tratamiento conjunto (P4+RU486).

Los efectos de la P4 y el RU486 a 24 y 48 h sobre el contenido de la proteína Zeb1 se muestran en la **figura 8B-C**. En las células U251 la P4 aumentó la expresión de la proteína de manera significativa con respecto a todos los demás tratamientos en ambos tiempos, lo que concuerda con el efecto de la P4 sobre la expresión del mRNA. Asimismo, el RU486 como tratamiento individual no tuvo efecto sobre la expresión de Zeb1, pero en el tratamiento conjunto el antagonista bloqueó el efecto de la hormona. En las células U87 el aumento de la expresión de Zeb1 por P4 sólo fue significativo con respecto al vehículo y al tratamiento conjunto, tanto a 24 como a 48 h, ya que el RU486 aumentó la expresión de Zeb1 de manera significativa con respecto al vehículo a las 24 y 48 h. Al igual que en el caso de la expresión génica, el efecto de la P4 sobre la expresión de Zeb1 se abatió por el RU486. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de ZEB1 por P4 es llevada a cabo principalmente por su interacción con el RP.

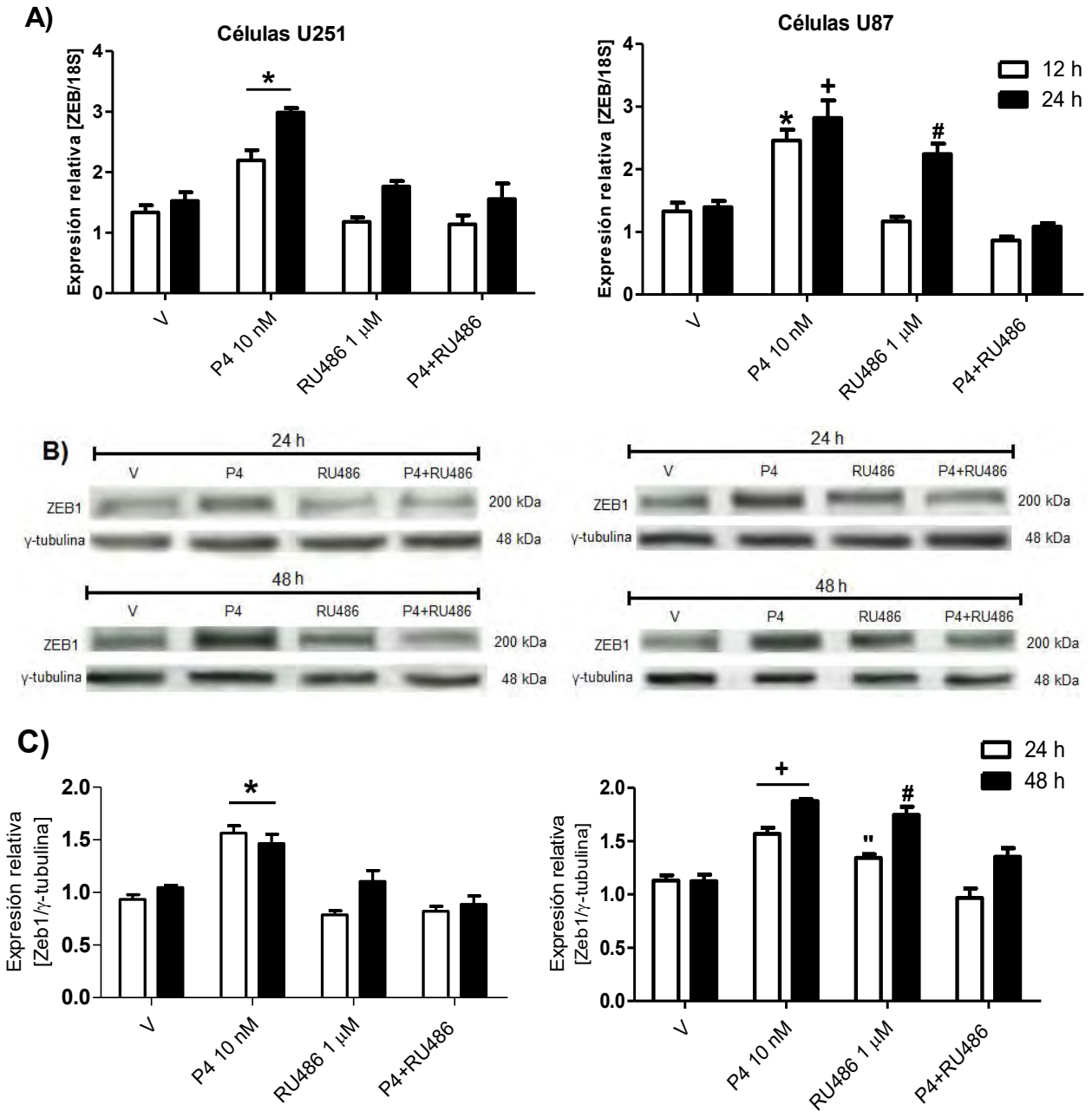


Figura 8. Participación del RP en la regulación de la expresión de ZEB1 por P4. Las células U251 (izquierda) y U87 (derecha) se trataron con P4 10 nM, RU486 1 μM, el tratamiento conjunto P4+RU486 y vehículo (ciclodextrina 0.01%) a 12 y 24 h para el análisis de la expresión génica y, a 24 y 48 h para el de la expresión de la proteína. A) Cuantificación de la expresión génica de ZEB1 relativa al gen de referencia 18S por RT-qPCR en cada línea celular por cada tratamiento. Cada barra representa la media ± E.E.M, n= 4. *p<0.05 vs V, RU486 y P4+RU486; +p<0.05 vs V y P4+RU486, #p<0.05 vs V y P4+RU486 y, vs RU486 a 12 h de tratamiento. B) Determinación del contenido de Zeb1 por Western Blot en las dos líneas celulares por cada tratamiento. Se muestran las bandas representativas de Zeb1. Se utilizó γ-tubulina como control de carga. C) Análisis densitométrico de la cantidad de Zeb1 en cada línea celular bajo los distintos tratamientos. Cada barra representa la media ± E.E.M, n= 4. *p<0.05 vs V, RU486 y P4+RU486; +p<0.05 vs V y P4+RU486; #p<0.05 vs P4+RU486; # p<0.05 vs V y P4+RU486.

9 Discusión

En este trabajo se evaluó el papel de la P4 en la regulación de la expresión de ZEB1 sobre células derivadas de GBM humanos. Anteriormente, se había reportado que los receptores nucleares de hormonas sexuales como el RP pueden regular directamente la expresión de ZEB1 en células derivadas de tejidos reproductivos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, particularmente durante el cáncer (Voutsadakis 2016). El análisis *in silico* que se realizó en la región reguladora de la transcripción de ZEB1 indica que existen ERPs tanto en el promotor como en las regiones adyacentes de cromatina abierta.

El hecho de que se encuentre un conjunto de varios ERPs en la región reguladora de ZEB1 sugiere que existe una alta probabilidad de que la expresión de este gen pueda ser regulada por el RP (Lieberman et al. 1993). Sin embargo, es importante considerar que en muchos casos se ha demostrado que la presencia de ERPs no es suficiente para la unión del RP al DNA, ya que se sabe que existen otros factores adicionales a estos sitios que determinan la unión del receptor *in vivo*, como lo son los sitios potenciadores (ampliamente conocidos como *enhancers*), la cooperación con otros factores de transcripción así como la remodelación de la estructura tridimensional de la cromatina (Ballaré et al. 2013).

El análisis bioinformático de diversos estudios en donde se han determinado los sitios funcionales de unión al RP en todo el genoma sobre diferentes tipos celulares por la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a la secuenciación masiva (ChIP-seq), ha mostrado que los genes que son receptivos a P4 contienen un enriquecimiento de sitios de unión a ciertos factores de transcripción cerca de los sitios de unión al RP (Clarke et al. 2012; Rubel et al. 2012; Yin et al. 2012).

Asimismo, los sitios genómicos funcionales de unión al RP identificados por ChIP-seq han mostrado que los ERPs están situados preferencialmente en los sitios proximales a los promotores de los genes que son inducidos por P4. Además, estos sitios se encuentran ocupados por nucleosomas, muy cerca de las regiones abiertas de cromatina (Ballaré et al. 2013). Al unirse el RP a los ERPs en respuesta a la P4, los nucleosomas experimentan remodelación local como resultado del reclutamiento de complejos enzimáticos modificadores de la cromatina y el desplazamiento de los dímeros de las histonas H1 y H2A/H2B, sin la pérdida de la partícula nuclear del nucleosoma (H3/H4). La remodelación nucleosómica local iniciada por el RP aumenta colectivamente la accesibilidad de los factores de remodelación de

la cromatina y la maquinaria de transcripción basal que actúa de forma sinérgica con el RP para mantener la transcripción (Beato et al. 2012).

Nuestros resultados muestran que un conjunto de varios ERPs se encuentran en estas regiones adyacentes a la cromatina abierta. Por lo tanto, el análisis *in silico* realizado sugiere que existe una alta probabilidad de que el RP tenga un importante papel en la regulación de la expresión génica de ZEB1.

Los resultados experimentales obtenidos en este estudio mostraron que la P4 es capaz de regular de forma positiva la expresión de ZEB1 en células de GBM humano. Se demostró que no existe diferencia entre la expresión constitutiva de ZEB1 en las células U87 y U251 y, que su regulación por diferentes concentraciones de P4 presenta un patrón de la expresión muy similar. De hecho, la concentración de P4 10 nM, la cual se asemeja más a las concentraciones fisiológicas de esta hormona en el cerebro (Bixo et al. 1997; M. Schumacher et al. 2014) y que ha mostrado efectos importantes en la malignidad de GBM (Germán et al., 2014; González et al., 2007; Piña et al., 2016); promueve la expresión de ZEB1 en los mismos niveles tanto en las células U87 como en las U251.

De manera interesante, en los experimentos en donde usamos un antagonista del RP, el RU486 (1 μ M), y P4 (10 nM) como tratamientos individuales y conjuntos (P4+RU486) a 12 y 24 h, observamos que los patrones de expresión génica de ZEB1 en cada tratamiento son altamente similares entre ambos tipos de células. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la regulación de la expresión génica de ZEB1 por P4 podría estar gobernada por mecanismos que se encuentran conservados en el GBM. Sin embargo, antes de llegar a esta conclusión, sería conveniente comprobarla en otros modelos experimentales de este tipo de tumor.

Uno de los aspectos más interesantes de los resultados obtenidos, es que al usar el tratamiento conjunto de P4+RU486, el efecto de la P4 sobre la expresión génica de ZEB1 se abate completamente en los dos tiempos de tratamiento. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que el principal mecanismo de la P4 que está induciendo positivamente la expresión de ZEB1 en los dos tipos de células es el mecanismo clásico, que es mediado por el RP. En cuanto a la expresión de la proteína, observamos que en las células U251 la regulación de la expresión de Zeb1 por P4 sigue el mismo patrón que la regulación de la expresión génica tanto a 24 como a 48 h.

Esto concuerda con otros estudios en donde se ha evaluado la regulación de la expresión de la Zeb1 a través de tiempo mediante otros estímulos, como el de TGF- β . En estos, se ha demostrado que el máximo nivel de expresión de Zeb1 se observa a las 24 h de tratamiento, se mantiene hasta las 48 h y después comienza a disminuir gradualmente hasta las 72 h; además, también se muestra que este comportamiento replica en diversas líneas de cáncer (Abshire et al. 2016; Dave et al. 2011).

Sin embargo, una diferencia que encontramos en las células U87 con respecto a lo observado en las células U251 es que en las primeras, se observa que el RU486 ejerce una actividad de agonista parcial conforme aumentan los tiempos de tratamiento. Esta actividad es principalmente observada en los resultados de la expresión de la proteína y alcanza un máximo nivel a las 48 h. Se ha demostrado que el RU486 muestra una actividad de agonista parcial que no sólo depende del promotor y tipo celular, sino también de la proporción relativa de los niveles de expresión de los correpresores NCoR y SMRT, así como de los coactivadores L7 y la proteína interruptora para antagonistas (*switch protein for antagonists*, SPA). L7/SPA es un complejo coactivador que puede incrementar la transcripción del RP unido al RU486, mientras que el complejo correpresor NCoR/SMRT suprime la actividad agonista del RU486 (Jackson et al. 1997). Además, la comunicación cruzada con las cascadas de transducción de señales de fosforilación de proteínas dependientes de AMPc también puede potenciar la actividad agonista parcial de RU486 al promover la disociación de los correpresores NCoR y SMRT (Wagner et al. 1998; Beck et al. 1993). Asimismo, cuando el RP unido al RU486 se asocia con el corregulador JDP-2 (*Jun dimerization protein-2*) en los ERPs, adopta una conformación activa en una subregión del dominio N-terminal, que es dependiente de la fosforilación en la serina 400 (Wardell et al. 2010).

Cabe mencionar que, a pesar de que las líneas celulares U87 y U251 son comúnmente usadas como modelos experimentales del GBM, se ha demostrado que exhiben ciertas diferencias en sus procesos de proliferación, invasión y migración; además de que presentan un perfil de expresión génica distinto (Jacobs et al. 2011; Li et al. 2017). Es probable que estas observaciones sean consecuencia de varios aspectos, como la alta heterogeneidad de los tumores de GBM o la deriva genética sobre los subcultivos a largo plazo (Allen et al. 2016; Torsik et al., 2014). Por lo tanto, la actividad de agonista parcial del RU486 que observamos en la regulación de la expresión de ZEB1 en las células U87 y no en las células U251, podría ser consecuencia de varios aspectos, como una diferente proporción de los niveles de

expresión de los correpresores NCoR/SMRT y los coactivadores L7/SPA, así como también de proteínas que le confieren estabilidad a la proteína de ZEB1 y aumentan su tiempo de vida media por interferencia de la degradación proteosomal (Zhou et al. 2017; Díaz et al. 2014; Abshire et al. 2016). Asimismo, los mecanismos moleculares y vías de señalización intracelular que regulan la actividad de estas proteínas podrían tener ciertas diferencias entre las células U87 y U251.

Hasta ahora, demostramos que la expresión de ZEB1 puede ser regulada positivamente por la P4 a través del RP en el GBM. Estas observaciones concuerdan con otros estudios en donde se ha evaluado la regulación de la expresión de ZEB1 por el RP. Por ejemplo, un estudio global de los genes regulados por las dos isoformas del RP (RP-A y RP-B) en un modelo de cáncer de mama determinó que ZEB1 está selectivamente regulado de forma positiva por el RP-B (Richer et al. 2002). Asimismo, también se ha demostrado que en el miometrio la expresión de ZEB1 es directamente regulada a la alta por la acción del RP activado por P4 (Renthal et al. 2010). Sin embargo, los efectos celulares que puedan estar relacionados en la progresión maligna debido a la regulación positiva de ZEB1 por la unión P4-RP, aún no han sido estudiados en ningún modelo de cáncer.

Además, actualmente existe un debate acerca de los efectos de la P4 en la TEM (proceso en el cual el factor ZEB1 es uno de los principales mediadores), ya que en muchos estudios realizados en células derivadas de tejido reproductivo se ha determinado que la P4 tiene efectos contrarios sobre dicha transición (Ito 2007; Voutsadakis 2016). En cáncer de mama se ha demostrado que el bloqueo de la expresión de E-cadherina y la inducción de la TEM están mediados por la activación de la isoforma del RP-B tanto *in vivo* como *in vitro*. El bloqueo de la expresión de E-cadherina por el RP-B fue un efecto indirecto a través de la activación de la vía Wnt-catenina y se demuestra que éste no estuvo mediado a través de ZEB1 (Kariagina et al. 2013). Sin embargo, tanto en cáncer de ovario (Jeon et al. 2016) como de endometrio (van der Horst et al. 2012) se ha demostrado que la P4 es capaz de disminuir el crecimiento tumoral así como la migración y el esparcimiento metastásico de las células por la inhibición de la TEM. Además, en cáncer de endometrio se ha demostrado que la pérdida del RP está asociada al aumento de la progresión maligna, invasividad y expresión de marcadores de células troncales (Makker et al. 2016).

Es evidente que los mecanismos moleculares mediados por ZEB1 que regulan la TEM y que son inducidos por P4 son dependientes de tejido y, debido a esto, la dinámica de sus funciones puede ser afectada por muchos otros factores, como la proporción de la expresión de diversas proteínas reguladoras así como las vías de señalización que regulan su funcionamiento. Por lo tanto, aún queda mucho por evaluar acerca de las consecuencias moleculares y celulares que podrían ser provocadas por la inducción positiva de la expresión de ZEB1 debido a la P4 en el GBM, ya que dicho conocimiento podría ayudarnos a comprender mejor los mecanismos que conducen a la progresión maligna del tumor.

10 Conclusiones

En este estudio se evaluó la participación del RP sobre la regulación de la expresión del factor de transcripción ZEB1 en células derivadas de GBM humano. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis *in silico*, la región reguladora de la transcripción de ZEB1 contiene 13 potenciales sitios de unión al RP o ERPs. En las células U251 y U87 la expresión constitutiva de ZEB1 se mantiene en los mismos niveles entre ambos tipos células. La P4 incrementa la expresión de ZEB1 tanto nivel transcripcional como traduccional en las células U251 y U87, y este efecto se interrumpe por la administración de un antagonista del RP, el RU486. Por lo tanto, el RP es fundamental en la regulación de la expresión de ZEB1 por P4.

11 Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevas perspectivas con respecto a los mecanismos inducidos por hormonas esteroides que podrían estar implicados en la regulación de la expresión de los factores de transcripción reguladores de la TEM (FT-TEM) en GBM, así como de los efectos biológicos que éstos puedan generar.

En este estudio, se encontró que la P4 puede regular de forma positiva la expresión de ZEB1 en el GBM, sin embargo, aún queda mucho por evaluar acerca de los efectos que podría tener esta regulación sobre los procesos de migración, invasión, características morfológicas y expresión de marcadores moleculares que describen a la TEM. Asimismo, cabe recordar que actualmente se sabe que las acciones de los FT-TEM –entre los cuales ZEB1 es uno de los reguladores centrales– no sólo están estrictamente ligados al concepto de la TEM *clásica*, que sólo se limita a los proceso invasivos que dicha transición provoca; sino también a la adquisición y mantenimiento de propiedades de células troncales cancerosas, a procesos de reparación del DNA y a la inducción de un fenotipo antiapoptótico y pro-superviviente; por lo que resulta ser realmente necesario evaluar cómo es la dinámica de la regulación de estas características por la expresión de ZEB1 inducida por P4.

Por otro lado, considerando que se ha demostrado que en el GBM la P4 es capaz de regular positivamente la expresión de ZEB1, resultaría interesante evaluar si la P4 también puede regular la expresión de otros FT-TEM como ZEB2, SNAI1/2 o TWIST1/2; así como también si otras hormonas sexuales como los estrógenos y andrógenos, podrían regular la expresión de los FT-TEM. De esta manera, sería posible determinar cómo son los mecanismos por los que las hormonas esteroides pueden regular la progresión maligna del GBM a través de la TEM y otros procesos relacionados con esta transición.

12 Referencias

- Abshire, C F, J L Carroll, and A-M Dragoi. 2016. "FLASH Protects ZEB1 from Degradation and Supports Cancer Cells' Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Oncogenesis* 5 (8). Nature Publishing Group: e254. doi:10.1038/oncsis.2016.55.
- Allen, M., M. Bjerke, H. Edlund, S. Nelander, and B. Westermarck. 2016. "Origin of the U87MG Glioma Cell Line: Good News and Bad News." *Science Translational Medicine* 8 (354): 354re3-354re3. doi:10.1126/scitranslmed.aaf6853.
- Anose, Bynthia M, and Michel M Sanders. 2011. "Androgen Receptor Regulates Transcription of the ZEB1 Transcription Factor." *International Journal of Endocrinology* 2011: 1–10. doi:10.1155/2011/903918.
- Bai, Ren Yuan, Verena Staedtke, and Gregory J. Riggins. 2011. "Molecular Targeting of Glioblastoma: Drug Discovery and Therapies." *Trends in Molecular Medicine* 17 (6). Elsevier Ltd: 301–12. doi:10.1016/j.molmed.2011.01.011.
- Ballaré, Cecilia, Giancarlo Castellano, Laura Gaveglia, Sonja Althammer, Juan González-Vallinas, Eduardo Eyra, Francois Le Dily, et al. 2013. "Nucleosome-Driven Transcription Factor Binding and Gene Regulation." *Molecular Cell* 49 (1): 67–79. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.019.
- Barth, Claudia, Arno Villringer, and Julia Sacher. 2015. "Sex Hormones Affect Neurotransmitters and Shape the Adult Female Brain during Hormonal Transition Periods." *Frontiers in Neuroscience* 9 (FEB): 1–20. doi:10.3389/fnins.2015.00037.
- Beato, Miguel, and Guillermo P. Vicent. 2012. "Impact of Chromatin Structure and Dynamics on PR Signaling. The Initial Steps in Hormonal Gene Regulation." *Molecular and Cellular Endocrinology* 357 (1–2). Elsevier Ireland Ltd: 37–42. doi:10.1016/j.mce.2011.09.004.
- Beck, C A, N L Weigel, M L Moyer, S K Nordeen, and D P Edwards. 1993. "The Progesterone Antagonist RU486 Acquires Agonist Activity upon Stimulation of cAMP Signaling Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (10): 4441–45. doi:10.1073/pnas.90.10.4441.
- Berman, K F, P J Schmidt, D R Rubinow, M A Danaceau, J D Van Horn, G Esposito, J L Ostrem, and D R Weinberger. 1997. "Modulation of Cognition-Specific Cortical Activity by Gonadal Steroids: A Positron-Emission Tomography Study in Women." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (16): 8836–41. doi:10.1073/pnas.94.16.8836.
- Bixo, Marie, Agneta Andersson, Bengt Winblad, Robert H Purdy, and Torbjörn Bäckström.

1997. "Progesterone, 5 α -Pregnane-3,20-Dione and 3 α -Hydroxy-5 α -Pregnane-20-One in Specific Regions of the Human Female Brain in Different Endocrine States." *Brain Research* 764 (1–2): 173–78. doi:10.1016/S0006-8993(97)00455-1.
- Boonyaratanakornkit, Viroj, Margaret Porter Scott, Vered Ribon, Lori Sherman, Steven M. Anderson, James L. Maller, W. Todd Miller, and Dean P. Edwards. 2001. "Progesterone Receptor Contains a Proline-Rich Motif That Directly Interacts with SH3 Domains and Activates c-Src Family Tyrosine Kinases." *Molecular Cell* 8 (2): 269–80. doi:10.1016/S1097-2765(01)00304-5.
- Brabletz, Simone, and Thomas Brabletz. 2010. "The ZEB/miR-200 Feedback Loop—a Motor of Cellular Plasticity in Development and Cancer?" *EMBO Reports* 11 (9): 670–77. doi:10.1038/embor.2010.117.
- Brabletz, Thomas, Raghu Kalluri, M. Angela Nieto, and Robert A. Weinberg. 2018. "EMT in Cancer." *Nature Reviews Cancer*, January. doi:10.1038/nrc.2017.118.
- Bracken, Cameron P, Philip A Gregory, Natasha Kolesnikoff, Andrew G Bert, Jun Wang, M Frances Shannon, and Gregory J Goodall. 2008. "A Double-Negative Feedback Loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 Family Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition." *Cancer Research* 68 (19): 7846–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1942.
- Brennan, Cameron W., Roel G.W. Verhaak, Aaron McKenna, Benito Campos, Houtan Noushmehr, Sofie R. Salama, Siyuan Zheng, et al. 2013. "The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma." *Cell* 155 (2): 462–77. doi:10.1016/j.cell.2013.09.034.
- Camacho-Arroyo, Ignacio, Olivia Tania Hernandez-Hernandez, and Edith Cabrera-Munoz. 2011. "Role of Progesterone in Human Astrocytomas Growth." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11 (13): 1663–67. doi:10.2174/156802611796117685.
- Carlsson, Steven K, Shaun P Brothers, and Claes Wahlestedt. 2014. "Emerging Treatment Strategies for Glioblastoma Multiforme." *EMBO Molecular Medicine* 6 (11): 1359–70. doi:10.15252/emmm.201302627.
- Cartharius, K, K Frech, K Grote, B Klocke, M Haltmeier, A Klingenhoff, M Frisch, M Bayerlein, and T Werner. 2005. "MatInspector and beyond: Promoter Analysis Based on Transcription Factor Binding Sites." *Bioinformatics* 21 (13): 2933–42. doi:10.1093/bioinformatics/bti473.
- Casper, Jonathan, Ann S. Zweig, Chris Villarreal, Cath Tyner, Matthew L. Speir, Kate R. Rosenbloom, Brian J. Raney, et al. 2018. "The UCSC Genome Browser Database: 2018

Update.” *Nucleic Acids Research* 46 (D1). Oxford University Press: D762–69.
doi:10.1093/nar/gkx1020.

- Chamberlain, E M, and M M Sanders. 1999. “Identification of the Novel Player deltaEF1 in Estrogen Transcriptional Cascades.” *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3600–3606. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chen, Wei, Kuan-kei Kong, Xin-ke Xu, Cheng Chen, Hui Li, Fang-yu Wang, Xiao-fang Peng, et al. 2017. “Downregulation of miR-205 Is Associated with Glioblastoma Cell Migration, Invasion, and the Epithelial-Mesenchymal Transition, by Targeting ZEB1 via the Akt/mTOR Signaling Pathway.” *International Journal of Oncology*, December, 485–95. doi:10.3892/ijo.2017.4217.
- Clarke, Christine L., and J. Dinny Graham. 2012. “Non-Overlapping Progesterone Receptor Cistromes Contribute to Cell-Specific Transcriptional Outcomes.” *PLoS ONE* 7 (4). doi:10.1371/journal.pone.0035859.
- Cuddapah, Vishnu Anand, Stefanie Robel, Stacey Watkins, and Harald Sontheimer. 2014. “A Neurocentric Perspective on Glioma Invasion.” *Nature Reviews. Neuroscience* 15 (7). Nature Publishing Group: 455–65. doi:10.1038/nrn3765.
- Dave, Natàlia, Sandra Guaita-Esteruelas, Susana Gutarra, Àlex Frias, Manuel Beltran, Sandra Peiró, and Antonio García De Herreros. 2011. “Functional Cooperation between snail1 and Twist in the Regulation of ZEB1 Expression during Epithelial to Mesenchymal Transition.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (14): 12024–32. doi:10.1074/jbc.M110.168625.
- Davis, Mary Elizabeth. 2016. “Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment.” *Clinical Journal of Oncology Nursing* 20 (5): 1–8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- DeMAYO, FRANCESCO J., BIHONG ZHAO, NORIO TAKAMOTO, and SOPHIA Y. TSAI. 2002. “Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 955 (1): 48–59. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02765.x.
- Díaz, N. F., N. E. Díaz-Martínez, I. Velasco, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2009. “Progesterone Increases Dopamine Neurone Number in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells.” *Journal of Neuroendocrinology* 21 (8): 730–36. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01891.x.
- Díaz, Néstor F., Christian Guerra-Arraiza, Néstor E. Díaz-Martínez, Patricia Salazar,

- Anayansi Molina-Hernández, Ignacio Camacho-Arroyo, and Ivan Velasco. 2007. "Changes in the Content of Estrogen α and Progesterone Receptors during Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Dopamine Neurons." *Brain Research Bulletin* 73 (1–3): 75–80. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.02.002.
- Díaz, VM, R Viñas-Castells, and A García de Herreros. 2014. "Regulation of the Protein Stability of EMT Transcription Factors." *Cell Adhesion & Migration* 8 (4): 418–28. doi:10.4161/19336918.2014.969998.
- Diep, Caroline H, Andrea R Daniel, Laura J Mauro, Todd P Knutson, and Carol A Lange. 2015. "Progesterone Action in Breast, Uterine, and Ovarian Cancers." *Journal of Molecular Endocrinology* 54 (2): R31–53. doi:10.1530/JME-14-0252.
- Edwards, Lincoln A, Kevin Woolard, Myung Jin Son, Aiguo Li, Jeongwu Lee, Chibawanye Ene, Samuel A Mantey, et al. 2011. "Effect of Brain- and Tumor-Derived Connective Tissue Growth Factor on Glioma Invasion." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 103 (15): 1162–78. doi:10.1093/jnci/djr224.
- Frei, Karl, Dorothee Gramatzki, Isabel Tritschler, Judith Johanna Schroeder, Larisa Espinoza, Elisabeth Jane Rushing, and Michael Weller. 2015. "Transforming Growth Factor- β Pathway Activity in Glioblastoma." *Oncotarget* 6 (8). doi:10.18632/oncotarget.3467.
- Frick, Karyn M., Jaekyoon Kim, Jennifer J. Tuscher, and Ashley M. Fortress. 2015. "Sex Steroid Hormones Matter for Learning and Memory: Estrogenic Regulation of Hippocampal Function in Male and Female Rodents." *Learning & Memory* 22 (9): 472–93. doi:10.1101/lm.037267.114.
- Gallego, O. 2015. "Nonsurgical Treatment of Recurrent Glioblastoma." *Current Oncology* 22 (4): 273. doi:10.3747/co.22.2436.
- Germán-Castelán, Liliana, Joaquín Manjarrez-Marmolejo, Aliesha González-Arenas, María Genoveva González-Morán, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2014. "Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat." *BioMed Research International* 2014: 1–8. doi:10.1155/2014/393174.
- Gladson, Candace L., Richard A. Prayson, and Wei Michael Liu. 2010. "The Pathobiology of Glioma Tumors." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5 (1): 33–50. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102109.
- González-Agüero, Gabriela, Andrés A. Gutiérrez, Diana González-Espinosa, José D. Solano, Rocío Morales, Aliesha González-Arenas, Edith Cabrera-Muñoz, and Ignacio Camacho-

- Arroyo. 2007. "Progesterone Effects on Cell Growth of U373 and D54 Human Astrocytoma Cell Lines." *Endocrine* 32 (2): 129–35. doi:10.1007/s12020-007-9023-0.
- González-Agüero, G, R Ondarza, a Gamboa-Domínguez, M a Cerbón, and I Camacho-Arroyo. 2001. "Progesterone Receptor Isoforms Expression Pattern in Human Astrocytomas." *Brain Research Bulletin* 56 (1): 43–48. doi:10.1016/S0361-9230(01)00590-1.
- Grimm, Sandra L., Sean M. Hartig, and Dean P. Edwards. 2016. "Progesterone Receptor Signaling Mechanisms." *Journal of Molecular Biology* 428 (19). Elsevier B.V.: 3831–49. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.020.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation." *Cell* 144 (5). Elsevier Inc.: 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hansberg-Pastor, Valeria, Aliesha González-Arenas, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2017. "CCAAT/enhancer Binding Protein β Negatively Regulates Progesterone Receptor Expression in Human Glioblastoma Cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 439 (January): 317–27. doi:10.1016/j.mce.2016.09.018.
- Hansberg-Pastor, Valeria, Aliesha González-Arenas, Ana Gabriela Piña-Medina, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2015. "Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins Involved in Brain Plasticity." *Frontiers in Psychiatry* 6 (NOV). doi:10.3389/fpsy.2015.00165.
- Haraguchi, Shogo, Katsunori Sasahara, Hanako Shikimi, Shin Ichiro Honda, Nobuhiro Harada, and Kazuyoshi Tsutsui. 2012. "Estradiol Promotes Purkinje Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis during Neonatal Life by Inducing the Expression of BDNF." *Cerebellum* 11 (2): 416–17. doi:10.1007/s12311-011-0342-6.
- Hernández-Hernández, Olivia Tania, Tania Karina González-García, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2012. "Progesterone Receptor and SRC-1 Participate in the Regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 Expression in Human Astrocytoma Cell Lines." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 132 (1–2). Elsevier Ltd: 127–34. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.04.005.
- Horst, Paul H. van der, Yongyi Wang, Ingrid Vandenput, Liesbeth C. Kühne, Patricia C. Ewing, Wilfred F J van IJcken, Marten van der Zee, Frederic Amant, Curt W. Burger, and Leen J. Blok. 2012. "Progesterone Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer." *PLoS ONE* 7 (1). doi:10.1371/journal.pone.0030840.
- Hurt, Elaine M., Jessica N. Saykally, Bynthia M. Anose, Kimberly R. Kalli, and Michel M.

- Sanders. 2008. "Expression of the ZEB1 (δ EF1) Transcription Factor in Human: Additional Insights." *Molecular and Cellular Biochemistry* 318 (1–2): 89–99. doi:10.1007/s11010-008-9860-z.
- Iser, Isabele C, Mariana B Pereira, Guido Lenz, and Márcia R. Wink. 2017. "The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation." *Medicinal Research Reviews* 37 (2): 271–313. doi:10.1002/med.21408.
- Ito, Kiyoshi. 2007. "Hormone Replacement Therapy and Cancers: The Biological Roles of Estrogen and Progestin in Tumorigenesis Are Different between the Endometrium and Breast." *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 212 (1): 1–12. doi:10.1620/tjem.212.1.
- Jackson, Twila A., Jennifer K. Richer, David L. Bain, Glenn S. Takimoto, Lin Tung, and Kathryn B. Horwitz. 1997. "The Partial Agonist Activity of Antagonist-Occupied Steroid Receptors Is Controlled by a Novel Hinge Domain-Binding Coactivator L7/SPA and the Corepressors N-CoR or SMRT." *Molecular Endocrinology* 11 (6): 693–705. doi:10.1210/mend.11.6.0004.
- Jacobs, Valerie L., Pablo A. Valdes, William F. Hickey, and Joyce A. De Leo. 2011. "Current Review of in Vivo GBM Rodent Models: Emphasis on the CNS-1 Tumour Model." *ASN Neuro* 3 (3): AN20110014. doi:10.1042/AN20110014.
- Jeon, So Ye, Kyung A. Hwang, and Kyung Chul Choi. 2016. "Effect of Steroid Hormones, Estrogen and Progesterone, on Epithelial Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Development." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 158. Elsevier Ltd: 1–8. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.02.005.
- Joseph, J. V., S. Conroy, T. Tomar, E. Eggens-Meijer, K. Bhat, S. Copray, A. M.E. Walenkamp, et al. 2014. "TGF- β Is an Inducer of ZEB1-Dependent Mesenchymal Transdifferentiation in Glioblastoma That Is Associated with Tumor Invasion." *Cell Death and Disease* 5 (10). Nature Publishing Group: e1443-14. doi:10.1038/cddis.2014.395.
- Joseph, Justin V, Siobhan Conroy, Kirill Pavlov, Pallavi Sontakke, Tushar Tomar, Ellie Eggens-Meijer, Veerakumar Balasubramaniyan, Michiel Wagemakers, Wilfred F.A. den Dunnen, and Frank A.E. Kruyt. 2015. "Hypoxia Enhances Migration and Invasion in Glioblastoma by Promoting a Mesenchymal Shift Mediated by the HIF1 α –ZEB1 Axis." *Cancer Letters* 359 (1). Elsevier Ireland Ltd: 107–16. doi:10.1016/j.canlet.2015.01.010.

- Kahlert, Ulf D, Donata Maciaczyk, Soroush Doostkam, Brent A Orr, Brian Simons, Tomasz Bogiel, Thomas Reithmeier, et al. 2012. "Activation of Canonical WNT / B -Catenin Signaling Enhances in Vitro Motility of Glioblastoma Cells by Activation of ZEB1 and Other Activators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Cancer Letters* 325 (1). Elsevier Ireland Ltd: 42–53. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.024.
- Kahlert, Ulf D, Abigail K Suwala, Eric H Raabe, Florian A Siebzehrubl, Maria J Suarez, Brent A Orr, Eli E Bar, Jaroslaw Maciaczyk, and Charles G Eberhart. 2015. "ZEB1 Promotes Invasion in Human Fetal Neural Stem Cells and Hypoxic Glioma Neurospheres." *Brain Pathology* 25 (6): 724–32. doi:10.1111/bpa.12240.
- Kalluri, Raghu, and Robert A Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. doi:10.1172/JCI39104.
- Kariagina, Anastasia, Jianwei Xie, Ingeborg M. Langohr, Razvan C. Opreanu, Marc D. Basson, and Sandra Z. Haslam. 2013. "Progesterone Decreases Levels of the Adhesion Protein E-Cadherin and Promotes Invasiveness of Steroid Receptor Positive Breast Cancers." *Hormones and Cancer* 4 (6): 371–80. doi:10.1007/s12672-013-0158-6.
- Khalid, Humayun, Shobu Shibata, Masao Kishikawa, Akio Yasunaga, Masachika Iseki, and Tsuyoshi Hiura. 1997. "Immunohistochemical Analysis of Progesterone Receptor and Ki-67 Labeling Index in Astrocytic Tumors." *Cancer* 80 (11): 2133–40. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19971201)80:11<2133::AID-CNCR13>3.0.CO;2-#.
- Khan, Aziz, Oriol Fornes, Arnaud Stigliani, Marius Gheorghe, Jaime A Castro-Mondragon, Robin van der Lee, Adrien Bessy, et al. 2018. "JASPAR 2018: Update of the Open-Access Database of Transcription Factor Binding Profiles and Its Web Framework." *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D260–66. doi:10.1093/nar/gkx1126.
- Kim, J Julie, Takeshi Kurita, and Serdar E Bulun. 2013. "Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer." *Endocrine Reviews* 34 (1): 130–62. doi:10.1210/er.2012-1043.
- Klijn, J G, B Setyono-Han, and J A Foekens. 2000. "Progesterone Antagonists and Progesterone Receptor Modulators in the Treatment of Breast Cancer." *Steroids* 65 (10–11): 825–30. doi:10.1016/S0039-128X(00)00195-1.
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. "Molecular Mechanisms of Epithelial–mesenchymal Transition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (3). Nature Publishing Group: 178–96. doi:10.1038/nrm3758.

- Li, Hezhen, Bingxi Lei, Wei Xiang, Hai Wang, Wenfeng Feng, Yawei Liu, and Songtao Qi. 2017. "Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines." *Turkish Neurosurgery* 27 (6): 894–903. doi:10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1.
- Lieberman, Benjamin A, Betty J Bona, Dean P Edwards, and Steven K Nordeen. 1993. "The Constitution of a Progesterone Response Element." *Molecular Endocrinology* 7 (4): 515–27. doi:10.1210/mend.7.4.8388996.
- Liu, Feng, Mark Day, Luis C Muñiz, Daniel Bitran, Robert Arias, Raquel Revilla-Sanchez, Steve Grauer, et al. 2008. "Activation of Estrogen Receptor- β Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Improves Memory." *Nature Neuroscience* 11 (3): 334–43. doi:10.1038/nn2057.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, and David W. Ellison. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica* 131 (6). Springer Berlin Heidelberg: 803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
- Makker, Annu, and Madhu Mati Goel. 2016. "Tumor Progression, Metastasis, and Modulators of Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrioid Endometrial Carcinoma: An Update." *Endocrine-Related Cancer* 23 (2): R85–111. doi:10.1530/ERC-15-0218.
- McLendon, Roger, Allan Friedman, Darrell Bigner, Erwin G. Van Meir, Daniel J. Brat, Gena M. Mastrogiannakis, Jeffrey J. Olson, et al. 2008. "Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways." *Nature* 455 (7216): 1061–68. doi:10.1038/nature07385.
- McNeill, Katharine A. 2016. "Epidemiology of Brain Tumors." *Neurologic Clinics* 34 (4). Elsevier Inc: 981–98. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.014.
- Meyer, M E, Astrid Pornon, J W Ji, M T Bocquel, P Chambon, and H Gronemeyer. 1990. "Agonistic and Antagonistic Activities of RU486 on the Functions of the Human Progesterone Receptor." *The EMBO Journal* 9 (12): 3923–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249658>.
- Mikheeva, Svetlana A., Andrei M. Mikheev, Audrey Petit, Richard Beyer, Robert G. Oxford, Leila Khorasani, John Patrick Maxwell, et al. 2010. "TWIST1 Promotes Invasion through Mesenchymal Change in Human Glioblastoma." *Molecular Cancer* 9: 1–18. doi:10.1186/1476-4598-9-194.

- Myung, Jae Kyung, Seung Ah Choi, Seung-Ki Kim, Kyu-Chang Wang, and Sung-Hye Park. 2014. "Snail Plays an Oncogenic Role in Glioblastoma by Promoting Epithelial Mesenchymal Transition." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (5): 1977–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966907>.
- Ohgaki, Hiroko, and Paul Kleihues. 2013. "The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma." *Clinical Cancer Research* 19 (4): 764–72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
- Okonechnikov, Konstantin, Olga Golosova, Mikhail Fursov, Alexey Varlamov, Yuri Vaskin, Ivan Efremov, O. G. German Grehov, et al. 2012. "Unipro UGENE: A Unified Bioinformatics Toolkit." *Bioinformatics* 28 (8): 1166–67. doi:10.1093/bioinformatics/bts091.
- Olar, Adriana, and Kenneth D. Aldape. 2014. "Using the Molecular Classification of Glioblastoma to Inform Personalized Treatment." *Journal of Pathology* 232 (2): 165–77. doi:10.1002/path.4282.
- Ostrom, Quinn T, Haley Gittleman, Peter Liao, Toni Vecchione-Koval, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, and Jill S Barnholtz-Sloan. 2017. "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2010–2014." *Neuro-Oncology* 19 (suppl_5): v1–88. doi:10.1093/neuonc/nox158.
- Pang, Yefei, Jing Dong, and Peter Thomas. 2013. "Characterization, Neurosteroid Binding and Brain Distribution of Human Membrane Progesterone Receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ Involvement in Neurosteroid Inhibition of Apoptosis." *Endocrinology* 154 (1): 283–95. doi:10.1210/en.2012-1772.
- Peinado, Héctor, David Olmeda, and Amparo Cano. 2007. "Snail, Zeb and bHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?" *Nature Reviews Cancer* 7 (6): 415–28. doi:10.1038/nrc2131.
- Pfaffl, M W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Piña-Medina, Ana Gabriela, Valeria Hansberg-Pastor, Aliesha González-Arenas, Marco Cerbón, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2016. "Progesterone Promotes Cell Migration, Invasion and Cofilin Activation in Human Astrocytoma Cells." *Steroids* 105 (January): 19–25. doi:10.1016/j.steroids.2015.11.008.
- Qi, Songtao, Ye Song, Yuping Peng, Hao Wang, Hao Long, Xiaoli Yu, Zhiyong Li, et al. 2012.

“ZEB2 Mediates Multiple Pathways Regulating Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis in Glioma.” Edited by Aamir Ahmad. *PloS One* 7 (6): e38842.
doi:10.1371/journal.pone.0038842.

Qiao, Liang, Gregory E. Tasian, Haiyang Zhang, Gerald R. Cunha, and Laurence Baskin. 2011. “ZEB1 Is Estrogen Responsive in Vitro in Human Foreskin Cells and Is over Expressed in Penile Skin in Patients with Severe Hypospadias.” *The Journal of Urology* 185 (5). American Urological Association Education and Research, Inc.: 1888–93.
doi:10.1016/j.juro.2010.12.066.

Ramaswamy, Raghu, Katherine Ashton, Robert Lea, Philip Roberts, Charles H. Davis, Aprajay Golash, and Timothy Dawson. 2012. “Study of Effectiveness of Mifepristone for Glioma Cell Line Growth Suppression.” *British Journal of Neurosurgery* 26 (3): 336–39.
doi:10.3109/02688697.2011.629696.

Remage-Healey, L., and A. H. Bass. 2007. “Plasticity in Brain Sexuality Is Revealed by the Rapid Actions of Steroid Hormones.” *Journal of Neuroscience* 27 (5): 1114–22.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4282-06.2007.

Renthal, Nora E, Chien-Cheng Chen, Koriand'r C. Williams, Robert D Gerard, Janine Prange-Kiel, and Carole R. Mendelson. 2010. “miR-200 Family and Targets, ZEB1 and ZEB2, Modulate Uterine Quiescence and Contractility during Pregnancy and Labor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (48): 20828–33. doi:10.1073/pnas.1008301107.

Richer, Jennifer K., Britta M. Jacobsen, Nicole G. Manning, M. Greg Abel, Douglas M. Wolf, and Kathryn B. Horwitz. 2002. “Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 5209–18. doi:10.1074/jbc.M110090200.

Rubel, Cory A., Rainer B. Lanz, Ramakrishna Kommagani, Heather L. Franco, John P. Lydon, and Francesco J. DeMayo. 2012. “Research Resource: Genome-Wide Profiling of Progesterone Receptor Binding in the Mouse Uterus.” *Molecular Endocrinology* 26 (8): 1428–42. doi:10.1210/me.2011-1355.

Sakaki, Michiko, and Mara Mather. 2012. “How Reward and Emotional Stimuli Induce Different Reactions across the Menstrual Cycle.” *Social and Personality Psychology Compass* 6 (1): 1–17. doi:10.1111/j.1751-9004.2011.00415.x.

Schmittgen, Thomas D, and Kenneth J Livak. 2008. “Analyzing Real-Time PCR Data by the

- Comparative CT Method." *Nature Protocols* 3 (6): 1101–8. doi:10.1038/nprot.2008.73.
- Schumacher, M., C. Mattern, A. Ghomari, J. P. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A. F. De Nicola, and R. Guennoun. 2014. "Revisiting the Roles of Progesterone and Allopregnanolone in the Nervous System: Resurgence of the Progesterone Receptors." *Progress in Neurobiology* 113. Elsevier Ltd: 6–39. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.09.004.
- Schumacher, Michael, Rashad Hussain, Nathalie Gago, Jean Paul Oudinet, Claudia Mattern, and Abdel M. Ghomari. 2012. "Progesterone Synthesis in the Nervous System: Implications for Myelination and Myelin Repair." *Frontiers in Neuroscience* 6 (FEB): 1–22. doi:10.3389/fnins.2012.00010.
- Serna, Eva, Concha Lopez-Gines, Daniel Monleon, Lisandra Muñoz-Hidalgo, Robert C Callaghan, Rosario Gil-Benso, Horacio Martinetto, Aurelia Gregori-Romero, Jose Gonzalez-Darder, and Miguel Cerda-Nicolas. 2014. "Correlation between EGFR Amplification and the Expression of MicroRNA-200c in Primary Glioblastoma Multiforme." Edited by Ilya Ulasov. *PLoS ONE* 9 (7): e102927. doi:10.1371/journal.pone.0102927.
- Sharma, Shikhar, Theresa K. Kelly, and Peter A. Jones. 2009. "Epigenetics in Cancer." *Carcinogenesis* 31 (1): 27–36. doi:10.1093/carcin/bgp220.
- Siebzehnruhl, Florian A., Daniel J Silver, Bugra Tugertimur, Loic P Deleyrolle, Dorit Siebzehnruhl, Matthew R Sarkisian, Kelly G Devers, et al. 2013. "The ZEB1 Pathway Links Glioblastoma Initiation, Invasion and Chemoresistance." *EMBO Molecular Medicine* 5 (8): 1196–1212. doi:10.1002/emmm.201302827.
- Spitz, I. 2000. "The Use of Progesterone Antagonists and Progesterone Receptor Modulators in Contraception." *Steroids* 65 (10–11): 817–23. doi:10.1016/S0039-128X(00)00199-9.
- Spoelstra, Nicole S., Nicole G. Manning, Yujiro Higashi, Douglas Darling, Meenakshi Singh, Kenneth R. Shroyer, Russell R. Broaddus, Kathryn B. Horwitz, and Jennifer K. Richer. 2006. "The Transcription Factor ZEB1 Is Aberrantly Expressed in Aggressive Uterine Cancers." *Cancer Research* 66 (7): 3893–3902. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2881.
- Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J.B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma." *New England Journal of Medicine* 352 (10): 987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330.
- Tabassum, Doris P, and Kornelia Polyak. 2015. "Tumorigenesis: It Takes a Village." *Nature*

- Reviews Cancer* 15 (8). Nature Publishing Group: 473–83. doi:10.1038/nrc3971.
- Thomas, Peter, and Yefei Pang. 2012. “Membrane Progesterone Receptors: Evidence for Neuroprotective, Neurosteroid Signaling and Neuroendocrine Functions in Neuronal Cells.” *Neuroendocrinology* 96 (2): 162–71. doi:10.1159/000339822.
- Torsvik, Anja, Daniel Stieber, PerØyvind Øyvind Enger, Anna Golebiewska, Anders Molven, Agnete Svendsen, Bengt Westermark, et al. 2014. “U-251 Revisited: Genetic Drift and Phenotypic Consequences of Long-Term Cultures of Glioblastoma Cells.” *Cancer Medicine* 3 (4): 812–24. doi:10.1002/cam4.219.
- Urbańska, Kaja, Justyna Sokołowska, Maciej Szmidt, and Paweł Sysa. 2014. “Glioblastoma Multiforme - an Overview.” *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)* 18 (5): 307–12. doi:10.5114/wo.2014.40559.
- Valadez-Cosmes, Paulina, Liliana Germán-Castelán, Aliesha González-Arenas, Marco A Velasco-Velázquez, Valeria Hansberg-Pastor, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2015. “Expression and Hormonal Regulation of Membrane Progesterone Receptors in Human Astrocytoma Cells.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 154 (November). Elsevier Ltd: 176–85. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.08.006.
- Valadez-Cosmes, Paulina, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez, Marco Cerbón, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2016. “Membrane Progesterone Receptors in Reproduction and Cancer.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 434: 166–75. doi:10.1016/j.mce.2016.06.027.
- Vandewalle, C., F. Van Roy, and G. Berx. 2009. “The Role of the ZEB Family of Transcription Factors in Development and Disease.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (5): 773–87. doi:10.1007/s00018-008-8465-8.
- Verhaak, Roel G W, Katherine A Hoadley, Elizabeth Purdom, Victoria Wang, Yuan Qi, Matthew D Wilkerson, C Ryan Miller, et al. 2010. “Article Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized.” *Cancer Cell* 17 (1). Elsevier Ltd: 98–110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- Voulgari, Angeliki, and Alexander Pintzas. 2009. “Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis: Mechanisms, Markers and Strategies to Overcome Drug Resistance in the Clinic.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1796 (2). Elsevier B.V.: 75–90. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.002.
- Voutsadakis, Ioannis A. 2016. “Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of

- EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation.” *Journal of Clinical Medicine* 5 (1): 11. doi:10.3390/jcm5010011.
- Wagner, Brandee L., John D. Norris, Trina A. Knotts, Nancy L. Weigel, and Donald P. McDonnell. 1998. “The Nuclear Corepressors NCoR and SMRT Are Key Regulators of Both Ligand- and 8-Bromo-Cyclic AMP-Dependent Transcriptional Activity of the Human Progesterone Receptor.” *Molecular and Cellular Biology* 18 (3): 1369–78. doi:10.1128/MCB.18.3.1369.
- Wardell, Suzanne E., Ramesh Narayanan, Nancy L. Weigel, and Dean P. Edwards. 2010. “Partial Agonist Activity of the Progesterone Receptor Antagonist RU486 Mediated by an Amino-Terminal Domain Coactivator and Phosphorylation of Serine⁴⁰⁰.” *Molecular Endocrinology* 24 (2): 335–45. doi:10.1210/me.2008-0081.
- Wardell, Suzanne E, and Dean P Edwards. 2005. “Mechanisms Controlling Agonist and Antagonist Potential of Selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs).” *Seminars in Reproductive Medicine* 23 (1): 9–21. doi:10.1055/s-2005-864030.
- Weathers, Shiao-Pei, and Mark R Gilbert. 2014. “Advances in Treating Glioblastoma.” *F1000prime Reports* 6 (June): 46. doi:10.12703/P6-46.
- Weller, Michael, Wolfgang Wick, Ken Aldape, Michael Brada, Mitchell Berger, Stefan M. Pfister, Ryo Nishikawa, et al. 2015. “Glioma.” *Nature Reviews Disease Primers*, no. July (July): 15017. doi:10.1038/nrdp.2015.17.
- Wingender, Edgar. 2008. “The TRANSFAC Project as an Example of Framework Technology That Supports the Analysis of Genomic Regulation.” *Briefings in Bioinformatics* 9 (4): 326–32. doi:10.1093/bib/bbn016.
- Yin, Ping, Damian Roqueiro, Lei Huang, Jonas K. Owen, Anna Xie, Antonia Navarro, Diana Monsivais, et al. 2012. “Genome-Wide Progesterone Receptor Binding: Cell Type-Specific and Shared Mechanisms in T47D Breast Cancer Cells and Primary Leiomyoma Cells.” *PLoS ONE* 7 (1). doi:10.1371/journal.pone.0029021.
- Young, Richard M, Aria Jamshidi, Gregory Davis, and Jonathan H Sherman. 2015. “Current Trends in the Surgical Management and Treatment of Adult Glioblastoma.” *Annals of Translational Medicine* 3 (9): 121. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10.
- Zhang, L., W. Zhang, Y. Li, A. Alvarez, Z. Li, Y. Wang, L. Song, et al. 2016. “SHP-2-Upregulated ZEB1 Is Important for PDGFR α -Driven Glioma Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion in Mice and Humans.” *Oncogene* 35 (43): 5641–52.

doi:10.1038/onc.2016.100.

Zhang, Peijing, Yutong Sun, and Li Ma. 2015. "ZEB1: At the Crossroads of Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis and Therapy Resistance." *Cell Cycle* 14 (4): 481–87. doi:10.1080/15384101.2015.1006048.

Zhang, Quan, Tingcai Cheng, Shengkai Jin, Youbing Guo, Yuqian Wu, Duolian Liu, Xiaomin Xu, et al. 2017. "Genome-Wide Open Chromatin Regions and Their Effects on the Regulation of Silk Protein Genes in *Bombyx Mori*." *Scientific Reports* 7 (1). Springer US: 12919. doi:10.1038/s41598-017-13186-6.

Zhou, Zhicheng, Peijing Zhang, Xiaoyu Hu, Jongchan Kim, Fan Yao, Zhenna Xiao, Liyong Zeng, Liang Chang, Yutong Sun, and Li Ma. 2017. "USP51 Promotes Deubiquitination and Stabilization of ZEB1." *American Journal of Cancer Research* 7 (10): 2020–31.

Zhu, Y., J. Bond, and P. Thomas. 2003. "Identification, Classification, and Partial Characterization of Genes in Humans and Other Vertebrates Homologous to a Fish Membrane Progesterin Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (5): 2237–42. doi:10.1073/pnas.0436133100.

13 Anexos

I. Características de los oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR.

Tabla1. Propiedades de los oligonucleótidos diseñados.

Gen	Secuencia	Longitud (nc)	Tamaño del amplificado (pb)	TF (°C)	%GC
ZEB1	Fw: 5'-GGGAGGATGACACAGGAAAGG-3'	21	194	60.07	57.14
	Rv: 5'-GTCCTCTTCAGGTGCCTCAG-3'	20		59.75	60
18S	Fw: 5'-AGTGAAACTGCGAATGGCTC-3'	20	167	64.3	50
	Rv: 5'-CTGACCGGGTTGGTTTTGAT-3'	20		65.9	50

Fw (*forward*): oligonucleótido sentido; Rv (*reverse*): oligonucleótido antisentido; nc: nucleótidos; pb: pares de bases; TF: temperatura de fusión; CG: citosina-guanina.

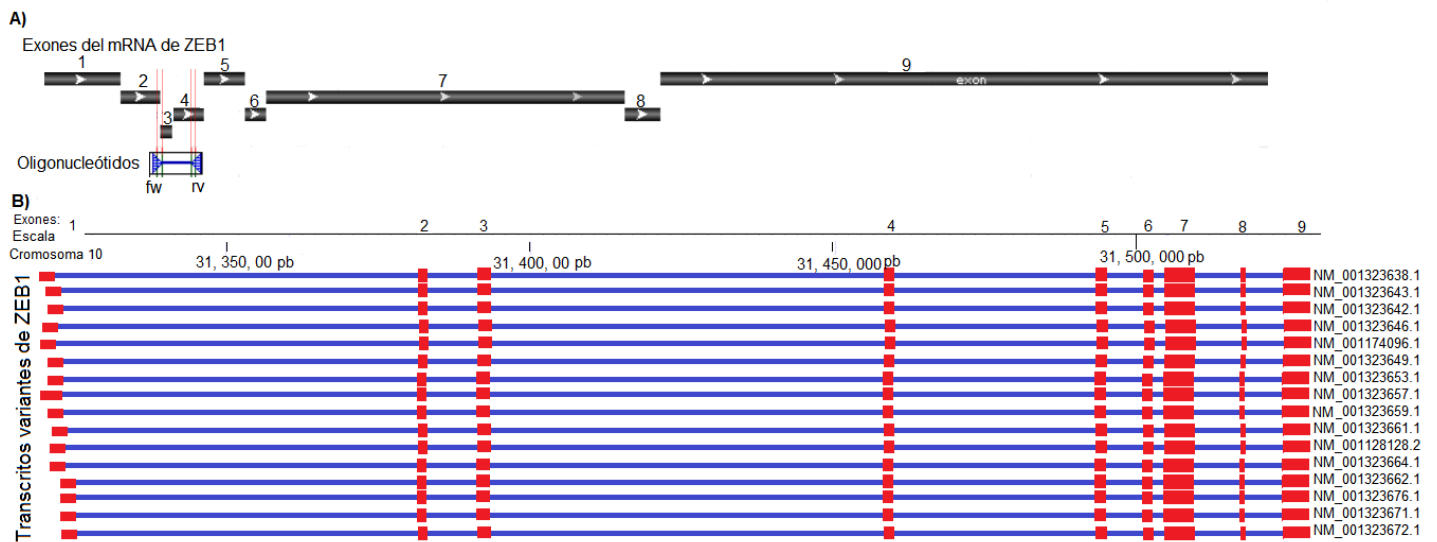


Figura-Anexo 1. Localización de los oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento del mRNA de ZEB1. A) Representación esquemática de los sitios que reconocen los oligonucleótidos diseñados en los exones que conforman al mRNA de ZEB1. El amplificado mide 194 pb de longitud e incluye a los exones 2, 3 y 4. B) Transcritos variantes de ZEB1 que contienen los exones que son reconocidos por los oligonucleótidos diseñados. Las cajas de color rojo corresponden a los exones y las líneas horizontales de color azul a los intrones.

II. ERPs localizados en la región reguladora de la transcripción de ZEB1.

El receptor de andrógenos (RA), el de mineralocorticoides (RM o NR3C2), el de glucocorticoides (RG o NR3C1) y el RP se unen a los elementos de respuesta a hormonas esteroides que contienen la secuencia consenso común G•ACA• • •TGT•C (Lieberman et al. 1993). La afinidad de la unión de cada receptor depende de varios factores como lo son los nucleótidos situados alrededor de la secuencia consenso, la estructura tridimensional de la cromatina dependiente de tejido y del contexto genómico, así como del diferencial reclutamientos de otros factores de transcripción, coactivadores y proteínas remodeladoras de la cromatina. En particular, el RP presenta una mayor afinidad al sitio de unión GGT/AACA• • •TGTTCT, sin embargo, esta secuencia también puede ser reconocida por el RA, RM y RG con una menor afinidad (Grimm, Hartig, and Edwards 2016).

Actualmente, los sitios de unión a factores de transcripción (*Transcription Factor-binding sites*, TFBS) han sido identificados *in vivo* por métodos como la inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a la secuenciación (ChIP-seq), o *in vitro*, por métodos basados en la unión de grandes conjuntos de fragmentos de DNA, como la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, SELEX) o microarreglos de unión a proteínas (PBM). El análisis de estos TFBS puede proporcionar modelos computacionales representados como matrices de frecuencia de posición de nucleótidos (MFP) que permiten predecir las preferencias de unión de los factores de transcripción sobre diversas secuencias de DNA. Una MPF resume la frecuencia de unión de una secuencia de DNA experimentalmente determinada a un factor de transcripción dado, contando el número de ocurrencias de cada nucleótido en cada posición dentro del TFBS alineado. Las MPF se pueden convertir en matrices de puntuación de posición específica (MPPE), que son modelos probabilísticos que se pueden usar para predecir TFBS en secuencias de ADN *in silico* (Khan et al. 2018). Para buscar ERPs en la región reguladora de la transcripción de ZEB1, se utilizaron las MPPE para la secuencia GGT/AACA• • •TGTTCT que se encuentran disponibles en las bases de datos de Jaspar, Transfact, Genome Browser (UCSC) y en la herramienta MatInspector de Genomatix. En la **Tabla 2** se describen los ERPs encontrados con las MPPE de cada una de las bases de datos utilizadas con su respectiva puntuación.

Tabla 2. Características de los ERPs localizados en la región reguladora de la transcripción de ZEB1.

ERP ^a	Posición genómica (pb) ^b	Herramienta ^c	Secuencia
1	31,316,872-31,316,889	JASPAR	GAAG GCAGATTATGTAC CTTAC
		TRANSFACT	
		UCSC	
2	31,317,460-31,317,474	JASPAR	AGGACTGCCTGTACT
		TRANSFACT	
		UCSC	
3	31,329,131-31,329,157	JASPAR	ACATTAT CTTGT AAT AAAGG TAGTAG
		TRANSFACT	
4	31,329,853-31,329,867	JASPAR	TGACTGTCTGTTCA
		TRANSFACT	

- a. Orden consecutivo de la posición de cada ERP localizado sobre el cromosoma 10 en dirección 5'-----3'
- b. Localización de los pares de bases(pb) en donde se encuentra el ERP en dirección 5'-----3'
- c. Herramienta bioinformática en donde se encontró el ERP
- d. Secuencia de nucleótidos que conforma el ERP

ERP ^a	Posición genómica (pb) ^b	Herramienta ^c	Secuencia ^d
5	31,330,374-31,330, 389	JASPAR	GGTCTTCATGTCCTT
		TRANSFACT	
6	31,333,053-31,333,069	JASPAR	GGGGGAACATCATCTTCCT
		TRANSFACT	
		UCSC	
7	31,334,196-31,334,213	JASPAR	ATGGAACATTGTATTCCA
		TRANSFACT	
		UCSC	
8	31,337,156-31,337, 173	JASPAR	AGGAAAATAATGTTGAA
		TRANSFACT	
9	31,339,986-31,340,012	TRANSFACT	GTGTCCTCTTGTTTAATATGGGACCA
		UCSC	
10	31,345,412-31,345,430	JASPAR	AAAATTCATTTTGTTCGTG
		TRANSFACT	

- a. Orden consecutivo de la posición de cada ERP localizado sobre el cromosoma 10 en dirección 5'-----3'
- b. Localización de los pares de bases en donde se encuentra el ERP en dirección 5'-----3'
- c. Herramienta bioinformática en donde se encontró el ERP
- d. Secuencia de nucleótidos que conforma el ERP

ERP ^a	Posición genómica (pb) ^b	Herramienta ^c	Secuencia ^d
11	31,353,491-31,353,505	JASPAR	CTACATTCTGTTCTA
		TRANSFACT	
12	31,354,923-31,354,937	TRANSFACT	ACTTGTCTTCCATTT
		GENOMATIX	
13	31,355,089-31,355,104	TRANSFACT	TGAAAAAATGTGCTT
		GENOMATIX	

- a. Orden consecutivo de la posición de cada ERP localizado sobre el cromosoma 10 en dirección 5'-----3'
- b. Localización de los pares de bases en donde se encuentra el ERP en dirección 5'-----3'
- c. Herramienta bioinformática en donde se encontró el ERP
- d. Secuencia de nucleótidos que conforma el ERP