



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EL PAPEL DEL ESTRADIOL EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LA  
TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE  
GLIOBLASTOMAS HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

**Ana María Hernández Vega**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez

[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ](#)

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Agosto, 2020**



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.

**Hernández Vega Ana María**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 09 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**El papel del estradiol en la expresión de marcadores de la transición epitelio-mesénquima en líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos**", dirigida por el/la Dr(a). **Camacho Arroyo Ignacio**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Pedraza Chaverri José
VOCAL	Macías Silva Marina
VOCAL	Martínez Martínez Eduardo
VOCAL	Vázquez Martínez Edgar Ricardo
SECRETARIO	Langley McCarron Elizabeth

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de marzo de 2020



**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**COORDINADORA**

## **Agradecimientos**

Esta tesis se realizó 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.

Al comité tutorial formado por la Dra. Aliesha González Arenas, del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y a la Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez, del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por brindar el apoyo académico-administrativo para realizar este trabajo.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM (IN217120) por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.



A los miembros del jurado formado por:

Dr. José Pedraza Chaverri

Dra. Marina Macías Silva

Dr. Eduardo Martínez Martínez

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

Dra. Elizabeth Langley McCarron

# ÍNDICE

<b>Índice de abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 Tumores cerebrales</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 Transición epitelio-mesénquima (EMT) en la progresión tumoral del GBM</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.1 Mecanismos moleculares de la EMT</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 El papel del estradiol (E2) en el CNS y en el GBM</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3.1 Mecanismos de acción del E2</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3.2 Efectos del E2 en el GBM</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.3 Participación del E2 en la regulación de la EMT</b> .....	<b>24</b>
<b>III. Planteamiento del problema</b> .....	<b>26</b>
<b>IV. Hipótesis</b> .....	<b>26</b>
<b>V. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1. Objetivo general</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2. Objetivos particulares</b> .....	<b>27</b>
<b>VI. Estrategia experimental</b> .....	<b>28</b>
<b>6.1. Cultivo celular</b> .....	<b>28</b>
<b>6.2. Análisis de la morfología celular.</b> .....	<b>29</b>
<b>6.3. RT-qPCR</b> .....	<b>31</b>
<b>6.4. Western Blot</b> .....	<b>32</b>
<b>6.5. Inmunofluorescencia</b> .....	<b>33</b>

6.6. Migración celular .....	34
6.7. Invasión celular .....	35
6.8. Análisis estadístico .....	35
<b>VII. Resultados .....</b>	<b>36</b>
7.1. Expresión diferencial de los subtipos ER- $\alpha$ y ER- $\beta$ en las células de GBM humano .....	36
7.2. El tratamiento con E2 induce cambios morfológicos en las células de GBM .....	38
7.3. Reorganización de los filamentos de actina por efecto del E2 .....	41
7.4. El tratamiento con E2 incrementó la expresión de marcadores de la EMT .....	43
7.5. El E2 promueve la migración e invasión en las células de GBM .....	49
7.6. Los efectos del E2 asociados a la EMT son regulados a través del ER- $\alpha$ .....	51
7.7. El E2 y el TGF- $\beta$ inhiben mutuamente sus efectos sobre la expresión de los marcadores de la EMT. ....	54
7.8. El E2 inhibe la vía de señalización del TGF- $\beta$ al disminuir tanto la expresión de Smad2/3 como los niveles de fosforilación de Smad2 .....	56
<b>VIII. Discusión .....</b>	<b>60</b>
<b>IX. Conclusión .....</b>	<b>67</b>
<b>X. Perspectivas .....</b>	<b>68</b>
<b>XI. Referencias. ....</b>	<b>69</b>
<b>XII. Anexos .....</b>	<b>95</b>
12.1. Publicación en revista indizada. ....	95
• <b>Hernández-Vega AM</b> , Del Moral-Morales A, Zámora-Sánchez CJ, Piña-Medina AG, González-Arenas A and Camacho-Arroyo I. <b>Estradiol Induces Epitelial to Mesenchymal Transition of Human Glioblastoma Cells.</b> 2020. Cells 9, x .....	96



# Índice de abreviaturas

**CDH1:** cadherina 1 o E-cadherina

**CDH2:** cadherina 2 o N-cadherina

**CNS:** sistema nervioso central (*central nervous system*)

**CSC:** células troncales cancerosas (*cancer stem cells*)

**C/EBP- $\beta$ :** proteína de unión al potenciador CCAAT beta (*CCAAT/enhancer binding protein beta*)

**DNA:** ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

**DPN:** diarilpropionitrilo (2,3-bis(4-hidroxifenil)-propionitrilo)

**E2:** 17 $\beta$ -estradiol

**ECM:** matriz extracelular (*extracellular matrix*)

**EMT:** transición epitelio-mesénquima (*epithelial-to-mesenchymal transition*)

**EMT-TF:** factores de transcripción inductores de la EMT (*EMT-inducing transcription factors*)

**EEM:** error estándar de la media

**ER:** receptor a estrógenos (*estrogen receptor*)

**ESR1:** receptor a estrógeno 1/ $\alpha$  (*estrogen receptor 1*)

**ESR2:** receptor a estrógeno 2/ $\beta$  (*estrogen receptor 2*)

**GBM:** glioblastoma multiforme

**MPP:** metil-piperidino-pirazol

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PHTPP:** 4- [2-Fenil-5,7-bis (trifluorometil) pirazolo [1,5-a] pirimidin-3-il] fenol

**PI3K:** fosfoinositido 3-cinasas (*phosphoinositide 3-kinases*)

**PPT:** 4,4', 4''-(4-propil-[1H] -pirazol-1,3,5-triil) trisfenol

**RNA:** ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

**RTK:** receptor con actividad de cinasa de tirosinas (*receptor tyrosine kinase*)

**RT-qPCR:** transcripción reversa cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa (*reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*)

**SMAD:** acrónimo de los genes SMA de *Caenorhabditis elegans* (fenotipode gusano "pequeño (*small*)") y MAD de *Drosophila* (madres contra *dpp*).

**SNAI:** proteína de dedos de zinc (*zinc finger protein*)

**STAT3:** transductor de señal y activador de transcripción 3 (*signal transducer and activator of transcription*)

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )

**TJPI:** proteína de unión estrecha (*tight junction protein 1*)

**VIM:** vimentina

**WNT:** acrónimo de int y Wg, que significa "sitio de integración relacionado con Wingless".

**ZEB:** (*zinc finger E-box binding homeobox*)

**ZO-1:** *Zonula Occludens 1*

# Resumen

El fenotipo mesenquimal del glioblastoma multiforme (GBM), el tumor cerebral más frecuente y maligno a nivel mundial, está asociado con el peor pronóstico. La transición epitelio-mesénquima (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) es un mecanismo de plasticidad celular que promueve el fenotipo mesenquimal del GBM. En este estudio, determinamos la EMT inducida por  $17\beta$ -estradiol (E2) mediante cambios en la morfología celular, la expresión de marcadores de la EMT y ensayos de migración e invasión en líneas celulares derivadas de GBM humano. Primero, encontramos que ambos subtipos del receptor a estrógenos (*estrogen receptor*, ER), ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , se expresaron en las células U251, U87, T98G y LN229, y esta expresión fue menor comparada con la de astrocitos humanos sanos. El análisis de la morfología celular evidenció que el tratamiento con E2 (10 nM) modificó la forma y el tamaño de las cuatro líneas celulares, ya que sus parámetros geométricos pasaron de ser característicos de una figura poligonal a tener una figura fusiforme, que corresponden al fenotipo epitelial y mesenquimal, respectivamente. Estos efectos estuvieron relacionados con una reorganización de los filamentos de actina. La expresión de marcadores de la EMT se evaluó por RT-qPCR, Western blot e inmunofluorescencia en las células U251 y U87. El E2 aumentó la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y N-cadherina en ambos tipos celulares. Los ensayos de *herida* y *transwell* revelaron que el E2 incrementó la migración e invasión de las células U251 y U87. Encontramos además que el tratamiento con un agonista selectivo del ER- $\alpha$ , el PPT (10 nM), también aumentó la expresión de marcadores de la EMT y la migración celular. En contraste, el antagonista selectivo del ER- $\alpha$ , MPP (1  $\mu$ M), bloqueó los efectos tanto del E2 como del PPT. Los tratamientos con el agonista DNP y el antagonista PHTPP, selectivos del ER- $\beta$ , no presentaron ningún efecto en la expresión de los marcadores de la EMT. Finalmente, investigamos la relación entre los efectos del E2 y del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (*transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) dentro del contexto de la EMT en las células de GBM. Nuestros resultados revelaron que mientras el TGF- $\beta$  promovió la morfología mesenquimal y aumentó la expresión de los marcadores mesenquimales, el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  bloqueó los efectos de ambos inductores. Este efecto inhibitorio estuvo relacionado con la disminución en los niveles de expresión del ER- $\alpha$  y de los efectores Smad2 y Smad3 de la vía canónica del TGF- $\beta$ , así como con una disminución en los niveles de fosforilación de Smad2. Los resultados descritos sugieren que, en células derivadas de GBM humano, el E2 induce la activación de la EMT a través del ER- $\alpha$ , y la vía de señalización involucrada en esta inducción interactúa con la vía canónica del TGF- $\beta$ . Nuestras observaciones proporcionan una nueva visión de los mecanismos moleculares del E2 sobre la EMT en el contexto del GBM humano.

# I. Introducción

Los tumores malignos del sistema nervioso central (*central nervous system, CNS*) se encuentran entre los tipos de cáncer que tienen el peor pronóstico. El glioblastoma multiforme (GBM) comprende aproximadamente la mitad de todos los tumores cerebrales primarios malignos y causa del 3-4% de todas las muertes relacionadas con el cáncer (Ostrom et al. 2019). La Organización Mundial de la Salud define al GBM como un tumor de grado IV caracterizado por proliferación incontrolada, propensión a la necrosis, angiogénesis, infiltración profunda, resistencia a la apoptosis, inestabilidad genómica y extensa heterogeneidad a nivel celular y molecular (Furnari et al. 2007; Louis et al. 2007). Por medio del análisis de las características moleculares del GBM se ha demostrado una notable heterogeneidad genómica, así como subclases genética y epigenéticamente distintas (Brennan et al. 2013; Patel et al. 2014), por lo que numerosos esquemas de clasificación molecular propusieron agrupar los tumores en categorías clínicamente significativas (Noushmehr et al. 2010; Phillips et al. 2006; Reifenberger et al. 2017; Sturm et al. 2012; Verhaak et al. 2010).

La red del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) identificó cuatro subtipos moleculares de GBM basados en el perfil de expresión de genes característicos de células progenitoras neurales (*proneural*), neuronas (*neural*), células proliferativas con activación del receptor de tirosina cinasa (*clásico*) y tejido mesenquimal (*mesenquimal*) (Verhaak et al. 2010). El fenotipo mesenquimal del GBM presenta las peores tasas de supervivencia en comparación con los otros subtipos y se asocia con un comportamiento altamente invasivo (Behnan et al. 2019; Bhat et al. 2013; Phillips et al. 2006). La transición epitelio-mesénquima (*epithelial-to-mesenchymal transition, EMT*) es un mecanismo de plasticidad celular que regula un conjunto de estados transitorios entre el fenotipo epitelial y el mesenquimal. Durante este proceso celular se modifica la expresión de las proteínas de adhesión intercelular y del citoesqueleto, lo que permite que las células adopten un comportamiento invasivo y migratorio. Las células pueden llevar a cabo la transición entre el estado epitelial y mesenquimal en una manera plástica, y la dinámica depende del tejido y tipo celular. La EMT ocurre en respuesta a factores de señalización pleiotrópicos que inducen la expresión de factores de transcripción inductores de la EMT (*EMT-inducing transcription factors, EMT-TF*). Las principales vías de señalización que están involucradas en la inducción de los EMT-TF en el GBM, son las que implican a los receptores del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (*transforming growth factor beta, TGF- $\beta$* ), WNT, cinasas de tirosina e hipoxia (Lamouille et al. 2014; Nieto 2017; Nieto et al. 2016). Sin embargo, aún se desconocen el efecto de otros factores reguladores que podrían estar relacionados con este programa celular. Por lo tanto, la determinación de la red molecular completa del programa EMT, así como los mecanismos fundamentales necesarios para activarlo, podrían proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento del GBM.



Aunque diferentes investigaciones han descrito varias vías de señalización que inducen la EMT en el GBM, el papel de los diferentes factores dentro del microambiente tumoral, así como las interacciones que coordinan este programa celular, aún no se comprenden en su totalidad.

Los estrógenos son hormonas esteroideas sexuales que participan en muchas funciones cerebrales, como el desarrollo del cerebro durante la diferenciación sexual (McCarthy 2008), la diferenciación de neuronas y células gliales (Denley et al. 2018; Díaz et al. 2007; Varshney et al. 2017; Wang et al. 2003), la regulación del crecimiento de neuritas (Díaz et al. 1992; Toran-allerand 1976) y los patrones sinápticos (Jelks et al. 2007; Ptrez, Naftolin, and Segura 1990). Hay dos subtipos de receptores intracelulares específicos a estrógenos (*estrogen receptors*, ERs), ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , que son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión génica. En el cerebro, los ER están predominantemente presentes en el hipotálamo, la corteza frontal, la amígdala, el hipocampo, el cerebelo, el área tegmental ventral (VTA), así como en los núcleos de rafe del mesencéfalo (Barth, Villringer, and Sacher 2015). La concentración del 17 $\beta$ -estradiol (E2), el estrógeno más potente, así como la expresión y actividad de los ERs, son determinantes en la progresión maligna de los tumores que crecen en los tejidos sensibles a estrógenos (Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004; Kumar et al. 2016; Russo and Russo 2006; Di Zazzo et al. 2018a). El estado de la expresión de los ER en el GBM es controvertido. En algunos estudios se ha demostrado ausencia del ER en tumores de GBM (Carroll et al. 1995; Vaquero et al. 1983), mientras que otros investigadores determinaron que la expresión del ER varía según el grado de malignidad, en donde hay una mayor expresión en tumores de bajo grado comparado con los tumores de alto grado de malignidad, lo que sugiere que estos receptores están involucrados en la progresión maligna del GBM (Batistatou et al. 2004; González-Arenas et al. 2012; Khalid et al. 1995; Sareddy et al. 2012; Wan et al. 2018). Sin embargo, los mecanismos moleculares del E2 relacionados con este último aún no están claros.

Por otro lado, se sabe que la señalización promovida por el E2 está relacionada con la EMT en tejidos sensibles a estrógenos. La pérdida de la expresión del ER- $\alpha$  en el cáncer de mama y endometrial promueve cambios morfológicos, motilidad e invasión, así como una mayor expresión de marcadores de la EMT (Bouris et al. 2015; Dhasarathy et al. 2007; Al Saleh, Al Mulla, and Luqmani 2011; Scherbakov et al. 2012; Wik et al. 2013). Por el contrario, en cáncer de ovario y próstata, el tratamiento con E2 induce la EMT dependiente del ER- $\alpha$ , y el silenciamiento del receptor inhibe la EMT (Mishra et al. 2015; Park et al. 2008; Shi et al. 2017). Estas investigaciones demuestran la importancia del contexto específico y el tipo celular en la EMT inducida por E2. Aunque la señalización del E2 y la malignidad de GBM parecen estar relacionadas, se desconoce la participación de esta hormona en el programa de la EMT en GBM.

## II. Antecedentes

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células que tienen el potencial de invadir y/o propagarse a otras partes del tejido o del cuerpo. Actualmente, el cáncer es considerado la segunda causa de muerte en todo el mundo y, de acuerdo con datos publicados por la OMS fue responsable de un estimado de 9.6 millones de muertes en el año 2018 [*The International Agency for Research on Cancer* (IARC), <http://www.who.int/>].

El cáncer surge de la transformación de células normales en células cancerosas durante un proceso de múltiples etapas, el cual generalmente progresa a partir de una lesión precancerosa hacia la formación de un tumor maligno. La anomalía fundamental que resulta en el desarrollo de un tumor es la proliferación continua y no regulada de las células, ya que durante este proceso, las células cancerosas adquieren ciertas capacidades biológicas; como 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 and Weinberg 2011).

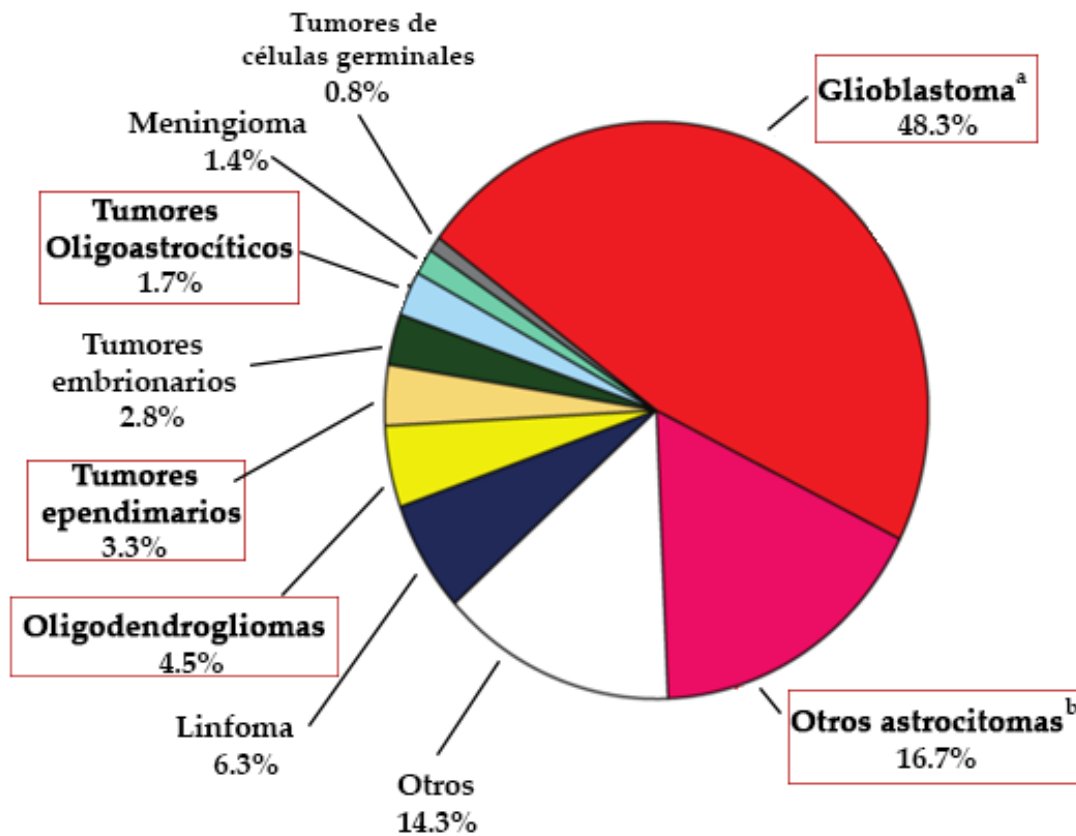
El cáncer puede resultar de cualquiera de las diferentes células que componen el cuerpo, por lo que existen distintos tipos que pueden variar sustancialmente en su comportamiento y respuesta a la terapia. En particular, los tumores que crecen dentro del CNS pueden interrumpir de manera determinante la función cerebral. Existe una gran variedad de tumores cerebrales que crecen a partir de diferentes células y, dependiendo del tipo celular y del lugar en donde el tumor está localizado, este podría afectar distintas funciones del CNS (DeAngelis 2001).

## 2.1 TUMORES CEREBRALES

Comparado con otro tipo de tumores, los tumores cerebrales no son tan frecuentes; no obstante, representan una significativa causa de mortalidad y morbilidad por cáncer (Patel et al. 2019). Según los casos registrados durante el periodo comprendido entre el 2012-2016, la incidencia de los tumores cerebrales fue de 6.4 por cada 100,000 individuos por año. Asimismo, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que los tumores cerebrales malignos son más comunes en hombres que en mujeres, con una proporción aproximada de 3:2 (Base de datos de supervivencia, epidemiología y resultados finales, SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results- National Cancer Institute*, 2018, <https://seer.cancer.gov/>).

Los tumores cerebrales primarios son un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan a partir de las células que componen al CNS y pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos crecen lentamente, no invaden el tejido circundante y con frecuencia tienen un borde que se puede ver en las tomografías computarizadas; por lo que la mayoría se puede tratar con resección quirúrgica. Los tumores cerebrales benignos representan el 69.8% de todos los tumores cerebrales primarios, mientras que los malignos corresponden al resto. Los tumores cerebrales malignos contienen células cancerosas que crecen rápidamente, invaden el tejido cerebral circundante y no presentan bordes definidos. Debido a la rápida infiltración de las células cancerosas a través del tejido, la extirpación quirúrgica completa de los tumores malignos es muy complicada, por lo que, a pesar de que requieren de un tratamiento conjunto de radio y/o quimioterapia, la supervivencia global a 5 años no es superior al 35.8% (Lapointe et al. 2018; Ostrom et al. 2019). Los gliomas son tumores con características de células gliales y representan aproximadamente el 80.8% de todos los tumores cerebrales malignos, además, son los responsables de la mayoría de las muertes por cáncer cerebral (**Figura 1**).

La Organización Mundial de la Salud clasifica a los gliomas en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas, con base en las similitudes morfológicas que tienen con las células del tejido cerebral sano (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias, respectivamente). Los astrocitomas son los gliomas más frecuentes y su grado de malignidad está determinado por características histopatológicas, como el grado de proliferación, la infiltración, las características de anaplasia y la presencia de zonas de necrosis (Perry and Wesseling 2016). Actualmente, además de las características histopatológicas, la clasificación de los astrocitomas se complementa con la identificación de marcadores genéticos y moleculares (Louis et al. 2016; Mur et al. 2015; Reifenberger et al. 2017; Wang and Bettgowda 2015).



**Figura 1. Frecuencia relativa de los tumores cerebrales primarios malignos.** Los gliomas representan la mayoría de todos los tumores cerebrales malignos. La figura muestra el informe estadístico del CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*) que clasifica los tumores malignos del CNS por grupos histológicos (n=119 674). Los tumores que se clasifican como gliomas se encuentran dentro de un recuadro de color rojo. <sup>a</sup>El astrocitoma de grado IV o Glioblastoma Multiforme (GBM) representa casi la mitad de todos los tumores cerebrales malignos. <sup>b</sup>Incluye al astrocitoma pilocítico, difuso, anaplásico y variantes únicas de astrocitomas. Los datos fueron obtenidos de la base de datos del SEER -*Surveillance, Epidemiology and End Results*-, periodo 2011-2015. Modificado de Ostrom et al. (2019).

En la **Figura 2** se presentan las principales características de los cuatro grados de malignidad de los astrocitomas. Mientras que los astrocitomas de grado I y II son tumores que presentan un mejor pronóstico y mayor supervivencia para los pacientes, los tumores de grado III y IV son más agresivos y prácticamente incurables, por lo que también son denominados astrocitomas de alto grado de malignidad (Perkins and Liu 2016).

Astrocitoma (grado de malignidad)	Pilocítico (Grado I)	Difuso (Grado II)	Anaplásico (Grado III)	GBM (Grado IV)
Histopatología del tumor	Actividad mitótica baja, crecimiento lento y bordes definidos (circunscrito).	Actividad mitótica baja, atipia nuclear, bordes poco definidos y células multinucleadas.	Actividad mitótica alta, atipia nuclear, anaplasia y lesiones difusamente infiltrantes	Actividad mitótica alta, atipia nuclear, anaplasia, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis.
Localización preferente	Quiasma óptico, hipotálamo, cerebelo y tálamo.	Lóbulo frontal y temporal, tallo cerebral y médula espinal	Hemisferios cerebrales	Materia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales
Edad media de diagnóstico	13 años	48 años	49 años	64 años
Supervivencia a dos años	96.6 %	61.1%	43.3%	14.8 %
Anomalías moleculares más comunes	Activación de MAPK por: -Mutación NF1 o, -Duplicación, fusión oncogénica y mutaciones en BRAF.	-Mutación IDH1/IDH2 -Mutación TP53 -Mutación ATRX	-Mutación IDH1/IDH2 -Mutación TP53 -Mutación ATRX	-Amplificación EGFR -Genotipo +7q/-10q -Mutación PTEN -Expresión EGFRvIII
* Tratamiento estándar	Quimioterapia basada en carboplatino o vincristina (sólo si la resección quirúrgica no es completa).	Radioterapia o quimioterapia con algún agente alquilante	Radioterapia y/o quimioterapia con algún agente alquilante	Radioterapia más concomitante quimioterapia con temozolamida

**Figura 2. Clasificación y características principales de los astrocitomas.** Los astrocitomas se clasifican en cuatro grados de malignidad con base en sus características histopatológicas. Se observa que la edad media de diagnóstico de los astrocitomas en general incrementa con el grado de malignidad. Asimismo, la supervivencia a dos años disminuye drásticamente conforme aumenta la malignidad. Los estudios genómicos a gran escala han determinado los marcadores moleculares que posee cada uno de los subtipos de astrocitomas, los cuales son diferentes en cada grado. Observar que los astrocitomas de grado II y III se encuentran estrechamente relacionados. Las estrategias terapéuticas para el tratamiento de cada paciente están determinadas por diversas variables, como la localización del tumor, el diagnóstico histopatológico, la presencia/ausencia de marcadores moleculares, entre otros. Sin embargo, se observa que en general, la complejidad del tratamiento aumenta en relación con la malignidad del tumor. \*Después de la resección quirúrgica. Abreviaturas. ATRX: *α-thalassemia/mental retardation síndrome X-linked*; BRAF: *B-raf*; EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*; IDH: *Isocitrate dehydrogenase*; MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*; NF1: *neurofibromatosis type 1*; PTEN: *phosphatase and tensin homolog*; TP53: *Tumor protein p53*.

### 2.1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

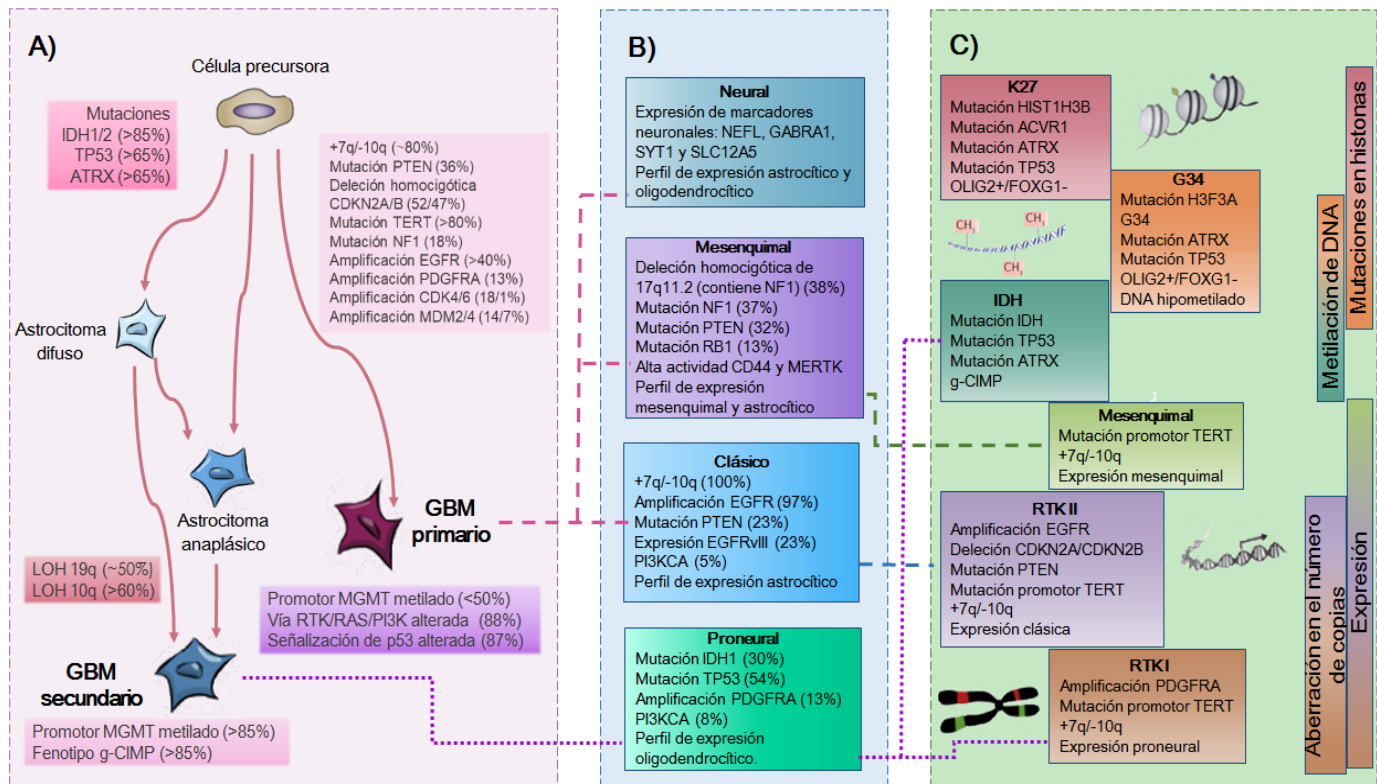
El GBM es un tumor intracraneal altamente agresivo que representa el 48.3% de todos los tumores cerebrales primarios malignos (Ostrom et al. 2019). Se caracteriza principalmente por tener una infiltración profunda a través del parénquima cerebral, proliferación descontrolada, propensión a la necrosis, angiogénesis, resistencia a la apoptosis, inestabilidad genómica y una extensa heterogeneidad a nivel celular y molecular (Furnari et al. 2007; Stoyanov et al. 2018; Urbańska et al. 2014).

El GBM puede surgir a partir de células troncales neurales (*Neural Stem Cells*, NSC) y/o progenitores neurales (*Neural Precursor Cells*, NPC) que se transforman en células troncales cancerosas (*Cancer Stem Cells*, CSC) (Lee et al. 2018; Llaguno et al. 2009; Riddick et al. 2017); así como a través de una dediferenciación oncogénica de neuronas y/o astrocitos (Friedmann et al. 2012; Schmid et al. 2016). El término *multiforme* deriva de las primeras descripciones histopatológicas acerca de las variadas características morfológicas y la presencia de poblaciones celulares heterogéneas dentro del tumor.

Los avances en los análisis a gran escala de las características moleculares del GBM han demostrado una notable heterogeneidad genómica, así como la existencia de subclases que son genética y epigenéticamente distintas. Debido a esto y con el fin de guiar el tratamiento, se han propuesto numerosos esquemas de clasificación molecular para agrupar a los tumores en categorías clínicamente significativas (**Figura 3**) (Noushmehr et al. 2010; Phillips et al. 2006; Reifenberger et al. 2017; Sturm et al. 2012; Verhaak et al. 2010).

De manera general, se reconocen dos tipos de GBM de acuerdo con sus alteraciones genéticas (**Figura 3A**). El caso menos común, que representa menos del 10% de todos los GBM, es el GBM secundario, el cual puede originarse por la progresión maligna de astrocitomas de grado II y III. En cambio, el GBM primario es más común, ya que representan más del 90% de todos los GBM y se desarrollan de *novo* con una historia clínica corta. Los GBM primarios y secundarios son entidades tumorales con alteraciones genéticas distintas y requieren diferentes enfoques terapéuticos (Ohgaki and Kleihues 2013). Posterior a esta clasificación, el análisis de la integración de datos genómicos multidimensionales definió cuatro subtipos moleculares de GBM basados en el perfil de expresión de genes característicos de células progenitoras neurales (*proneural*), neuronas (*neural*), células proliferativas con activación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (*clásico*) y tejido mesenquimal (*mesenquimal*) (Verhaak et al. 2010) (**Figura 3B**). Estos datos han proporcionado un marco para la investigación de terapias dirigidas; no obstante, se ha demostrado que su utilidad clínica es limitada, ya que estos subtipos pueden ser heterogéneos dentro de un mismo tumor y pueden cambiar en respuesta a estímulos externos, incluida la terapia (Bhat et al. 2013; Patel et al. 2014; Wang et al.

2018). Sin embargo, el subtipo mesenquimal se ha relacionado con resistencia a la radioterapia y supervivencia desfavorable (Phillips et al. 2006), mientras que los subtipos clásico y proneural se han asociado con una mejor respuesta al tratamiento (Olar and Aldape 2014; Sandmann et al. 2015; Verhaak et al. 2010). Asimismo, en otro estudio, se determinaron seis subgrupos de GBM considerando tanto patrones epigenéticos como perfiles de expresión (Sturm et al. 2012, 2014) (**Figura 3C**).



**Figura 3. Sistema de clasificación molecular del GBM.** A) Clasificación basada en las alteraciones genéticas que conducen la tumorigénesis. El GBM puede surgir de *novo*, o a través de la progresión de lesiones de bajo grado. Cada vía conlleva alteraciones genéticas distintas. B) Clasificación basada en el perfil de expresión, que integra los patrones de mutación somática y número de copias del DNA. C) Subgrupos epigenéticos de GBM que presentan patrones característicos de metilación global en el DNA, distintas mutaciones, alteraciones del número de copias y patrones transcriptómicos. Las líneas discontinuas entre los subgrupos de las tres clasificaciones indican que existe relación entre ellos. Los porcentajes se refieren a la frecuencia de cada una de las características moleculares en el total de cada grupo analizado (McLendon et al. 2008; Sturm et al. 2012; Verhaak et al. 2010). Abreviaturas. *ACVR1*: activin A receptor type 1; *ATRX*: thalassemia/mental retardation syndrome X-linked; *CD44*: cluster of differentiation 44; *CDK4/6*: cyclin-dependent kinase 4/6; *CDKN2A/B*: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B; DNA: deoxyribonucleic acid; *EGFR*: epidermal growth factor receptor; *FOXG1*: forkhead box G1; *GABRA1*: gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha 1; *g-CIMP*: glioma CpG island methylator phenotype; *HIST1H3B*: histone H3.1; *IDH*: isocitrate dehydrogenase; *LOH*: loss of heterozygosity; *MDM2/4*: mouse double minute 2/4 homolog; *MERTK*: MER proto-oncogene tyrosine kinase; *MGMT*: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase; *NEFL*: neurofilament light; *NF1*: neurofibromin 1; *OLIG2*: oligodendrocyte transcription factor 2; *PDGFRA*: platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ ; *PI3K*: phosphoinositide 3-kinases; *PI3KCA*: phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha; *PTEN*: phosphatase and tensin homologue; *RAS*: rat sarcoma viral oncogene; *RB1*: retinoblastoma 1; *RTK*: receptor tyrosine kinase; *SLC12A5*: solute carrier family 12 member 5; *SYT1*: synaptotagmin 1; *TERT*: telomerase reverse transcriptase; *TP53*: tumor protein p53.



Los avances tecnológicos que permiten determinar el perfil molecular han favorecido la caracterización genética y epigenética del GBM, y con ello, se han identificado biomarcadores que pueden mejorar la precisión del diagnóstico y el tratamiento individualizado. Hasta ahora, los pacientes diagnosticados con GBM reciben el tratamiento estándar: resección quirúrgica máxima más radioterapia y quimioterapia con temozolamida en pacientes menores de 70 años. Sin embargo, usando este tratamiento, generalmente la esperanza de vida no es mayor de 12-15 meses una vez que se diagnostica el tumor (Stupp et al. 2005). Actualmente, el desarrollo y la validación clínica de nuevos compuestos que se dirigen específicamente hacia blancos moleculares relacionados con los genes y vías de señalización alteradas en el GBM, así como la inmunoterapia individualizada adaptada a las características de cada tumor, se encuentran en proceso de investigación (Duerinck et al. 2018; Gan et al. 2017; Geletneky et al. 2017; Hamblett et al. 2015; Liau et al. 2018; Lim et al. 2018; Saha et al. 2018; Thanasupawat et al. 2017; Wenger et al. 2017). No obstante, aún existen muchas incógnitas acerca de las células y vías moleculares que originan las variadas formas del GBM; su comportamiento e interacciones dentro del microambiente del tumor; los mecanismos de plasticidad que dan origen a diferentes fenotipos celulares; entre otros mecanismos patológicos que hacen del GBM, una de las neoplasias malignas más letales y difíciles de tratar.

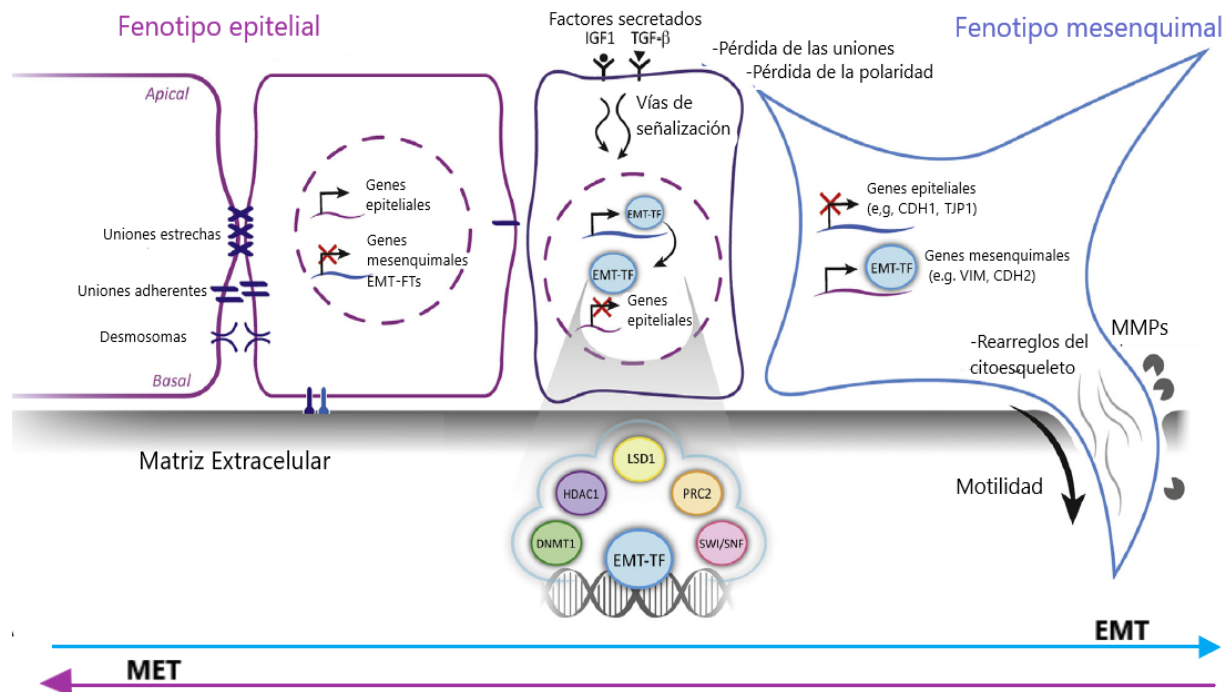


## 2.2 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT) EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DEL GBM

Una característica responsable de la alta malignidad del GBM, es la capacidad que tienen las células tumorales para infiltrarse de manera difusa en el tejido nervioso y extenderse más allá de los bordes visibles del tumor. Los tratamientos actuales no eliminan estas células invasivas, las cuales invariablemente conducen a la recurrencia del tumor y al fracaso de la terapia a largo plazo (Vehlow and Cordes 2013; Arabel et al. 2020).

Durante el proceso invasivo, las células del GBM pueden remodelar su entorno por medio de la degradación de la matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) neural, una compleja mezcla de lamininas, tenascinas, condroitin-sulfato proteoglicanos y reelinas (Barros et al. 2010), con la posterior producción de una nueva ECM que contiene componentes mesenquimales, como fibronectina, metaloproteinasas y colágenos fibrilares (Payne and Huang 2013; Tzanakakis et al. 2018). Las señales estructurales de la ECM y los factores solubles de las células no neoplásicas circundantes regulan los mecanismos de invasión, que incluyen la remodelación de matriz, la reorganización del citoesqueleto y las transiciones del fenotipo celular (Cuddapah et al. 2014). Hasta ahora, un creciente cuerpo de evidencia apoya la hipótesis de que la transición EMT desempeña un papel crucial en el fenotipo invasivo del GBM (Bhat et al. 2013; Carro et al. 2010; Cheng et al. 2012; Freije et al. 2004; Iser et al. 2017; Kahlert et al. 2013; Kubelt et al. 2015; Tso 2006).

La EMT es un mecanismo de plasticidad celular que regula un conjunto de estados transitorios entre el fenotipo epitelial y el mesenquimal. Durante este proceso, las células epiteliales pierden sus uniones con otras células y la polaridad apico-basal, al mismo tiempo que adquieren un fenotipo mesenquimal con capacidades migratorias e invasivas (**Figura 4**). La EMT es un mecanismo plástico, transitorio y muy dinámico, inducido por diversos estímulos, y orquestado por factores de transcripción inductores de la EMT (*EMT-inducing transcription factors*, EMT-TFs), quienes actúan en una estrecha asociación con la maquinaria epigenética reprimiendo la transcripción de genes epiteliales y activando genes mesenquimales. Los cambios que ocurren durante la EMT en el fenotipo celular involucran la remodelación de las uniones (adherentes, estrechas y desmosomas) y la reorganización dinámica del citoesqueleto. El proceso inverso se denomina transición mesénquima-epitelio (*mesenchymal-epithelial transition*, MET), y se asocia con una pérdida de la capacidad migratoria, la adquisición de la polaridad apico-basal y la expresión de los complejos de unión característicos de los tejidos epiteliales. Este proceso de diferenciación se denomina *transición*, ya que la plasticidad de este mecanismo es responsable de generar diversos estados transitorios reversibles del fenotipo celular (Lamouille et al. 2014; Nieto 2017; Nieto et al. 2016; Skrypek et al. 2017).



**Figura 4. Eventos celulares y moleculares que ocurren durante la transición epitelio-mesénquima (EMT).** El fenotipo epitelial está caracterizado por células que tienen una polarización apical-basal con uniones intercelulares estructuradas. En cambio, el fenotipo mesenquimal carece de polaridad, tienen una morfología fusiforme alargada y una fuerte capacidad migratoria. Durante la EMT, diversas vías de señalización pueden activar a los EMT-TF, quienes en asociación con componentes de la maquinaria epigenética (HDACs, DNMTs, LSD1; PRC2 y SWI/SNF), llevan a cabo la represión de genes que determinan el fenotipo epitelial, como *CDH1* (cadherina-1 o E-cadherina) o *TJP1* (tight junction protein 1 o zonula ocludens/ZO-1), que son componentes de las uniones adherentes y estrechas, respectivamente. A su vez, los EMT-TF también dirigen la activación de genes que codifican para proteínas que determinan el fenotipo mesenquimal, como *VIM* (vimentina), componente de los filamentos intermedios tipo III; *CDH2* (cadherina-2 o N-cadherina), componente de uniones celulares adherentes que proporciona mecanismos para la migración celular; o metaloproteinasas (*MMPs*), que pueden degradar los componentes de la matriz extracelular (ECM). La EMT es un proceso reversible, la MET representa el proceso inverso. Abreviaturas. DNMT: *DNA methyltransferase*; EMT: *epithelial-to-mesenchymal transition*; HDAC: *histone deacetylase*; IGF1: *insulin-like growth factor 1*; LSD1: *lysine-specific histone demethylase 1A*; MET: *mesenchymal-to-epithelial transition*; EMT-TF: *EMT-inducing transcription factors*; PRC2: *polycomb repressive complex 2*; SWI/SNF: *switch/sucrose Non-Fermentable*; TGF- $\beta$ : *transforming growth factor  $\beta$* . Modificado de Skrypek et al. (2017).

La EMT es indispensable en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Este mecanismo se ha asociado con la generación de las tres capas germinales en la gastrulación y en la migración de las células durante la morfogénesis del desarrollo embrionario (Lim and Thiery 2012; Trelstad et al. 1967); la regeneración del corazón después de una lesión (Lepilina et al. 2006); la cicatrización de heridas en la piel y en el epitelio (Arnoux et al. 2008), y durante la fibrosis y reparación de órganos (Kim et al. 2006; Stone et al. 2016; Zeisberg et al. 2007). También se ha demostrado que el equilibrio EMT-MET es esencial para la adquisición de propiedades de células troncales (*stem cells, SC*), ya que durante la fase de inicio de la reprogramación de

fibroblastos en células troncales pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSC), se requiere que la MET genere células intermedias con características epiteliales que, bajo la influencia de los *factores de reprogramación de Yamanaka*, se convierten en iPSC (Li et al. 2010; Samavarchi-Tehrani et al. 2010). Estas investigaciones han demostrado que la EMT es un programa esencial que impulsa la plasticidad celular. Por lo tanto, su desregulación se ha vinculado fuertemente con la progresión de muchos tipos de cáncer.

En células tumorales, la activación de los EMT-TFs promueve los mecanismos de migración, invasión, metástasis, supresión de la senescencia, inhibición de la apoptosis, atenuación de la progresión del ciclo celular, resistencia a la radio y quimioterapia, así como el mantenimiento de la plasticidad de células troncales cancerosas (*cancer stem cells*, CSC). De hecho, la identificación de la EMT como un programa regulador crítico del fenotipo de CSC, ofrece una oportunidad para investigar la naturaleza de la heterogeneidad intratumoral, así como un posible mecanismo de la resistencia a la terapia (Brabletz et al. 2018; Craene and Berx 2013; Nieto 2017; Ouyang et al. 2010; Preca et al. 2015; Puisieux et al. 2014; Shibue and Weinberg 2017; Tam and Weinberg 2013; Thiery 2002).

A pesar de que la EMT durante la progresión tumoral fue inicialmente estudiada en tumores de tejido epitelial, la evidencia acumulada sugiere que los EMT-TFs también conducen a una ganancia de las propiedades mesenquimales y promueven la malignidad de los tumores no epiteliales, incluyendo tumores cerebrales, tumores malignos hematopoyéticos y sarcomas (Kahlert et al. 2017). Debido a esto, actualmente la descripción clásica de la EMT como un proceso de cambio entre dos estados alternativos (epitelial y mesenquimal), se ha remplazada por un nuevo concepto de plasticidad celular y estados transitorios, que propone que las células se mueven a través de un espectro de diversas fases intermedias, lo que significa que las células pueden llevar a cabo programas parciales de EMT (T. Brabletz et al. 2018; Nieto et al. 2016).

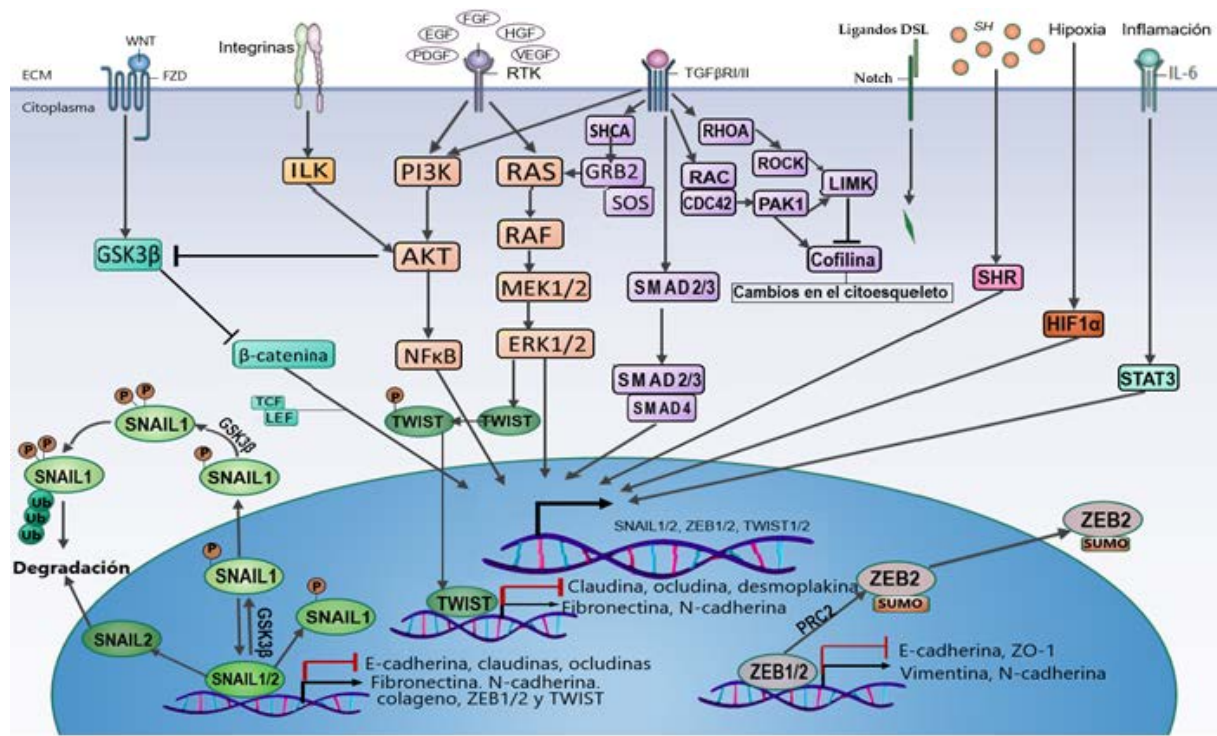
En diversos estudios se ha demostrado la relación que hay entre la EMT y la tumorigénesis del GBM. Un estudio en donde se analizó la expresión a gran escala de 85 tumores de gliomas altamente difusos reveló una serie de genes asociados al tejido mesenquimal que se sobreexpresaban en las biopsias de GBM (Freije et al. 2004). Tso y colaboradores mostraron que un subconjunto de tumores primarios de GBM expresan marcadores celulares y moleculares asociados con células troncales mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSC) (Tso 2006). Más tarde, la definición del subtipo mesenquimal del GBM mostró convincentemente la importancia clínica del programa EMT en el diagnóstico y tratamiento del tumor. El subtipo mesenquimal del GBM se caracteriza por una reducción significativa de la supervivencia debido a su gran motilidad, indicada por la diseminación agresiva, a menudo con presentación multifocal y resistencia contra la quimioterapia y la

radioterapia (Verhaak et al. 2010). Desde estos estudios pioneros, se han realizado numerosos proyectos de investigación basados en esta categorización del GBM; en los cuales se han identificado posibles moléculas clave o vías de señalización subyacentes a la malignidad aumentada del GBM mesenquimal (Kahlert et al. 2013). Aunque en un estudio se identificó a la proteína de unión al potenciador CCAAT beta (CCAAT/*enhancer binding protein beta*, C/EBP- $\beta$ ) y al transductor de señal y activador de transcripción 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) como reguladores maestros de la diferenciación mesenquimal del GBM, aún no se ha definido un blanco terapéutico claro asociado a esta red molecular (Carro et al. 2010). En un análisis del perfil molecular de los 4 subtipos del GBM, se tomaron los datos proporcionados por el TCGA para realizar un estudio comparativo, en el cual se demostró que el subtipo mesenquimal, a diferencia de los otros subtipos, está fuertemente correlacionado con las características moleculares de la EMT (Zarkoob et al. 2013). Estos estudios han mostrado que la determinación de la red molecular completa del programa EMT, así como de los mecanismos clave necesarios para activarlo, podría proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento del GBM.

### 2.2.1 MECANISMOS MOLECULARES DE LA EMT

La EMT es activada por diversas vías de señalización que pueden cooperar entre sí en una manera específica del tipo celular y dependiente del contexto (**Figura 5**). Los principales factores que activan las vías de señalización intracelular que regulan la EMT, incluyen factores de crecimiento solubles, como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), que al unirse a sus receptores T $\beta$ RI/II, activa a los efectores Smad y a las vías conducidas por las proteínas cinasas PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinases*), MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) y por la GTPasa-RHO (Lamouille et al. 2014; Xu et al. 2009). Asimismo, los factores de crecimiento que se unen a receptores con actividad de cinasa de tirosinas (*receptor tyrosine kinases*, RTK) también activan la EMT por medio de las vías de RAS-MEK-ERK (rat sarcoma viral oncogene- *mitogen-activated protein kinase- extracellular signal-regulated kinases*) y PI3K-AKT (*phosphoinositide 3-kinases- protein kinase B*) (Doehn et al. 2009; Lo et al. 2007). Otros factores involucrados en la activación de la EMT son las integrinas (Kim et al. 2009; Maschler et al. 2005), los ligandos que activan a la vía de WNT/ $\beta$ -catenina (*wingless-integration/beta catenin*) (Yook et al. 2006; Zhou et al. 2004); la vía de Notch (Timmerman 2004; Xie et al. 2012); condiciones microambientales de hipoxia (Imai et al. 2003; Yang et al. 2008), citocinas inflamatorias como IL-6 (Sullivan et al. 2009; Yadav et al. 2011) y receptores a hormonas esteroideas (Voutsadakis 2016).





**Figura 5. Mecanismos moleculares que regulan el programa EMT.** Diversas vías de señalización pueden *intercomunicarse* para inducir distintas respuestas durante la EMT. El TGF- $\beta$  induce la EMT al unirse con el T $\beta$ RII, que activa a T $\beta$ RI para fosforilar a los efectores Smad2 y Smad3 que, al combinarse con Smad4, forman un complejo trimérico que se transloca al núcleo y regula la transcripción. El T $\beta$ RI también puede iniciar las vías de PI3K-AKT y RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK), además de regular los cambios del citoesqueleto por medio de la vía GTPasas Rho. Varios factores de crecimiento (como PDGF, EGF, FGF, HGF y VEGF) que actúan a través de RTK pueden inducir la EMT a través de la vía MAPK y PI3K-AKT. La vía canónica WNT promueve la EMT a través de la inhibición de GSK3 $\beta$ , que normalmente inhibe la actividad de  $\beta$ -catenina. Cuando GSK3 $\beta$  es inhibida, la  $\beta$ -catenina se transloca al núcleo y recluta a los factores de transcripción TCF y LEFT. Las integrinas que se encuentran en la superficie celular pueden recibir señales de las proteínas de la ECM y regular la EMT por activación de ILK, que activa la vía de AKT. La interacción de los ligandos DSL (Delta/Serrate/Lag) con los receptores Notch, inicia la señalización a través de la liberación proteolítica del dominio intracelular de Notch que regula la expresión de genes. Las hormonas esteroides (SH) pueden inducir la EMT a través de sus receptores nucleares (SHR), los cuales regulan directamente la expresión de los EMT-FTs. Durante la inflamación, IL-6 promueve la EMT a través de la activación de STAT3, que induce la expresión de SNAIL1. Las condiciones de hipoxia dentro del tumor inducen la EMT a través de HIF $\alpha$ , que activa la expresión de ZEB1 y TWIST. Los EMT-TF coordinan la EMT por medio de la represión de genes epiteliales y la activación de genes mesenquimales. La actividad de los EMT-TF es regulada a nivel postranscripcional (no mostrado) y postraduccional. GSK3 $\beta$  fosforila a SNAIL1 en dos motivos. La fosforilación en un motivo facilita la exportación nuclear, y en el segundo motivo permite la degradación mediada por ubiquitina (Ub). SNAIL2 es degradado por medio de p53 y MDM2. La fosforilación de TWIST por MAPK lo protege de la degradación y promueve su importación al núcleo. ZEB2 puede ser modificado porSUMOilación a través de PRC2, lo que induce su exportación del núcleo y la disminución de su actividad.

Abreviaturas. AKT: *protein kinase B*; CDC42: *cell division control protein 42 homolog*; EGF: *epidermal growth factor*; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; FGF: *epidermal growth factor*; GRB2: *growth factor receptor-bound protein 2*; GSK3 $\beta$ : *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* ; HGF: *hepatocyte growth factor*; HIF-1 $\alpha$ : *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ; ILK: *integrin-linked kinase*; LIMK: *LIM Domain Kinase 1*; MAPK: *mitogen-activated protein kinases*; MEK: *mitogen-activated protein kinase kinase*; NF- $\kappa$ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; PAK1: *p21-activated kinase 1*; PDGF: *Platelet-derived growth factor*; PI3K: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*; PRC2: *polycomb repressive complex 2*; RAC: *ras-related C3 botulinum toxin*; RAF: *rapidly accelerated fibrosarcoma*; RAS: *rat sarcoma viral oncogene*; RHOA: *ras homolog family member A*; ROCK: *rho-associated protein kinase*; RTK: *receptor tyrosine kinase*; SH: *steroid hormone*; SHCA: *Src homology 2 domain containing transforming protein A*; SHR: *steroid hormone receptor*; Smad: *SMA-MAD*; SNAIL1: *zinc finger protein*; SOS: *son of seven less*; STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*; TCF/LEF: *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*; TGF- $\beta$ : *transforming growth factor  $\beta$* ; T $\beta$ RI: *transforming growth factor  $\beta$  receptor*; TWIST: *twist basic helix-loop-helix transcription factor 1*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; ZEB1/2: *zinc finger E-box binding homeobox 1/2*.

La inducción de las vías de señalización anteriormente descritas, conducen a la activación de la expresión de los EMT-TFs y a su regulación por modificaciones postranscripcionales y postraduccionales (Chang et al. 2016; Thiery 2002). Existen tres familias principales de EMT-TFs que desempeñan un papel fundamental en la dinámica de la EMT: *SNAI1/2* (*zinc finger protein*), *ZEB1/2* (*zinc finger E-box binding homeobox 1/2*) y *TWIST1/2* (*twist basic helix-loop-helix transcription factor 1/2*) (Craene and Berx 2013). El perfil de expresión de los EMT-TFs depende del tipo y el contexto celular, por lo tanto, sus contribuciones a la EMT varían en cada tejido. En conjunto, los EMT-TFs coordinan la represión de 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). En el GBM, se ha demostrado que la expresión de las tres familias de EMT-TFs promueven la EMT y los mecanismos invasivos asociados a este programa molecular (Bhat et al. 2011; Chen et al. 2018; Elias et al. 2005; Han et al. 2011; Mahabir et al. 2014; Mikheeva et al. 2010; Myung et al. 2014; Siebzehnruhl et al. 2013; Yang et al. 2010).

La red reguladora de los EMT-TFs es muy compleja y plástica, ya que es influenciada en varios niveles por la integración de la modificación epigenética, el control transcripcional, la estabilidad de RNAs mensajeros (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) y proteínas, el empalme alternativo, la modificación postraducciona, la localización subcelular y la presencia o ausencia de cofactores específicos de cada tipo celular (Lamouille et al. 2014; Nieto et al. 2016; Thiery et al. 2009). La complejidad de la red molecular y las variables en cada sistema celular tiene como resultado la activación de un programa EMT parcial o intermedio, lo que resulta en fenotipos celulares muy diversos, además de que dificulta la identificación de componentes esenciales en el programa (Brabletz et al. 2018).

Diversas vías de señalización pueden promover la EMT en el GBM. En un estudio en donde se llevaron a cabo tratamientos con TGF- $\beta$  en las líneas celulares U87 y U251, ambas derivadas de GBM humanos, las células experimentaron cambios morfológicos, seguidos de una mayor expresión de marcadores mesenquimales y un aumento de la migración e invasión *in vitro* e *in vivo*. Además, la expresión de *ZEB1* aumentó de manera dependiente de TGF $\beta$ , en contraste con otros factores de transcripción, como *SNAI1/2* y *TWIST*, cuya expresión no cambió por el tratamiento (Joseph et al. 2014). La vía de WNT/ $\beta$ -catenina está relacionada con la progresión tumoral del GBM (Liu et al. 2011), y se ha demostrado que su activación aumenta la expresión de marcadores mesenquimales y mejora la motilidad *in vitro* de células derivadas de GBM por activación de *ZEB1/2*, *TWIST1* y *SNAI1/2* (Kahlert et al. 2012; Zhang et al. 2017). Asimismo, los factores de crecimiento de unión a RTK también inducen el programa EMT en el GBM. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF) puede activar la expresión de *ZEB1* a través de SHP2-

ERK1/2 y conducir la EMT en líneas celulares de GBM y CSC de glioma en cultivo celular y en modelos de xenoinjerto ortotópico (Zhang et al. 2016). En células U87 derivadas de un GBM humano, el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) es requerido para activar la vía WNT/ $\beta$ -catenina a través de PI3K e inducir la EMT (X. Wang et al. 2017). Por el contrario, Lu y colaboradores mostraron, en un modelo de líneas celulares de astrocitoma murino transformadas con antígeno T-SV40 y H-ras implantadas ortotópicamente en ratones, que el factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) inhibe la invasión celular y la EMT a través de la formación del complejo MET/VEGFR2 (*mesenchymal epithelial transition factor/ VEGF receptor 2*), ya que bloquea la señalización del factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor*, HGF) y su receptor HGFR (HGF receptor) (Lu et al. 2012).

La hipoxia es una característica típica del GBM (Kaur et al. 2005), y se ha demostrado que es capaz de inducir un fenotipo mesenquimal, capacidad invasiva y migratoria aumentada, así como la sobreexpresión de marcadores mesenquimales, como fibronectina y la cadena de colágeno tipo V alfa 1 (*collagen type V alpha 1 chain*, *COL5A1*) en células U251 y U87, principalmente a través de la activación de *ZEB1* (Joseph et al. 2015; Xu et al. 2015). Por otro lado, se ha observado que la expresión de interleucina 6 (IL-6) correlaciona positivamente con el grado de malignidad de los gliomas, y que la adición exógena de IL-6 en cultivos de células U251 y U87, provoca un incremento de la invasividad (Shan et al. 2015).

Aunque se han descrito varias vías de señalización que inducen la EMT en el GBM, el papel de los diferentes factores dentro del microambiente tumoral, así como las interacciones que coordinan este programa celular, aún no se comprenden en su totalidad. Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas que regulan diversas funciones en el CNS y sus receptores están ampliamente distribuidos a través del tejido nervioso. Altas concentraciones de  $17\beta$ -estradiol (E2) se han detectado en biopsias de GBM (Dueñas Jiménez et al. 2014), así como un cambio en los niveles de expresión de los ERs, comparado con el tejido normal (Batistatou et al. 2004; González-Arenas et al. 2012; Khalid et al. 1995; Sareddy et al. 2012). Por otra parte, en tejidos sensibles a estrógenos, se ha mostrado que el E2 es capaz de inducir la EMT en modelos *in vitro* (Mishra et al. 2015; Park et al. 2008; Shi et al. 2017). Sin embargo, se desconoce si esta hormona participa en el programa de la EMT dentro del contexto del GBM.

## 2.3 EL PAPEL DEL ESTRADIOL (E2) EN EL CNS Y EN EL GBM

Los estrógenos regulan el crecimiento, la diferenciación, la maduración y la función de una amplia gama de tejidos. Los estrógenos son sintetizados en las gónadas y glándulas adrenales, así como en el CNS (Azcoitia et al. 2011; Barakat et al. 2016). Durante el desarrollo del cerebro, se expresan altos niveles de ER que actúan de manera permanente para establecer la diferenciación sexual, ya que regulan los mecanismos de apoptosis que establecen las diferencias sexuales volumétricas en el cerebro (McCarthy 2008); promueven el crecimiento de neuritas (Díaz et al. 1992; Toran-allerand 1976); regulan patrones sinápticos (Jelks et al. 2007; Ptrez et al. 1990), y participan en la diferenciación y migración de neuronas y células gliales (Denley et al. 2018; Díaz et al. 2007; Varshney et al. 2017; Wang et al. 2003). En el cerebro adulto, el E2 actúa como un esteroide neuroactivo que, junto con neurotransmisores como la serotonina, la dopamina, e glutamato y el ácido gamma-aminobutírico (*gamma amino-butyríc acid*, GABA), regula la función de estructuras neuroendocrinas mesencefálicas, diencefálicas, corticales y límbicas (Barth et al. 2015; Sugiyama et al. 2009), lo que influye en los procesos de plasticidad estructural, que son determinantes en la generación de la memoria (Liu et al. 2008), el aprendizaje (Frick et al. 2015), el estado emocional (Sakaki and Mather 2012; Walf and Frye 2006) y los procesos cognitivos (Berman et al. 1997). Los efectos estructurales específicos del E2 en el CNS incluyen el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis y la ramificación dendrítica (Hansberg-Pastor et al. 2015; Haraguchi et al. 2012).

### 2.3.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL E2

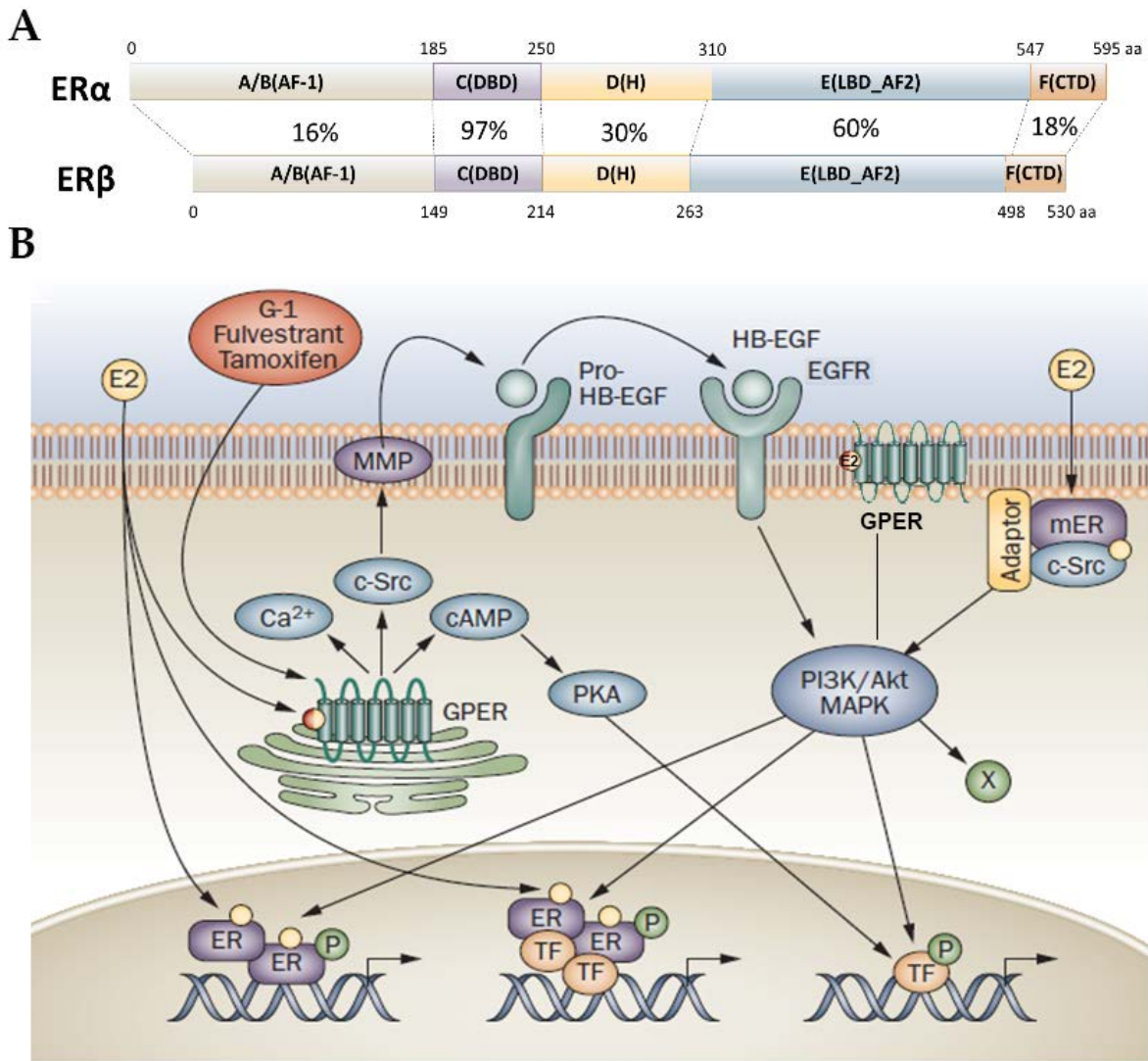
Los estrógenos son una clase de hormonas esteroides que incluyen a la estrona (E1), al  $17\beta$ -estradiol (E2) y al estriol (E3). El E2 es el estrógeno más potente en la circulación y está involucrado en una amplia variedad de funciones, que van desde el desarrollo y el mantenimiento de los órganos reproductivos, hasta la regulación de los sistemas cardiovascular, musculo esquelético, inmune y nervioso (Gruber et al. 2002; Nilsson et al. 2001).

Los efectos de los estrógenos están mediados por varios tipos de receptores. Existen dos subtipos de receptores intracelulares específicos a estrógenos, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , que son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión génica. Estos receptores también se pueden encontrar asociados a la membrana plasmática en donde regulan el estado de fosforilación de múltiples cinasas que controlan la señalización intracelular. En el cerebro, los ERs están predominantemente presentes en el hipotálamo, la corteza frontal, la amígdala, el hipocampo, el cerebelo, el área tegmental ventral (VTA), así como en los



núcleos de rafe del mesencéfalo, aunque cada subtipo presenta patrones de distribución distintos (Barth et al. 2015). La expresión del ER- $\alpha$  predomina en el hipotálamo y la amígdala, lo que indica que este subtipo podría modular las poblaciones de células neuronales involucradas en las funciones neuroendocrinas autónomas y reproductivas, así como en la interpretación y el procesamiento emocional. En contraste, los núcleos hipotalámicos supraquiasmáticos, supraópticos, paraventriculares y el cerebelo, son áreas dominantes del ER- $\beta$ , lo que sugiere un papel en la cognición, la memoria no emocional y las funciones motoras (Handa et al. 2012; Österlund and Hurd 2001). El ER- $\alpha$  y el ER- $\beta$  están codificados por distintos genes, presentan un 47% de identidad y pueden ser expresados en el mismo o en diferentes tejidos en niveles variables. En el humano, el gen *ESR1* (*estrogen receptor 1*), que codifica para el ER- $\alpha$ , es un segmento genómico largo (~300 kb) que está localizado en el cromosoma 6q24-27 e incluye ocho exones que codifican a la proteína completa de 66 kDa (Koř et al. 2001; Ponglikitmongkol et al. 1988). De manera similar, el gen que codifica para el ER- $\beta$ , el gen *ESR2* (*estrogen receptor 2*), se encuentra en una región genómica larga (~254 kb) del cromosoma 14q22-24, con 8 exones que codifican una proteína completa de 58 kDa (Enmark et al. 1997). Los ERs, así como los otros miembros de la familia de receptores nucleares de hormonas (*nuclear hormone receptor*, NHR), contienen varios dominios funcionales en su estructura: un dominio amino-terminal (*N-terminal domain*; NTD) con función de activación (AF1); un dominio de unión a DNA (*deoxyribonucleic acid-binding domain*, DBD); una región flexible (*hinge*) con señales de localización nuclear; un dominio de unión a ligando (*ligand-binding domain*, LBD) y un dominio carboxilo terminal con función de activación (AF2) (Kumar et al. 1987) (**Figura 6A**).

El ER ejerce sus acciones a través de los mecanismos *clásico* y *no clásico* (**Figura 6B**). En el mecanismo clásico, el ER inactivo se encuentra asociado a proteínas chaperonas en el citoplasma. Cuando el E2 se une con una alta afinidad al receptor (ER $\alpha$ :  $K_d= 0.1$  nM; ER $\beta$ :  $K_d=0.4$  nM, Kuiper et al. 1997), las chaperonas se disocian y el receptor se dimeriza para formar un complejo activo que se transloca al núcleo. El ER puede interactuar directamente como homodímero o heterodímero con sus secuencias de reconocimiento (elementos de respuesta a estrógenos, ERE), localizados en las regiones promotoras de sus genes blanco o, asociado a los factores de transcripción AP-1 (*activator protein 1*), c-jun (*V-Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*) o c-fos (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), entre otros, para finalmente, regular la transcripción de genes en conjunto con coactivadores o correpresores, así como con proteínas de remodelación de la cromatina (Fuentes et al. 2019; Kovács et al. 2020).



**Figura 6. Características estructurales y funcionales del ER.** **A)** *Dominios funcionales de los dos subtipos del ER.* Tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$  contienen varios dominios funcionales. El dominio N-terminal contiene una función de activación (AF1) que participa en la regulación de la transcripción. El dominio de unión a DNA (DBD) se compone de dos motivos de dedos de zinc y una región de dimerización. La región bisagra (H) contiene secuencias de unión a chaperonas y señales de localización nuclear. En el dominio de unión a ligando (LBD) existen sitios de unión a correguladores. El dominio carboxilo terminal contiene una función de activación (AF2) dependiente de ligando. Los porcentajes en cada dominio indican el grado de identidad entre ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ . **B)** *Mecanismos de acción del E2.* El E2 puede unirse y activar a los receptores nucleares ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , lo que promueve la dimerización del receptor y su unión a los promotores de los genes blanco. Alternativamente, los ER activados modulan la función de otros factores de transcripción (TF) a través de interacciones proteína-proteína. El ER asociado a la membrana plasmática (mER) interactúa con proteínas adaptadoras y moléculas de señalización, como c-Src, que activa las vías de PI3K-Akt y MAPK. Algunos componentes que se unen al ER, como el E2, el G-1 (agonista selectivo del receptor membranar GPER), el *fulvestrant* (regulador reductor selectivo del ER) y el tamoxifen (modulador selectivo del ER), activan al GPER, que se localiza en el citoplasma o en las membranas. La activación de GPER estimula la producción de cAMP, la movilización de calcio y c-Src, que, entre otros efectores, puede activar a las MMP, las cuales salen de la célula y escinden proteínas de la matriz extracelular (ECM), como pro-HB-EGF, que libera el dominio HB-EGF, el cual transactiva a EGFR, que a su vez activa las vías de MAPK y PI3K-Akt. La regulación transcripcional mediada por E2 puede implicar la fosforilación (P) de ER u otros TF que pueden interactuar directamente con ER, o unirse independientemente del ER dentro de los promotores de los genes diana. Abreviaturas: AF: *activation function*; cAMP: *cyclic adenosine monophosphate*; c-Src: *cellular Src*; DBD: *Deoxyribonucleic acid-binding domain*; E2: *17 $\beta$ -estradiol*; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; ER: *estrogen receptor*; G-1: *GPER agonist 1*; GPER: *G-protein-coupled ER*; H: *hinge*; LBD: *ligand-binding domain*; HB-EGF: *heparin-binding EGF-like growth factor*; MMP: *matrix metalloproteinase*; pro-HB-EGF: *pro-heparin-binding-epidermal growth*; TF: *transcription factor*. Modificado de Prossnitz et al. (2011).

En numerosos estudios se ha demostrado que el E2, al igual que otras hormonas esteroideas, pueden llevar a cabo mecanismos de acción no clásicos por medio de la activación de vías de señalización intracelular que son capaces de regular rápidamente la fisiología de diferentes tipos de células. (Yaşar et al. 2017). El E2 puede activar en minutos al adenilato ciclasa; incrementar la concentración de calcio intracelular; estimular a la sintasa de óxido nítrico (NOS); activar a la fosfolipasa C (PKC) y, estimular la vía de MAPK y PI3K. Aunque los mecanismos no genómicos del E2 son muy diversos y poco entendidos, se sabe que muchos efectos rápidos son iniciados por la unión del E2 con los ERs asociados por palmitoilación a la membrana plasmática. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que efectos rápidos del E2 también son llevados a cabo por un ER de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G (*G protein-coupled estrogen receptor 1*, GPR30 o GPER), el cual puede activar las vías de MAPK, PI3K y SRC (*V-Src avian sarcoma (schmidt-ruppin A-2) viral oncogene homolog*) (Prossnitz and Barton 2011; Schwartz et al. 2016).

### 2.3.2 EFECTOS DEL E2 EN EL GBM

Las concentraciones del E2, así como la expresión y actividad de los ER, son determinantes en la progresión maligna de los tumores que crecen en los tejidos sensibles a estrógenos, como lo es en el cáncer de mama (Russo and Russo 2006; Yue et al. 2010), de ovario (Cunat et al. 2004), cervical (Chung et al. 2010; Kumar et al. 2016) y de próstata (Nelles et al. 2011; Di Zazzo et al. 2018b).

El GBM expresa ambos receptores, no obstante, se ha determinado que la expresión del ER- $\alpha$  es baja o está ausente en la mayoría de los tumores cerebrales (Carroll et al. 1995; Vaquero et al. 1983), mientras que la expresión del ER- $\beta$  disminuye conforme aumenta el grado de malignidad de los astrocitomas (Batistatou et al. 2004). Debido a esto, el ER- $\beta$  se ha sugerido como un potencial blanco terapéutico del tratamiento del GBM. Sareddy y colaboradores demostraron que los agonistas del ER- $\beta$  reducen significativamente tanto la proliferación de las células derivadas de GBM U87, U251 y T98G, como el crecimiento tumoral (Liu et al. 2015; Sareddy et al. 2012, 2016).

Por otro lado, en un estudio realizado con 36 biopsias de pacientes de astrocitomas con diferentes grados de malignidad, se encontró que la concentración del E2 aumenta y, que los niveles de expresión del mRNA del ER- $\alpha$  disminuyen, esto conforme aumenta el grado de malignidad (Dueñas Jiménez et al. 2014). En otro estudio, se encontró que el E2 incrementa significativamente el número de las células U373 y D54 (líneas celulares derivadas de GBM humano) a través del ER- $\alpha$  y su interacción con los coactivadores SRC-1 y SRC-3, mientras que la coadministración del antagonista *Fulvestrant*, bloquea los efectos (González-Arenas et al.

2012). Por otro lado, Wan y colaboradores mostraron que el tratamiento con E2 aumentó la capacidad migratoria e invasiva de las células U87 y T98G (derivadas de GBM humanos), y se sugiere que este efecto está mediado por la regulación de la expresión de la acuaporina AQP2 (Wan et al. 2018).

A pesar de que estas investigaciones han demostrado que existe una relación entre la expresión de los ER y la progresión maligna del GBM, aún no se tienen claros los mecanismos celulares en los que interviene la señalización E2-ER en este tipo de cáncer.

### 2.3.3 PARTICIPACIÓN DEL E2 EN LA REGULACIÓN DE LA EMT

La señalización promovida por el E2 a través de sus receptores está relacionada con la EMT. Sin embargo, los efectos del E2 en este programa celular varían de acuerdo con el tipo de cáncer. En las células MCF-7, derivadas de cáncer de mama, el silenciamiento del ER- $\alpha$  induce la EMT, denotado por la alteración de la morfología celular, la reorganización el citoesqueleto de actina y una mayor capacidad migratoria e invasiva; esto último, principalmente debido a cambios en los niveles de expresión de ciertas moléculas de la ECM, como MMP1/9 (*matrix metallopeptidase*) y plasminógenos (uPA, tPA, PA) (Bouris et al. 2015; Al Saleh et al. 2011). Por lo tanto, se ha propuesto que la señalización del E2 a través del ER- $\alpha$  mantiene un fenotipo epitelial y suprime la EMT en cáncer de mama (Guttilla et al. 2012). Además, también se ha descrito que la pérdida de la expresión del ER- $\alpha$  en las células MCF-7 correlaciona con un aumento en la expresión y actividad de SNAIL1, en donde, además, SNAIL1 regula de manera negativa la expresión del ER- $\alpha$  y su inhibición restaura parcialmente la sensibilidad al tamoxifen, un modulador selectivo del receptor que se usa como tratamiento en el cáncer de mama sensible a hormonas (Dhasarathy et al. 2007; Scherbakov et al. 2012). Sin embargo, en experimentos realizados en células MCF-7 y T47D, el tratamiento con E2 (1 nM) conduce a la activación de c-Src, que forma el complejo p-Src/ZO-1 (*zonula occludens*) y provoca el rompimiento de las uniones estrechas, así como un incremento en la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2). Estos cambios correlacionan con una disminución de marcadores epiteliales como ocludinas y la proteína homóloga de *crumbs 3* (*crumbs protein homolog 3*, CRB3), un incremento en la síntesis de N-cadherina y, un aumento en la migración celular, efectos que son bloqueados con el antiestrógeno ICI 182, 780 (Jiménez-Salazar et al. 2014).

Por otra parte, en líneas celulares de cáncer de ovario epitelial humano, se ha demostrado que el tratamiento con E2 (100 nM) aumenta la expresión de los factores *SNAI1* y *SNAI2*, lo que conduce a la EMT, determinada por los cambios morfológicos característicos del fenotipo mesenquimal y un aumento en la migración celular.

Asimismo, en este tipo de cáncer el E2 desencadena el comportamiento metastásico exclusivamente a través del ER- $\alpha$ , mientras que el ER- $\beta$  se opone a las acciones del ER- $\alpha$  e inhibe la EMT (Gallo et al. 2010; Park et al. 2008). Se ha mostrado que la alta expresión de *ZEB1* en ovario y endometrio está correlacionada de manera positiva con los altos niveles de E2 (Gallo et al. 2010; Hurt et al. 2008). Sin embargo, en cáncer de endometrio la falta de ER- $\alpha$  está asociada con la EMT y con una supervivencia reducida (Wik et al. 2013). Además, el tratamiento con E2 (10 nM) en células endometriales induce procesos de migración, invasión y el fenotipo mesenquimal (Qi et al. 2018). Asimismo, en células epiteliales benignas de próstata, el E2 (10 nM) induce la EMT y, el silenciamiento de ER- $\alpha$  la inhibe, mientras que el silenciamiento de ER- $\beta$  la promueve (Shi et al. 2017).

La señalización inducida por E2 a través del ER- $\alpha$  está relacionada con la vía de señalización del TGF- $\beta$ , uno de los principales inductores de la EMT, ya que diversas investigaciones han mostrado que ambas vías se entrecruzan (Band and Laiho 2011). Ensayos de la actividad reportera de luciferasa realizados en células de carcinoma de riñón, mostraron que el tratamiento con E2 (10, 1, 0.1 0.01  $\mu$ M) inhibe la vía de señalización inducida por el TGF- $\beta$  en una manera dependiente de la concentración, como resultado de una interacción directa entre el ER- $\alpha$  y el efector Smad3 (Matsuda et al. 2001). Posteriormente, se determinó que la señalización del ER- $\alpha$  inhibe la vía del TGF- $\beta$  al formar un complejo con Smad2/3 y con la ubiquitina ligasa Smurf, que promueve la ubiquitinación de SMAD y su subsecuente degradación por el proteosoma (Ito et al. 2010). En las células MCF-7 de cáncer de mama, tanto el E2 como el TGF- $\beta$  promueven la migración celular, pero el tratamiento conjunto E2+TGF- $\beta$  inhibe el efecto en la migración, esto, como resultado de una disminución en los niveles de fosforilación de Smad2 y Smad3, así como de la actividad reportera de luciferasa (Malek et al. 2006). También se ha mostrado que el ER- $\alpha$ , cuando se une a los EREs, puede formar un complejo con el efector SMAD4 a través del dominio AF-1. Al unirse, SMAD4 actúa como un represor de los genes blanco del ER $\alpha$  (Wu et al. 2003). Además, se ha sugerido que la inhibición de la vía del TGF- $\beta$  por el ER involucra mecanismos no genómicos a través del GPR30, el cual induce la activación de las MAPKs, que a su vez, interfieren con la activación de la proteína SMAD2 (Kleuser et al. 2008).

Los resultados descritos, demuestran la importancia del contexto específico y del tipo celular en los efectos del E2 sobre la EMT, así como de sus interacciones con otras vías de señalización. Sin embargo, aunque se ha establecido que existe una relación entre las acciones del E2 y la malignidad del GBM, no se ha investigado si el E2 participa en la EMT de este tumor, ni tampoco como se relaciona con otras vías de señalización que son conocidas por promover la EMT, como la vía del TGF- $\beta$ .

### **III. Planteamiento del problema**

La EMT es un programa de plasticidad celular cuya desregulación promueve la progresión tumoral del GBM. En este tumor se han descrito diversas vías de señalización que activan la transición, no obstante, no se tiene claro el papel que tienen otros factores que se encuentran dentro del microambiente tumoral. Aunque la señalización del ER- $\alpha$  está implicada en la inducción de la EMT en algunos tejidos responsivos a E2, esto aún se desconoce en el contexto del GBM. Considerando que la expresión de los ERs ha sido vinculada con la progresión maligna de los astrocitomas, en este trabajo se estudiaron los efectos que tiene el E2 sobre la inducción de la EMT en líneas celulares derivadas de GBM humano.

### **IV. Hipótesis**

La administración de E2 en cultivos de células derivadas de GBM humano induce la EMT al promover un fenotipo con morfología mesenquimal, aumento en los niveles de expresión de los marcadores de la EMT, así como mayor capacidad migratoria e invasiva.

# V. Objetivos

## 5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos que tiene el E2 sobre la inducción de la EMT en células derivadas de GBM humano.

## 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la expresión basal del ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  a nivel de mRNA y proteína en líneas celulares derivadas de GBM humano.
- Analizar el efecto del E2 sobre los cambios en la morfología celular y su relación con la reorganización de los filamentos de actina.
- Evaluar el efecto del E2 sobre la expresión del marcador epitelial ZO-1 y de los marcadores mesenquimales vimentina y N-cadherina.
- Estudiar el impacto que tiene el E2 sobre los procesos celulares de migración e invasión celulares.
- Realizar tratamientos con agonistas y antagonistas selectivos del ER- $\alpha$  y del ER- $\beta$  para determinar el subtipo del ER a través del cual el E2 ejerce los efectos observados.
- Evaluar el efecto que tiene el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  sobre la morfología celular y la expresión de marcadores de la EMT.
- Analizar la relación entre la expresión del ER- $\alpha$  y los niveles de fosforilación de los efectores Smad2 y Smad3.



# VI. Estrategia Experimental

## 6.1 CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares derivadas de GBM humanos U87, U251, T98 y LN229 (*American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, Virginia, EUA) se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*, Cat. N° L0107-500) enriquecido con glucosa y suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Cat. N° S1650), piruvato 1 mM (Cat. N° L0642-100), antibiótico 1 mM (estreptomomicina 10 g/l, penicilina G 6.028 g/l y anfotericina B 0.025 g/l, Cat. N° L0010) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Cat. N° X0557-100) [*Biowest*, Nuaille, Pays De La Loire, Francia]; a una temperatura de 37°C y una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. La **Tabla 1** describe las principales características de las cuatro líneas celulares que se utilizaron, y muestra que a pesar de que los cuatro tipos celulares derivan de un astrocitoma de grado IV (GBM), su perfil molecular es diferente, por lo que el fenotipo varía entre cada una de ellas. Por esta razón se utilizamos estas cuatro líneas celulares, para determinar si los efectos del E2 son constantes en los cuatro tipos de células de GBM o si varían debido a sus diferencias moleculares. Además, hay que resaltar que las células U251 muestran un fenotipo que corresponde con los subtipos clásico y proneural, mientras que las células U87 muestran un fenotipo mesenquimal. Como se mencionó anteriormente, el subtipo proneural está relacionado con un pronóstico más favorable y el subtipo mesenquimal tiende a tener la peor tasa de supervivencia (Lin et al. 2014; Olar and Aldape 2014; Phillips et al. 2006). Estas dos líneas celulares se utilizaron en la mayoría de los experimentos descritos más adelante por esta razón.

Veinticuatro horas antes de los tratamientos experimentales, el medio de cultivo se cambió por DMEM sin rojo de fenol (Cat. N° ME-019, *In Vitro*, México) suplementado con SFB libre de hormonas al 10% (Cat. N° SH30068.03, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA), piruvato 1 mM, antibiótico 1 mM y aminoácidos no esenciales 0.1 mM. En cada caso correspondiente, las células fueron tratadas con vehículo 1 ( $\beta$ -ciclodextrina al 0.01%, Cat. N° C4805); vehículo 2 (dimetil sulfóxido, DMSO al 0.01%, Cat. N° 472301); E2 (10 nM, Cat. N° E4389) [*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA], agonista selectivo del ER- $\alpha$ : PPT (10 nM, Cat. N° 1426), agonista selectivo del ER- $\beta$ : DNP (10 nM, Cat. N° 1494), antagonista selectivo del ER- $\alpha$ : MPP (1  $\mu$ M, Cat. N° 1991), antagonista selectivo del ER- $\beta$ : PHTPP (1  $\mu$ M, Cat. N° 2662) [*Tocris*, Bristol, Reino Unido] y TGF- $\beta$  (10 ng/ml, Cat. N° 100-21C, *PeptoTech*, Rocky Hill, New Jersey, EUA). En los tratamientos conjuntos, los antagonistas MPP y PHTPP se agregaron dos horas antes que el E2.



**Tabla 1.** Características de las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Características *	U251	U87	T98G	LN229
<b>Glioma</b>	Astrocitoma humano	Astrocitoma humano	Astrocitoma humano	Astrocitoma humano
<b>Grado de malignidad</b>	IV: GBM	IV: GBM	IV: GBM	IV: GBM
<b>Morfología</b>	Pleomórfico/astrocitoide	Epitelial	Fibroblástico	Epitelial
<b>Paciente</b> <sup>+</sup>	Hombre, edad desconocida	Hombre, edad desconocida	Hombre, 61 años	Mujer, 60 años
<b>Genes mutados</b>	TP53, EGFR, PTEN, NF1	NF1, ATRX, PTEN, CDKN2A	TP53, PTEN, KDM5A	TP53, p16
<b>Sobreexpresión de receptores</b>	EGFR, PDGFR	-	-	-
<b>Subtipo molecular</b> <sup>±</sup>	Clásico/Proneural	Mesenquimal	Proneural/Mesenquimal	-

\* Características obtenidas de la base de datos de la ATCC (*American Type Culture Collection*).

+ Paciente del cual se extrajo el tumor de origen.

± Designado únicamente por la sobreexpresión de genes característicos de cada subtipo, más no por el perfil molecular completo de Verhaak et al. 2010.

## 6.2 ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

El fenotipo epitelial se caracteriza por tener una forma poligonal, mientras que el fenotipo mesenquimal presenta una forma de *huso* (*fusiforme*). Por lo tanto, las características geométricas entre el fenotipo epitelial y el mesenquimal difieren entre sí. Las características geométricas de una célula se pueden cuantificar utilizando software de alto rendimiento (Bakal et al. 2007; Carpenter et al. 2006; S. Chen et al. 2012; Ren et al. 2015). Los cambios morfológicos de las células U251, U87, T98G y LN229 tratadas con vehículo (ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF- $\beta$  (10 ng/ml) y E2+ TGF- $\beta$ , se observaron a las 0, 48 y 72 h mediante microscopía de contraste de fases (microscopio invertido *Olympus IX71*, Shinjuku, Tokio, Japón) y se capturaron digitalmente seis campos arbitrarios para cada uno de los tratamientos. La **Figura 7** describe esquemáticamente la metodología general que se llevó a cabo para el análisis cuantitativo de la morfología celular. Se utilizó el software Adobe Photoshop CS6 (*Adobe Systems Inc.*, San Jose, California, EUA) para procesar la corrección de fondo y la iluminación de las imágenes capturadas. Posteriormente, se determinó la orientación, la forma y la posición de cada una de las células en cada imagen para segmentarlas con el software Image-Pro10.0.6 (*Media Cybernetics Inc.*, Rockville, Maryland, EUA), que tiene algoritmos automatizados para identificar, separar y cuantificar cada una de las células que aparecen en la imagen. Esta cuantificación permite la extracción de características geométricas que determinan los parámetros morfológicos de las células segmentadas en el plano bidimensional (**Tabla 2**).

**Figura 7. Estrategia experimental de análisis cuantitativo de la morfología celular.** Las células tratadas con vehículo (V, ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF- $\beta$  (10 ng/ml) y E2+ TGF- $\beta$ , se observaron por microscopía de contraste de fases y se capturaron digitalmente imágenes en seis campos arbitrarios por cada tratamiento a las 0, 48 y 72 h. Las imágenes capturadas se procesaron con el software Adobe Photoshop CS6 para igualar el color del fondo y corregir la iluminación. Se utilizó el software *ImagePro* para localizar a las células, segmentarlas de acuerdo con su forma y cuantificar las características geométricas en el plano bidimensional.



**Tabla 2. Descripción de los parámetros morfológicos del software *Image-Pro*.**

Parámetros	Definición	Imagen
Área	Área incluida en el polígono que define el contorno de la figura.	
Eje mayor	Longitud del eje mayor de una elipse imaginaria que rodea a la figura.	
Eje menor	Longitud del eje menor de una elipse imaginaria que rodea a la figura.	
Aspecto	Proporción entre el eje mayor y el eje menor de la elipse.	
Altura de la caja (Y)	Altura del cuadro delimitador de la figura.	
Ancho de la caja (X)	Ancho del cuadro delimitador de la figura	
Caja XY	Proporción entre el ancho y la altura del cuadro delimitador.	
Circularidad	Proporción del área entre el diámetro de un círculo que lo rodea la figura.	
Perímetro	Longitud de la región que rodea a la figura.	

### 6.3 RT-QPCR

El ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA) total de las células se obtuvo usando el método de guanidina tiocianato-fenol-cloroformo con el reactivo TRIzol LS Reagent (Cat. N° 10296028, *Thermo Fisher Scientific*) siguiendo el protocolo del proveedor. El RNA extraído se midió por espectrofotometría (Nanodrop 2000, *Thermo Fisher Scientific*) y su integridad se verificó por electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% en solución de tris-borato-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (TBE: tris 89 mM, borato 89 mM, EDTA 2.0 mM, pH 8.3) analizado por la fluorescencia del reactivo GreenSafe (Cat. N° MB13201, *NZYTEch*, Lumiar, Lisboa, Portugal). El RNA de astrocitos humanos se adquirió de *ScienCell Research Laboratories* (Cat. N° 1805, Faraday Ave, Carlsbad, EUA). Se utilizó la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, M-MLV RT, Cat. N° 28025013, *Thermo Fisher Scientific*) para obtener el DNA complementario de 1 µg de RNA extraído siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. La expresión relativa al gen de RNA ribosomal 18S se cuantificó a través de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) utilizando oligonucleótidos estandarizados para cada gen de interés (**Tabla 3**).

Se utilizó el kit *FastStart DNA Master SYBR Green I* (Cat. N° 12239264001) para realizar la amplificación en el equipo LightCycler 2.0 (N° 03531414001) [*Roche*, Grenzacherstrasse, Basilea, Suiza]. Las condiciones de reacción programadas en el equipo fueron las siguientes: un ciclo de pre-incubación (95°C/10min), 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C/10s, alineación a 59°C/5s, extensión a 72°C/10s), un ciclo para el análisis de la temperatura de disociación del amplificado (*melting curve*, desnaturalización a 95°C/0s, alineación a 65°C/15s, fusión a 95°C/0s) y un ciclo de enfriamiento (40°C/1min). La expresión relativa se cuantificó por el método comparativo  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl 2001; Schmittgen and Livak 2008).

**Tabla 3.** *Propiedades de los oligonucleótidos diseñados.*

Gen	Secuencia	Longitud (nc)	Tamaño del amplificado (pb)	TM (°C)	%GC
ESR1	Fw: 5'- AGCACCTGAAGTCTCTGGA-3'	20	153	60.18	55
	Rv: 5'- GATGTGGGAGAGGATGAGGA-3'	20		57.91	55
ESR2	Fw: 5'- AAGAAGATTCCCGGCTTTGT-3'	20	173	57.41	45
	Rv: 5'- TCTACGCATTTCCCCTCATC-3'	20		57.09	50
VIM	Fw: 5'- GGACCAGCTAACCAACGACA-3'	20	178	59.97	55
	Rv: 5'- AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'	20		59.97	55
CDH2	Fw: 5'- CTGGAGACATTGGGGACTTC-3'	21	109	57.59	55
	Rv: 5'- GAGCCACTGCCTTCATAGT-3'	19		56.82	52.63
TJP1	Fw: 5'- GCCATTCCCGAAGGAGTTGA-3'	20	174	60.04	55
	Rv: 5'- ATCACAGTGTGGTAAGCG-3'	18		54.65	50
18S	Fw: 5'-AGTGAACTGCGAATGGCTC-3'	20	167	64.3	50
	Rv: 5'-CTGACCGGGTTGGTTTGAT-3'	20		65.9	50

Fw (forward): oligonucleótido sentido; Rv (reverse): oligonucleótido antisentido; nc: nucleótidos; pb: pares de bases; TM: *melting curve*; CG: citosina-guanina. ESR1 (ER- $\alpha$ ); ESR1 (ER- $\beta$ ); VIM (vimentina); CDH2 (N-cadherina); TJP1 (ZO-1); 18S (rRNA 18S).

## 6.4 WESTERN BLOT

Las células U251, U87, T98G y LN229 se despegaron de las placas de cultivo con una solución salina amortiguada con fosfatos fría (*phosphate-buffered saline*, PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, pH 7.4) y un raspador de células. La disolución celular se centrifugó a 45×g por 3 min, y el precipitado celular se homogenizó con la solución del ensayo de radioinmunoprecipitación (*radio-immuno-precipitation assay*, RIPA: tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, tritón X-100 1%, sodium dodecyl sulfate, SDS 0.1%) complementado con un coctel de inhibidores de proteinasas (P8340, *Sigma-Aldrich*). Las proteínas totales se obtuvieron por centrifugación a 20,817×g a 4°C por 15 min y se cuantificaron por espectrofotometría (NanoDrop 2000) con el reactivo *Pierce 660 nm protein assay* (Cat. N° 22660) [*Thermo Fisher Scientific*]. Se utilizó una concentración de 30 µg de proteínas para separarlas por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS- polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) al 10% con un voltaje de 80 V. Las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride*, PVDF, Cat. N° IPVH00010, *Merck*, Kenilworth, New Jersey, EUA), durante 45 min a 25 V en condiciones semi-húmedas a temperatura ambiente. Posteriormente, las

membranas se incubaron en una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA, Cat. N° ALB-01, *In vitro*) al 5% en solución salina amortiguada con tris-tween (*tris-buffered saline-tween*, TBST: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, tween 0.1%, pH 7.6) durante 2 h a 37°C en agitación constante. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-ER- $\alpha$  (2  $\mu\text{g/ml}$ , policlonal de conejo, Cat. N° ab3575, *Abcam*, Cambridge, Reino Unido); anti-ER- $\beta$  (0.4  $\mu\text{g/ml}$ , monoclonal de ratón, Cat. N° 1531: sc-53494) anti-ZO-1 (0.6  $\mu\text{g/ml}$ , monoclonal de rata, Cat. N° R40.76: sc-33725); anti-N-cadherina (0.8  $\mu\text{g/ml}$ , monoclonal de ratón, Cat. N° D-4: sc-8424); anti-vimentina (0.4  $\mu\text{g/ml}$ , monoclonal de ratón, Cat. N° V9: sc-6260); anti- $\alpha$ -tubulina (0.4  $\mu\text{g/ml}$ , monoclonal de ratón, Cat. N° A-6: sc-398103) [*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, Texas, EUA]; anti-Smad2/3 (1:500, monoclonal de conejo, Cat. N° D7G7: 8685S) y anti-fosfo-Smad2 (1:500, monoclonal de conejo Ser465/467, Cat. N° 138D4: 3108S) (*Cell Signaling Technology*, Danvers, Massachusetts, EUA), todos diluidos en solución de bloqueo (BSA 5%/TBST) durante 48 h a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBST tres veces cada 5 min y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP): anti-conejo (0.06  $\mu\text{g/ml}$ , policlonal de cabra IgG (H+L) [*Immunoglobulin G containing 2 heavy chains (H) and 2 light chains (L)*], Cat. N° 65-6120, *Thermo Fisher Scientific*), anti-ratón (0.013  $\mu\text{g/ml}$ , cadena ligera IgG $\kappa$  de ratón recombinante, Cat. N° sc-516102, *SC Biotechnology*) y anti-rata (0.06  $\mu\text{g/ml}$ , policlonal de cabra IgG (H+L), Cat. N° ab97057, *Abcam*) durante 45 min a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron cinco lavados con TBST de 5 min cada uno. Las especies inmunoreactivas se identificaron por quimioluminiscencia exponiendo las bandas características de la proteína de interés en las placas fotográficas de Kodak Biomax Light Film (Cat. N° Z370371, *Sigma-Aldrich*), después de incubar por 10 min las membranas con el reactivo *Supersignal West Femto* (Cat. N° 34096, *ThermoFisher Scientific*). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital de 14.1 megapíxeles (SD1400IS, Canon, Ōta, Tokio, Japón) y se analizaron por densitometría con el programa ImageJ 1.52u (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EUA).

## 6.5 INMUNOFLUORESCENCIA

Las células U251 y U87 se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% a temperatura ambiente durante 20 min, se lavaron con PBS y luego, se incubaron en solución de bloqueo permeabilizante (1% de BSA; 1% de glicina, 0.2% de Triton X-100, diluido en PBS) a temperatura ambiente durante 90 min. Posteriormente, las células se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios: anti-actina (4  $\mu\text{g/ml}$ , policlonal de cabra, Cat. N° C-11: sc-1615); anti-ZO-1 (8  $\mu\text{g/ml}$ , monoclonal de rata, Cat. N°

R40.76: sc-33725); anti-N-cadherina (8 µg/ml, monoclonal de ratón, Cat. N° D-4: sc-8424); anti-vimentina (4 µg/ml, monoclonal de ratón, Cat. N° V9: sc-6260) [*Santa Cruz Biotechnology*], y anti-Smad2/3 (1:200, monoclonal de conejo, Cat. N° D7G7: 8685S, *Cell Signaling Technology*). Las células se enjuagaron tres veces cada 5 min con solución PBST (PBS con 0,05% de tween) y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-ratón (4 µg/ml, IgG policlonal de cabra (H+L) Alexa Fluor 488, Cat. N° A11001, *ThermoFisher Scientific*); anti-rata (4 µg/ml, IgG policlonal de cabra (H+L) Alexa Fluor 488, Cat. N° ab150157, *Abcam*), anti-cabra (8 µg/ml, IgG-FITC (*fluorescein isothiocyanate*) de burro, Cat. N° sc-2024, *Santa Cruz Biotechnology*), y anti-conejo (4 µg/ml, IgG policlonal de cabra (H+L) Alexa Fluor 568, Cat. N° A11011, *ThermoFisher Scientific*); y nuevamente se enjuagaron con PBST tres veces cada 5 min. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33,342 (1 mg/ml, Cat. N° 62249, *ThermoFisher Scientific*) a temperatura ambiente durante 7 min y se enjuagaron tres veces cada 5 min con PBST. Finalmente, las células se cubrieron con un medio de montaje (Cat. N° 18606-20, *Polysciences*, Valley Rd, Warrington, EUA) y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia (Bx43, microscopio óptico *Olympus*), capturando digitalmente seis campos arbitrarios con un aumento total de 400X. La densidad de fluorescencia se midió como densidad integrada desde el menú *Analizar* del software ImageJ.

## 6.6 MIGRACIÓN CELULAR

Los ensayos de cierre de herida (*wound healing*) determinaron la capacidad migratoria de las células. Las células U251 y U87 crecieron en DMEM con rojo de fenol suplementado hasta alcanzar una confluencia del 70%, y luego, el medio se cambió a DMEM sin rojo fenol suplementado y se incubó a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al llegar a una confluencia del 90%, se hizo una *herida* sobre la monocapa de células con una punta de pipeta de 200µl. Las células flotantes se enjuagaron con PBS y se añadió nuevamente DMEM sin rojo fenol suplementado. Para descartar efectos en la migración debido a un aumento en la proliferación celular, una hora antes de agregar los tratamientos experimentales, las células se incubaron con clorhidrato de citosina β-D-arabinofuranosido/Ara-C (10µM, Cat. N° C1768, *Sigma-Aldrich*), un inhibidor selectivo de la síntesis de DNA. Las imágenes del área de la herida se capturaron en un aumento de 100X con una cámara Infinity 1-2C (*Lumenera*, Ottawa, Ontario, Canadá) conectada a un microscopio invertido (CKX41 *Olympus*) a las 0, 12 y 24 h de tratamiento, y se analizaron utilizando el complemento MRI *Wound Healing Tool* del software ImageJ.

## 6.7 INVASIÓN CELULAR

El ensayo de *Transwell* determinó el potencial de invasión de las células. Se colocaron insertos de *Transwell* con un grosor de membrana de 10  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  (Cat. N° 3422, *Corning*, *Corning*, New York, EUA), en placas de 24 pozos, y cada pozo se cubrió con 50  $\mu\text{l}$  de *gel ECM de sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm* (2 mg/ml, Cat. N° E1270, *Sigma-Aldrich*), diluido en DMEM sin rojo de fenol ni suplemento e, inmediatamente se incubaron a 37°C durante dos horas. Después, 15,000 células U87 o 10,000 células U251 suspendidas en 150  $\mu\text{l}$  de DMEM (sin rojo fenol ni suplemento) con Ara-C (10  $\mu\text{M}$ ) y el tratamiento correspondiente, se agregaron al inserto superior, mientras que los pozos inferiores se llenaron con 500  $\mu\text{l}$  de DMEM suplementado con 10% de SFB (quimio-atrayente). Finalmente se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Los insertos *Transwell* se enjuagaron con PBS, se fijaron con PFA al 4% durante 20 min y se tiñeron con cristal violeta al 0.1% durante 20 min adicionales. Los insertos se lavaron cada 15 min tres veces con PBS para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, las imágenes de las células invasoras se capturaron con un aumento de 100X en una cámara Infinity 1-2C (Lumenera) conectada a un microscopio invertido (CKX41 Olympus) y se analizaron usando el complemento *Cell Counter* en el software ImageJ.

## 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad*, San Diego, California, EUA). El análisis estadístico entre grupos comparables se realizó utilizando un análisis de varianza (*analysis of variance*, ANOVA) unidireccional con una prueba posterior de *Tukey*. El análisis del curso temporal se realizó utilizando una prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba posterior de *Bonferroni* para comparar las medias replicadas por fila. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Los datos graficados son representativos de tres experimentos independientes para cada tratamiento.

## VII. Resultados

### 7.1 Expresión diferencial de los subtipos ER- $\alpha$ y ER- $\beta$ en las células de GBM humano

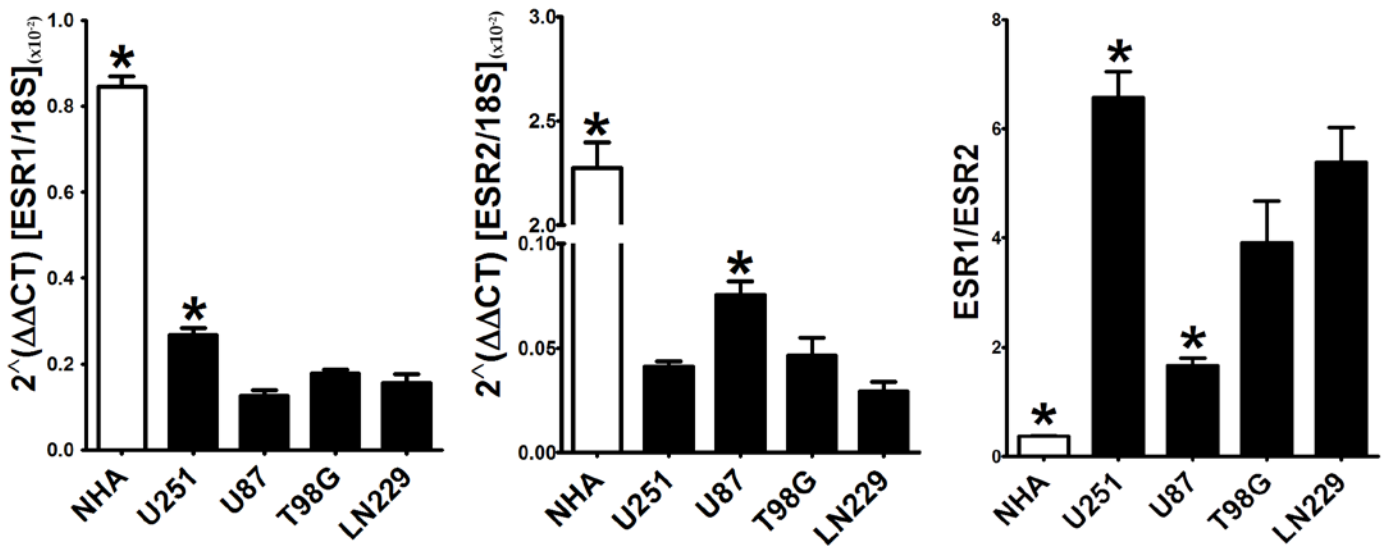
Los receptores intracelulares ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  se expresan en diferentes regiones del CNS, donde intervienen en muchas funciones esenciales del tejido nervioso (Barth et al. 2015). Se ha mostrado que los niveles de expresión de estos receptores disminuyen en los tumores cerebrales, particularmente en astrocitomas, lo que sugiere que su actividad está relacionada con los mecanismos patológicos involucrados en el desarrollo tumoral (Batistatou et al. 2004; González-Arenas et al. 2012; Khalid et al. 1995; Sareddy et al. 2012; Wan et al. 2018). Para llevar a cabo un análisis de los efectos del E2 relacionados con sus receptores intracelulares, primero se caracterizó la expresión de ambos subtipos del ER en cuatro líneas celulares derivadas de GBM humano: U251, U87, T98G y LN229 (**Figura 8**).

Los mRNAs de los genes *ESR1*, que codifica para el ER- $\alpha$ , y *ESR2*, que codifica para el ER- $\beta$ ; se expresaron en las cuatro líneas células de GBM y en astrocitos normales de humano (*normal human astrocytes*, NHA) (**Figura 8A**). Hubo una mayor expresión de *ESR1* y *ESR2* en los astrocitos que en las células de GBM. Entre las células de GBM, el gen *ESR1* se expresó en mayor proporción en las células U251, mientras que *ESR2* tuvo una mayor expresión en las células U87. La expresión de los receptores también fue evaluada a nivel de proteína, donde identificamos tanto al ER- $\alpha$  como a las isoformas 1 y 5 del ER- $\beta$  (**Figura 8B**). En los cuatro tipos celulares, el contenido del ER- $\alpha$  también resultó ser mayor que el de cada una de las isoformas del ER- $\beta$ ; mientras que la isoforma ER- $\beta_1$  se expresó en mayor cantidad que la isoforma ER- $\beta_5$ .

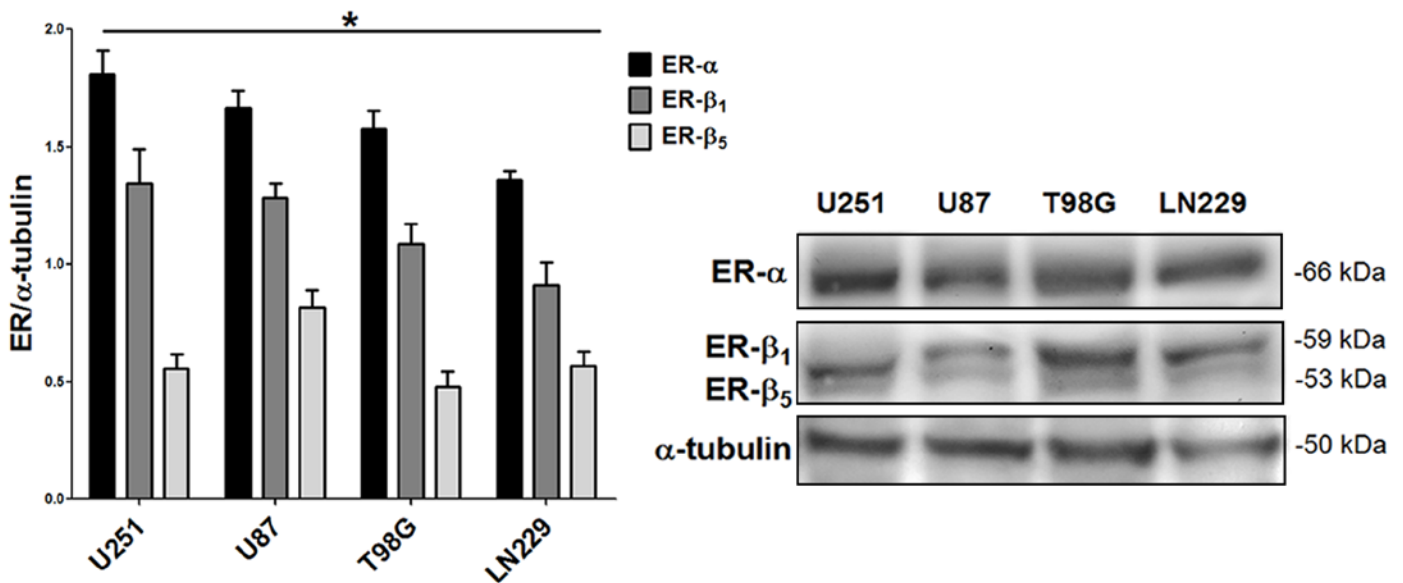
Por consiguiente, los dos subtipos de receptores intracelulares ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  se expresaron diferencialmente tanto a nivel transcripcional como de proteína en las cuatro líneas celulares derivadas de GBM humano. Como ambos subtipos del ER se expresaron en las cuatro líneas celulares de GBM utilizadas, se consideró que estas células son un modelo experimental apropiado para evaluar los efectos que tiene el E2 a través de estos receptores en el contexto del GBM. Además, observamos que las células U251 fueron las que expresaron en mayor proporción el ER- $\alpha$ , mientras que las células U87 expresaron en mayor proporción el ER- $\beta$ , en comparación con las otras líneas celulares. Por esta razón, utilizamos estas dos líneas células en todos los experimentos en donde se determinaron los efectos asociados a la EMT, para evaluar una posible diferencia entre los efectos observados en cada tipo celular.



**A**



**B**



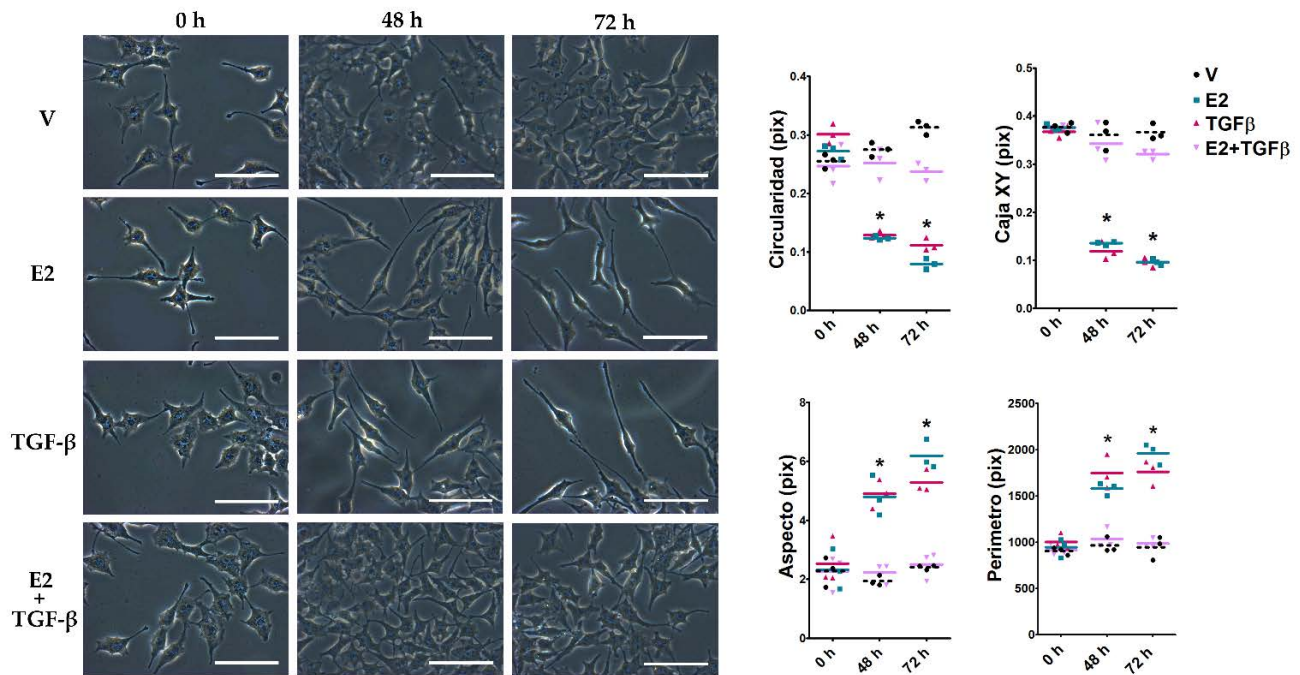
**FIGURA 8. Expresión de los subtipos ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  en células derivadas de GBM humano.** (A) La expresión de los genes ESR1 y ESR2 relativa al gen de referencia 18S rRNA se cuantificó por RT-qPCR usando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , en una muestra de RNA total de astrocitos de humano (*normal human astrocytes*, NHA) y en las células U251, U87, T98G y LN229. Ambos subtipos del receptor se expresaron en menor cantidad en las células de GBM que en los astrocitos; mientras que la relación ESR1/ESR2 fue mayor en las células de GBM que en astrocitos. \* $p < 0.05$  vs todos los demás grupos; cada barra representa la media  $\pm$  EEM,  $n=3$ . (B) El contenido de ER $\alpha$  y ER $\beta$  se determinó en las mismas células de GBM por Western blot. Se presenta el análisis densitométrico de la expresión del ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  con sus respectivas bandas representativas. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. \* $p < 0.05$  ER- $\alpha$  vs ER- $\beta_{1/5}$ , y ER- $\beta_1$  vs ER- $\beta_5$ ; cada barra representa la media  $\pm$  EEM,  $n=3$ .

## 7.2 El tratamiento con E2 induce cambios morfológicos en las células de GBM

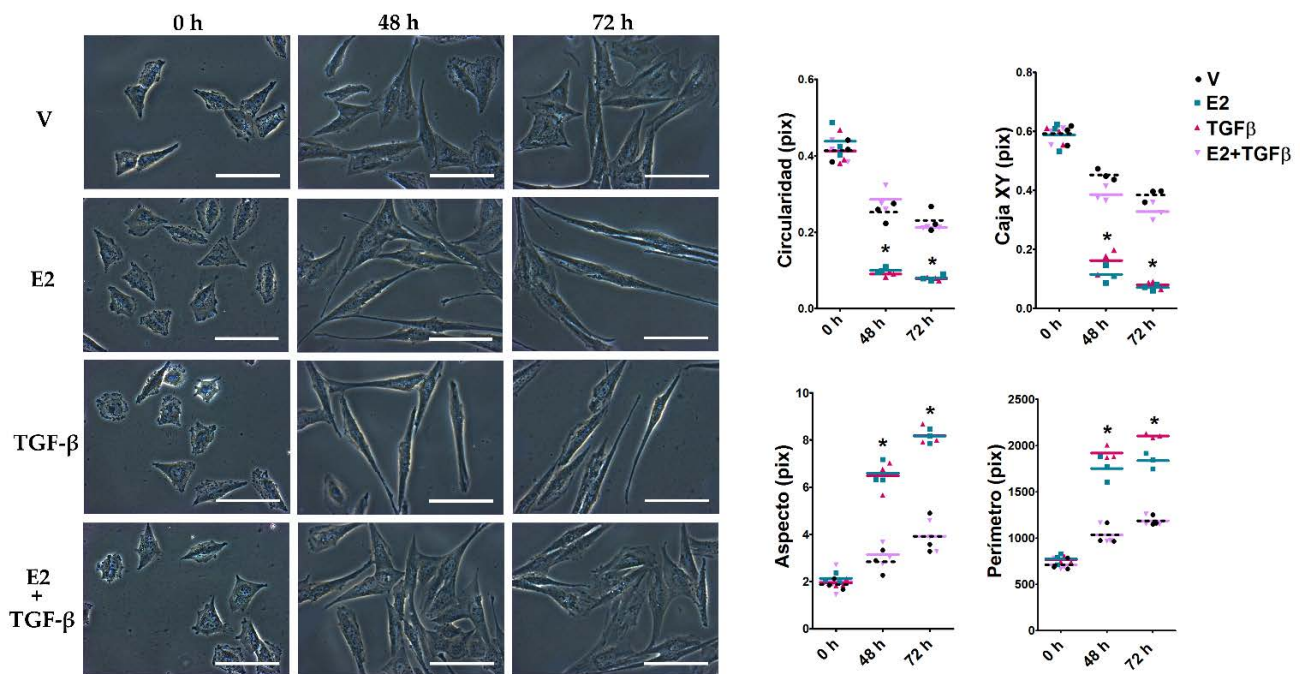
Por definición, la EMT es un proceso que implica cambios en la forma y tamaño celular. Por lo tanto, el análisis de la morfología celular es una de las principales evaluaciones que se realizan para caracterizar la EMT. En este trabajo, las células U251, U87, T98G y LN229 se observaron por microscopía de contraste de fases mientras eran cultivadas bajo los tratamientos con E2 (10 nM), TGF- $\beta$  (10 ng/ml) y E2+TGF- $\beta$  al inicio y, a las 48 y 72 h. La concentración de E2 estuvo basada en un trabajo previo de nuestro laboratorio en donde se muestra que el E2 induce el crecimiento celular y la expresión de genes relacionados con la proliferación en células derivadas de GBM humanos (González-Arenas et. Al. 2012). Se estableció el tratamiento de TGF- $\beta$  como control positivo sobre la inducción de la EMT para compararlo con los efectos del E2. Además, debido a los antecedentes previamente mencionados que señalan la existencia de un entrecruzamiento (*crossstalk*) entre la señalización del E2-ER y del TGF- $\beta$ -Smad2/3 (Band and Laiho 2011; Ito et al. 2010; Malek et al. 2006; Matsuda et al. 2001; Wu et al. 2003), se realizó el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  para evaluar la relación entre ambos factores sobre los cambios morfológicos relacionados con la EMT dentro el contexto del GBM. Las imágenes representativas que se capturaron de las células U251 y U87 (**Figure 9**) y, T98G y LN229 (**Figure 10**), revelan que, al inicio de los tratamientos, las cuatro líneas celulares presentaron una morfología característica. Sin embargo, desde las 48 h, las células que fueron tratadas con E2 y TGF- $\beta$ , mostraron una morfología alargada con las extremidades más estrechas que el centro, en comparación con las células que solo fueron tratadas con vehículo. Además, el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  bloqueó los efectos tanto del E2 como del TGF- $\beta$  a las 48 y 72 h. Este comportamiento fue muy similar entre los cuatro tipos celulares. Para determinar estos cambios morfológicos de manera cuantitativa, se midieron cuatro parámetros geométricos con el software *ImagePro Plus*: circularidad, caja XY (ancho/altura), aspecto (eje mayor/menor) y perímetro. En este contexto, valores cercanos a la unidad (1) de las medidas de circularidad y caja XY son característicos de una forma poligonal, mientras que altos valores de las medidas del aspecto y el perímetro se consideran propios de un aspecto fusiforme. En las gráficas que representan esta cuantificación se observa que, con respecto al vehículo y el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$ , las células que recibieron los tratamientos con E2 y TGF- $\beta$ , la circularidad y la caja XY disminuyeron, mientras que el aspecto y el perímetro aumentaron.

En general, los resultados obtenidos con los tratamientos de E2 y TGF- $\beta$  en las cuatro líneas celulares, concuerdan con el cambio de los parámetros geométricos de una figura poligonal hacia una fusiforme, que corresponden con el fenotipo epitelial y mesenquimal, respectivamente. Por lo tanto, mostramos que los tratamientos independientes con E2 y TGF- $\beta$  promueven cambios morfológicos asociados a la EMT. Además, el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  bloqueó los efectos de ambos factores. Los mecanismos a través de los cuales sucede este bloqueo aún quedan por ser determinados.

### A. Células U251

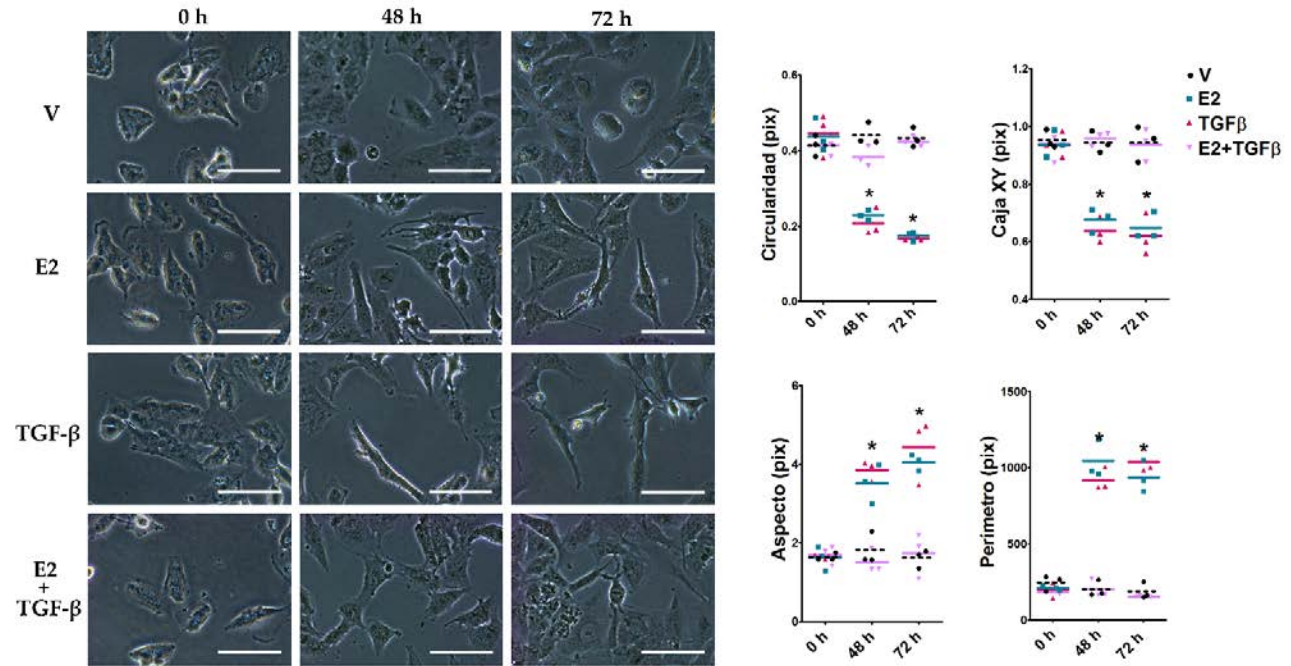


### B. Células U87

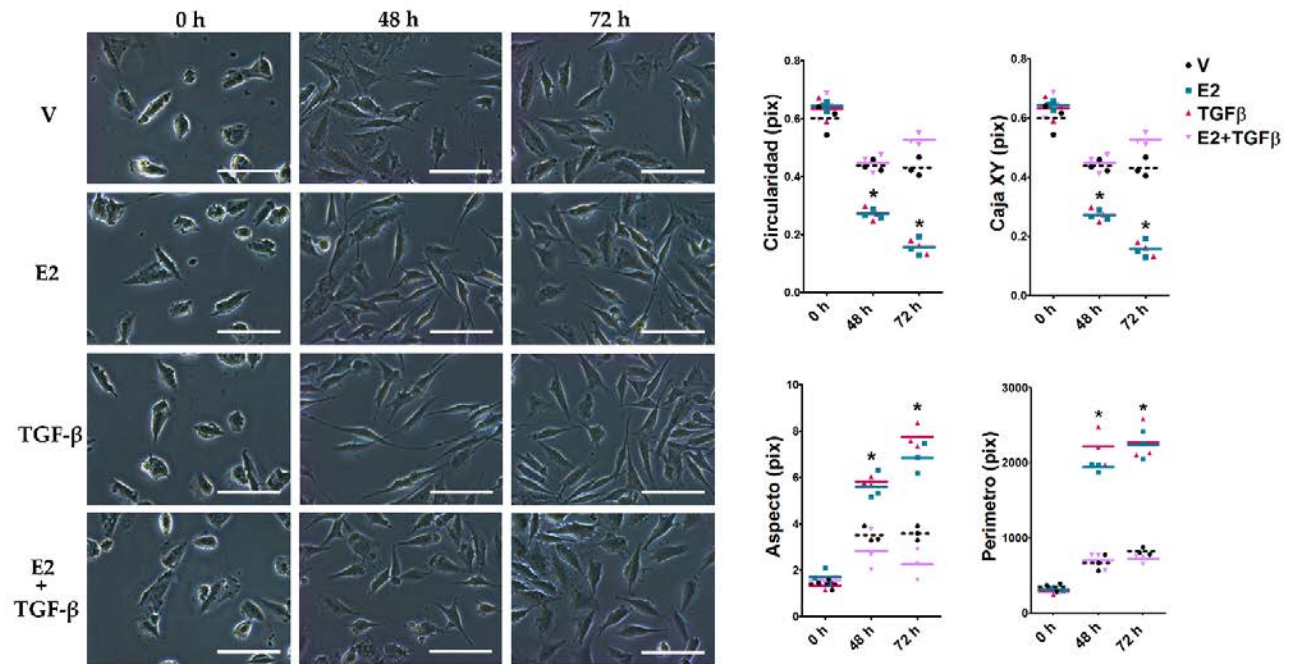


**FIGURA 9. Cambios morfológicos en las células U251 y U87 por efecto del E2 y el TGF-β.** Las células (A) U251 y (B) U87 se observaron por microscopía de contraste de fases con un aumento de 400× a las 0, 48 y 72 h después de agregar los tratamientos con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF-β (10 ng/ml) y E2+TGF-β. A la izquierda, se presentan las imágenes representativas de las células. Desde las 48 h, las células que recibieron el tratamiento con E2 y TGF-β, presentaron un aspecto fusiforme en comparación con el V, mientras que en el tratamiento conjunto este efecto se inhibió. Barra de aumento blanca=100 μm. A la derecha, en las gráficas que representan la cuantificación de los parámetros geométricos (circularidad, caja XY, aspecto, perímetro) se observa que los cambios inducidos por los tratamientos de E2 y TGF-β fueron estadísticamente significativos. \* $p < 0.05$  vs V y E2+TGF-β; media  $\pm$  EEM,  $n=3$ .

### A. Células T98G



### B. Células LN229



**FIGURA 10. Cambios en la morfología en las células T98G y LN229 por efecto del E2 y el TGF-β.** Las células (A) T98G y (B) LN229 se observaron por microscopía de contraste de fases con un aumento de 400× a las 0, 48 y 72 h después de agregar los tratamientos con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF-β (10 ng/ml) y E2+TGF-β. A la izquierda se presentan las imágenes representativas de las células. Desde las 48 h, las células que recibieron el tratamiento con E2 y TGF-β, presentaron un aspecto fusiforme en comparación con el V, mientras que en el tratamiento conjunto este efecto se inhibió. Barra de aumento blanca=100 μm. A la derecha, en las gráficas que representan la cuantificación de los parámetros geométricos (circularidad, caja XY, aspecto, perímetro) se observa que los cambios inducidos por los tratamientos de E2 y TGF-β fueron estadísticamente significativos. \*p<0.05 vs V y E2+TGF-β; media ± EEM, n=3.

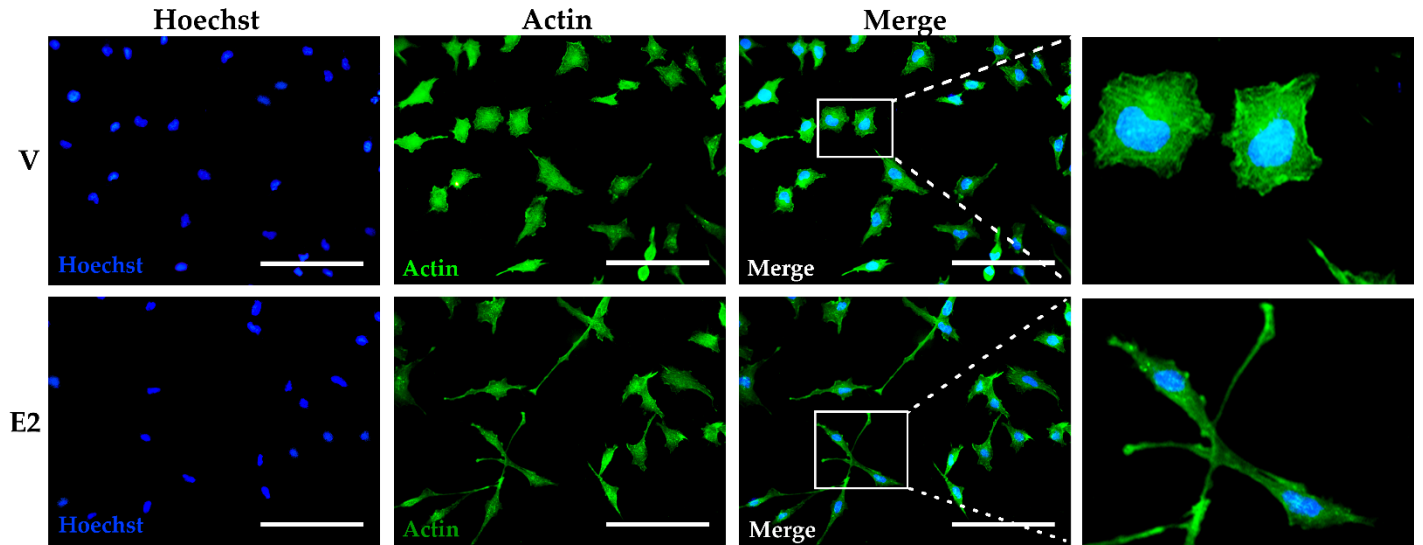


### 7.3 Reorganización de los filamentos de actina por efecto del E2

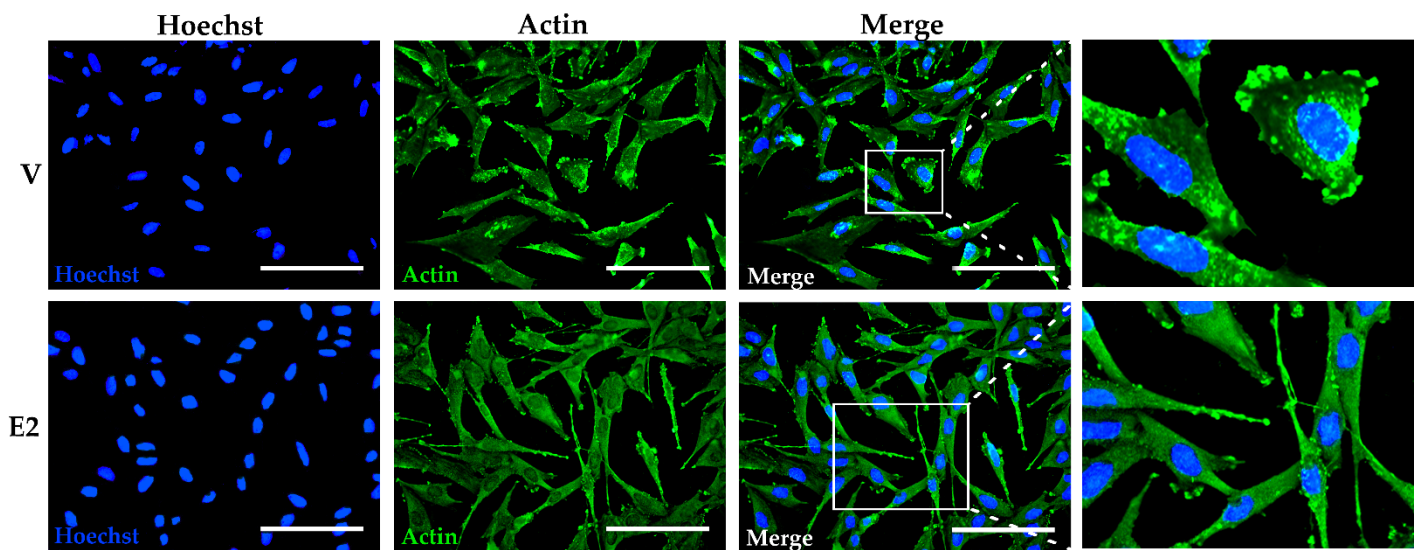
Los cambios progresivos en la morfología celular están acompañados por la reorganización de los filamentos de actina. Las células que inducen la EMT, reorganizan los delgados filamentos de actina que se encuentran principalmente en la superficie cortical de las células, en filamentos gruesos que contienen fibras de tensión (*stress fibers*) dinámicas que permiten el alargamiento de las células y la motilidad direccional (O'Neill 2009). Para determinar si los cambios morfológicos observados anteriormente están relacionados con cambios en la estructura de los filamentos de actina, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia (**Figura 11**). En las células U251 incubadas con vehículo, los filamentos de actina estuvieron predominantemente organizados en haces que formaban una malla reticulada densa, estructura característica de la actina cortical. En contraste, en las células que fueron tratadas por 48 h con E2 (10 nM), los filamentos de actina se ensamblaron en paralelo a lo largo de la superficie ventral de la célula, formando largas proyecciones hacia el borde *delantero*, las cuales en el extremo mostraron sitios focales con alta concentración de actina. Por su parte, en las células U87 no se observaron los filamentos de actina con suficiente claridad. Sin embargo, en estas células se observó en los bordes corticales una mayor proporción de puntos focales concentrados de actina, tanto en las células que recibieron tratamiento con E2 como en las que no. No obstante, las células que se incubaron con E2, presentaron largas proyecciones de filamentos paralelos con alta concentración de actina en todo el borde.

Estos resultados revelan que la morfología observada en las células tanto por microscopía de fases como por inmunofluorescencia fue equivalente en las células U251 y U87. Por lo tanto, los cambios morfológicos inducidos por efecto del E2 están relacionados con una reorganización de los filamentos de actina.

## Células U251



## Células U87



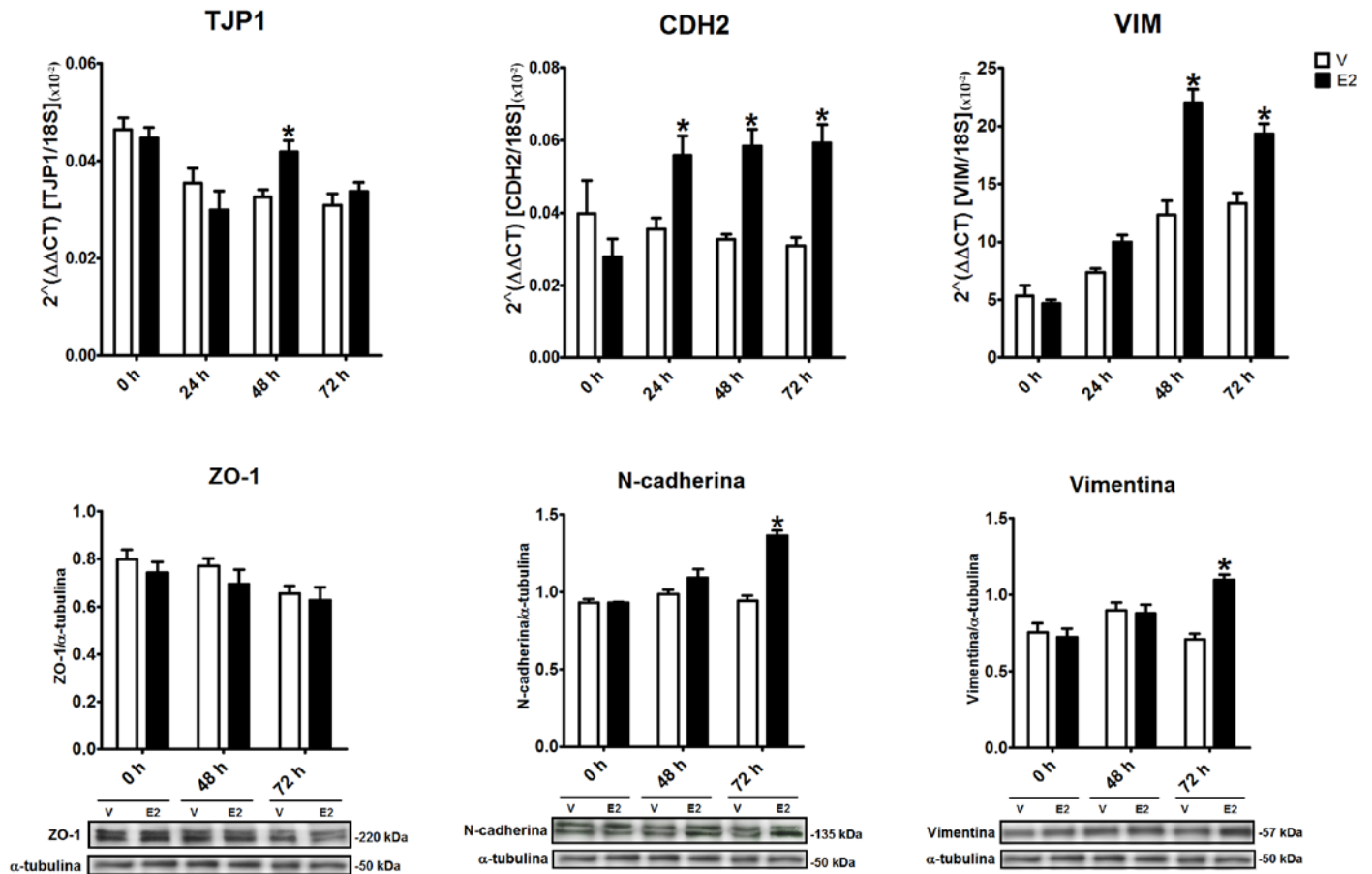
**FIGURA 11.** Efecto del E2 en la organización de los filamentos de actina de las células U251 y U87. Las células fueron tratadas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%) y E2 (10 nM) por 48 h. La organización de los filamentos fue evaluada a través de un ensayo de inmunofluorescencia para reconocer actina. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia y se capturaron imágenes con un aumento de 400× en seis campos arbitrarios en cada grupo experimental. Las células que recibieron el tratamiento con E2 presentaron cambios en la estructura de los filamentos de actina, denotado por un aspecto fusiforme con largas proyecciones en comparación con el vehículo. Barra de aumento blanca=100 µm.

#### 7.4 El tratamiento con E2 incrementó la expresión de marcadores de la EMT

La EMT es un proceso celular que, en respuesta a diversas vías de señalización, activa EMT-TFs que modifican la expresión de genes que determinan el fenotipo celular. Durante la transición, se lleva a cabo la represión de genes epiteliales, principalmente aquellos que forman parte de los complejos de unión intercelular; al mismo tiempo que se activa la expresión de genes que caracterizan al fenotipo mesenquimal, como componentes del citoesqueleto y proteínas de membrana que interactúan con la ECM. Por lo tanto, una estrategia ampliamente utilizada para caracterizar la EMT es la evaluación de la expresión de estas proteínas, que se utilizan como marcadores del fenotipo epitelial o mesenquimal (Lamouille et al. 2014). En este estudio, se utilizó como marcador epitelial a la proteína periférica de membrana *zonula occludens 1* (ZO-1, codificada por el gen TJP1), que se une a claudinas y ocludinas para formar uniones estrechas entre las células. Los marcadores del fenotipo mesenquimal estudiados fueron la N-cadherina (codificada por el gen CDH2), una proteína transmembranal que media las interacciones célula-célula y está muy involucrada en la migración celular; y la vimentina (codificada por el gen VIM), una proteína de filamentos intermedios tipo III que estabiliza las interacciones de un citoesqueleto muy dinámico. Para evaluar el efecto que tiene el E2 (10 nM) sobre la expresión de estos tres marcadores en las células U251 y U87, se realizó un curso temporal de la expresión a nivel del mRNA por RT-qPCR y, a nivel de la proteína por western blot.

El E2 incrementó significativamente la expresión del gen TJP1 que codifica a la proteína ZO-1 en las células U251 únicamente a las 48 h, el de CDH2 desde las 24 h y el de VIM desde las 48 h. En cambio, el contenido de la proteína ZO-1 no presentó cambios por efecto de la hormona, mientras que las proteínas N-cadherina y vimentina aumentaron hasta las 72 h con E2 (**Figura 12**). El análisis de la expresión de los tres marcadores por inmunofluorescencia nos permitió determinar su localización subcelular. En general, la intensidad de fluorescencia de los tres marcadores aumentó significativamente en las células U251 que fueron tratadas con E2 (**Figura 13**). En el caso de las proteínas de membrana ZO-1 y N-cadherina, las células que fueron tratadas con vehículo mostraron puntos de alta expresión en regiones localizadas sobre la membrana, particularmente en los sitios de unión celular. Sin embargo, en las células que recibieron el tratamiento con E2, aumentó la expresión de ambas proteínas a lo largo de toda la superficie celular, especialmente en las largas proyecciones de los extremos celulares. Por su parte, los filamentos de vimentina se ensamblaron formando una red dentro del citoplasma en las células sin E2, mientras que en las células incubadas con E2, los filamentos se estructuraron paralelos a lo largo de la superficie ventral de la célula, particularmente sobre los extremos celulares, de manera similar a los filamentos de actina.

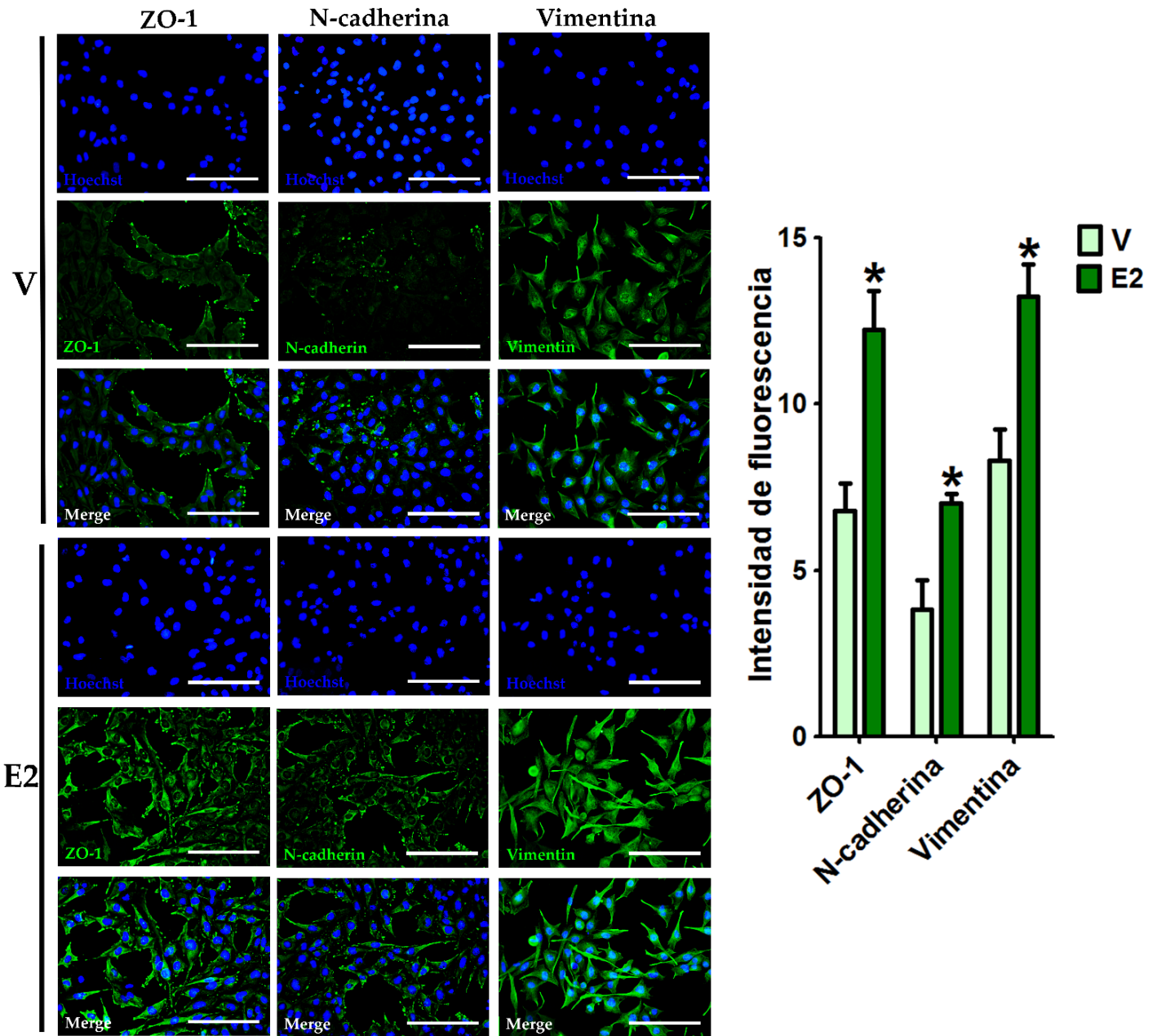
## Células U251



**FIGURA 12. Efecto del E2 sobre la expresión de los marcadores de la EMT en las células U251.** Las células U251 se trataron con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%) y E2 (10 nM) por 0, 24, 48 y 72 horas. (A) Se cuantificó la expresión del gen epitelial TJP1, y de los genes mesenquimales VIM y CDH2, por RT-qPCR usando el método comparativo  $2^{\Delta\Delta Ct}$  con respecto al gen de referencia 18S rRNA. La expresión de los tres marcadores aumentó por efecto del E2 en comparación con el vehículo con dinámicas temporales diferentes. (B) El contenido de ZO-1, vimentina y N-cadherina se determinó por Western blot. Se presenta el análisis densitométrico de la expresión de los marcadores con sus respectivas bandas representativas. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Únicamente aumentó la expresión de N-cadherina y de vimentina a las 72 h. \* $p < 0.05$  vs V; media  $\pm$  EEM, n= 3.



## Células U251

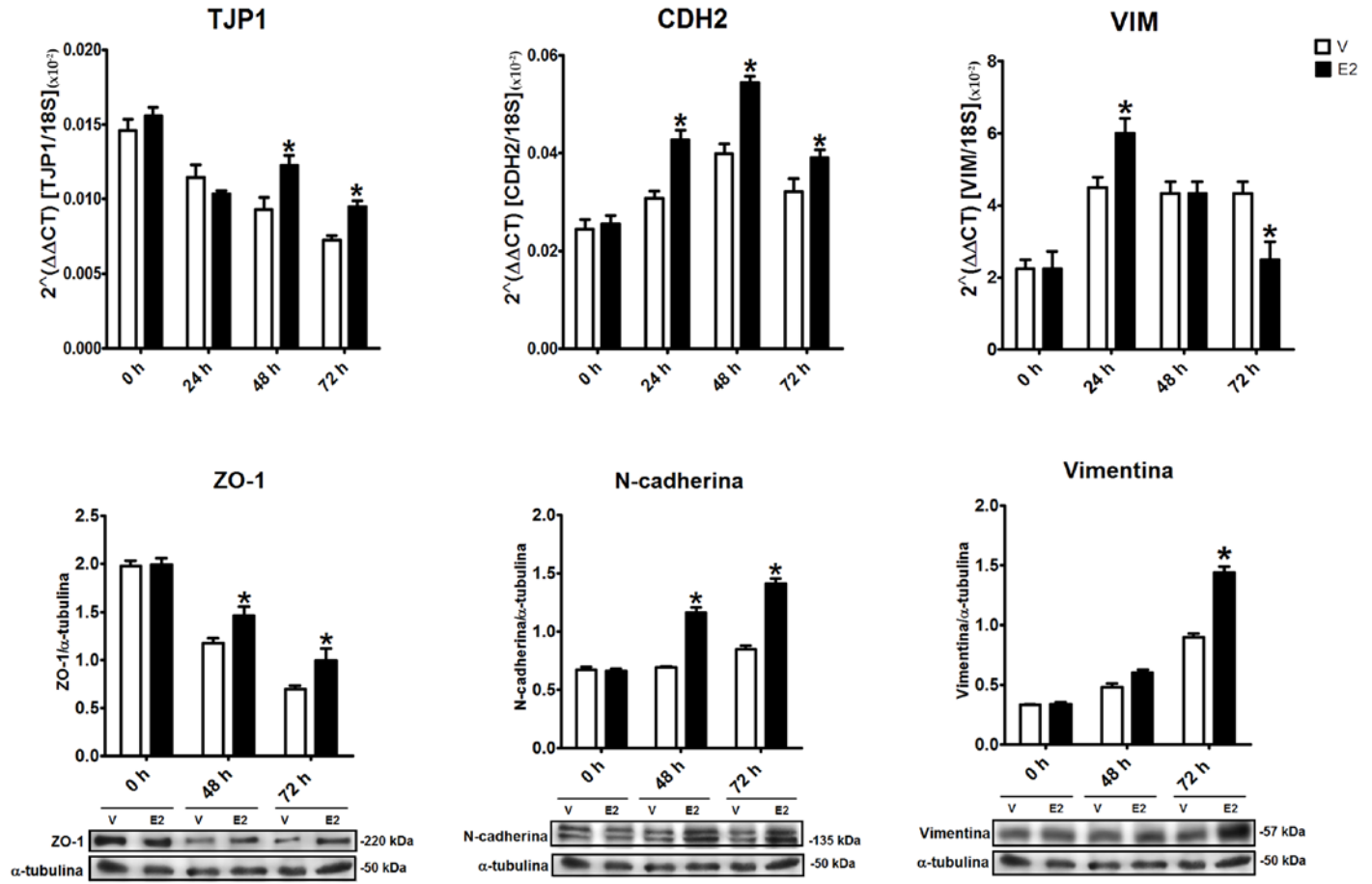


**FIGURA 13.** Efecto del E2 sobre la expresión de los marcadores de la EMT en las células U251. Las células U251 se trataron con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%) y E2 (10 nM) por 48 horas. La expresión de los marcadores de la EMT fue evaluada a través de un ensayo de inmunofluorescencia contra ZO-1, N-cadherina y vimentina. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia y se capturaron imágenes con un aumento de 400× en seis campos arbitrarios en cada grupo experimental. La intensidad de fluorescencia de los tres marcadores aumentó significativamente en las células que recibieron el tratamiento de E2 con respecto a las que solo recibieron vehículo. Barra de aumento blanca=100 µm. \* $p < 0.05$  vs V; media  $\pm$  EEM,  $n = 3$ .

Las células U87 mostraron un comportamiento muy similar al de las células U251 (**Figura 14**). Con respecto al vehículo, el tratamiento con E2 aumentó significativamente la expresión de TJP1 y ZO-1 desde las 48 h; CDH2 desde las 24 h y N-cadherina desde las 48 h; VIM solo aumentó a las 24 h, y su expresión disminuyó a las 72h, mientras que el contenido de vimentina solo aumentó a las 72 h. Asimismo, la expresión de los marcadores evaluada por inmunofluorescencia también mostró que en las células tratadas con vehículo, las proteínas ZO-1 y N-cadherina se expresaron únicamente en regiones discretas de la membrana celular, mientras que el tratamiento con E2 promovió que la expresión de ambas proteínas aumentara a lo largo de toda la membrana. Por otro lado, en las células sin E2 los filamentos de vimentina se ensamblaron en forma de red dentro del citoplasma, mientras que en las células incubadas con E2, los filamentos se estructuraron de manera similar a los filamentos de actina, paralelos a lo largo de la superficie ventral de la célula (**Figura 15**).

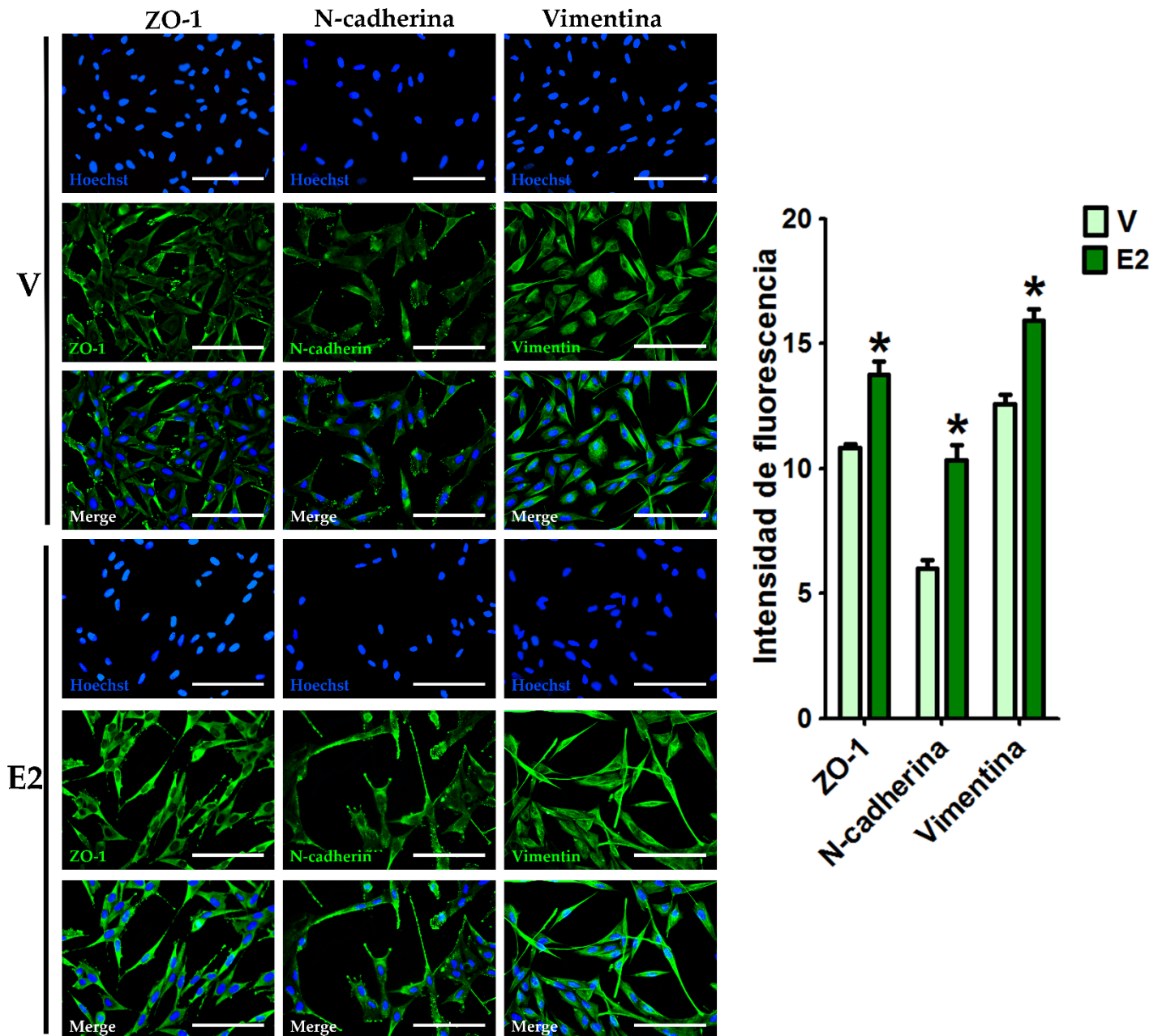
Estos resultados revelan que el E2 regula la expresión de marcadores de la EMT. La regulación del E2 sobre la expresión de ZO-1 fue diferente entre las células U251 y U87, posiblemente debido a los diferentes perfiles de expresión entre estas células. Sin embargo, en ambas líneas celulares, el E2 aumentó significativamente la expresión de marcadores mesenquimales, lo que sugiere que esta hormona promueve el fenotipo mesenquimal de las células derivadas de GBM humano.

# Células U87



**FIGURA 14. Efecto del E2 sobre la expresión de los marcadores de la EMT en las células U87.** Las células U87 se trataron con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%) y E2 (10 nM) por 0, 24, 48 y 72 horas. (A) Se cuantificó la expresión del gen epitelial TJP1, y de los genes mesenquimales VIM y CDH2, por RT-qPCR usando el método comparativo  $2^{\Delta\Delta Ct}$  con respecto al gen de referencia 18S rRNA. La expresión de los tres marcadores aumentó por efecto del E2 en comparación con el vehículo con dinámicas temporales diferentes. (B) El contenido de ZO-1, vimentina y N-cadherina se determinó por Western blot. Se presenta el análisis densitométrico de la expresión de los marcadores con sus respectivas bandas representativas. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. La expresión de los tres marcadores aumentó por efecto del E2 en comparación con el vehículo, desde las 48h en el caso de ZO-1 y N-cadherina, y a las 72h en la vimentina. \* $p < 0.05$  vs V; media  $\pm$  EEM, n= 3.

## Células U87



**FIGURA 15.** Efecto del E2 sobre la expresión de los marcadores de la EMT en las células U87. Las células U87 se trataron con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%) y E2 (10 nM) por 48 horas. La expresión de los marcadores de la EMT fue evaluada a través de un ensayo de inmunofluorescencia contra ZO-1, N-cadherina y vimentina. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia y se capturaron imágenes con un aumento de 400× en seis campos arbitrarios en cada grupo experimental. La intensidad de fluorescencia de los tres marcadores aumentó significativamente en las células que recibieron el tratamiento de E2 con respecto a las que solo recibieron vehículo. Barra de aumento blanca=100 µm. \* $p < 0.05$  vs V; media  $\pm$  EEM, n= 3.

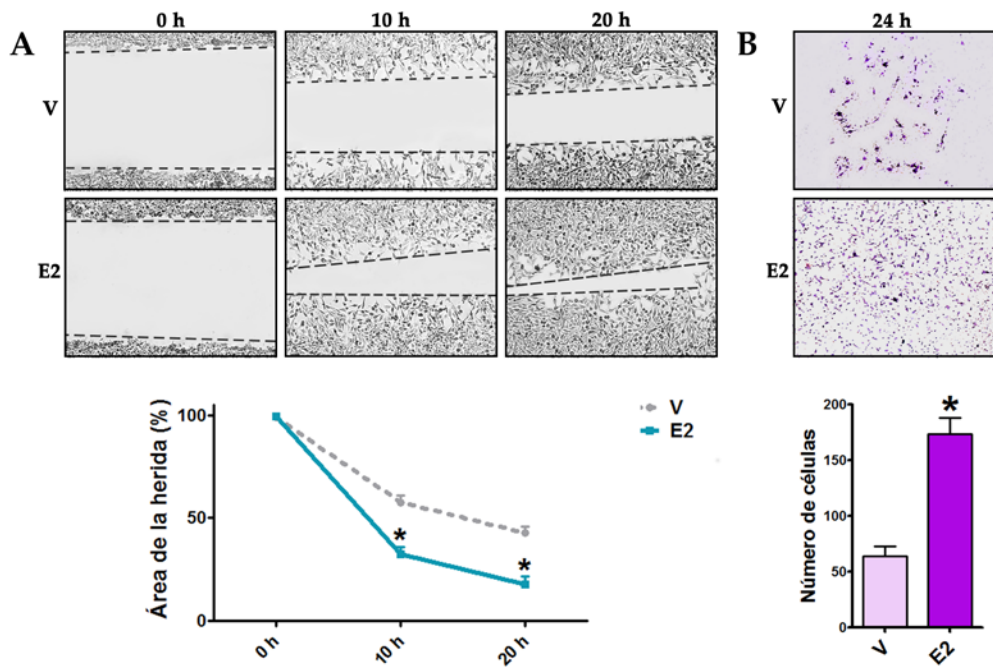
## 7.5 El E2 promueve la migración e invasión en las células de GBM

Una de las principales consecuencias funcionales de las células que se someten a la EMT es la adquisición de capacidades migratorias e invasivas, ya que tanto los cambios en la expresión génica como la reorganización de los filamentos de actina permiten: 1) la individualización celular por el rompimiento de uniones intercelulares; 2) la formación de una polaridad frente-trasera con proyecciones de fibras de tensión de actina dinámicas en los bordes delanteros y; 3) la expresión de diversas proteínas que facilitan el movimiento celular dentro de la ECM. Por lo tanto, la evaluación del grado de migración e invasión celular es una parte fundamental de la caracterización de la EMT.

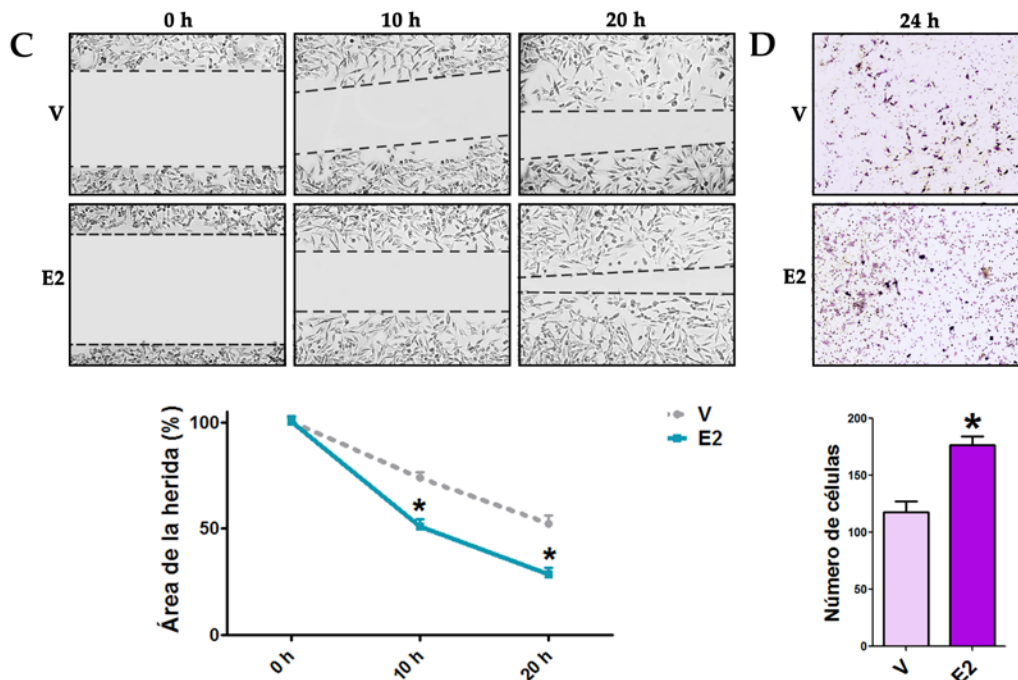
En este estudio, la migración celular se evaluó por medio del ensayo de cierre de herida (*wound healing assay*), que consistió en generar una herida sobre una monocapa de células confluentes y medir en determinados intervalos de tiempo el área de la herida, la cual progresivamente se iba cerrando por las células que migraban hacia ésta. Las células que tienen una alta capacidad de migración cierran rápidamente la herida. Por otro lado, la invasión celular se evaluó usando el ensayo de *transwell*, que está basado en el uso de un inserto que contiene una membrana de policarbonato en la parte inferior con poros de 8  $\mu\text{m}$  que retienen a las células que hayan logrado cruzar el gel ECM, que está compuesto de una mezcla de proteínas secretadas por las células de sarcoma de ratón *Engelbreth-Holm-Swarm*, y que se asemeja a la ECM. Este complejo de proteínas es degradado por las células que, al detectar un quimioatrayente (en este caso es el SFB al 10% en el medio que se agrega por debajo de inserto), tienen la capacidad de invadir el gel y, eventualmente llegan a la membrana de policarbonato, en donde se queda retenidas y posteriormente se tiñen con colorante de cristal violeta para contabilizarlas.

Las células U251 que fueron tratadas con E2 (10 nM) cerraron la herida más rápido desde las 10 h de tratamiento, en comparación con las células que solamente fueron tratadas con vehículo (**Figura 16A**). Asimismo, el E2 provocó que un mayor número de células U251 invadiera el gel de ECM que las células que no recibieron la hormona (**Figura 16B**). De la misma forma, el tratamiento con E2 en las células U87 incrementó la velocidad del cierre de la herida (**Figura 16C**) y el número de células que invadieron el gel de ECM (**Figura 16D**). Estos datos revelan que el tratamiento con E2, además de cambiar la morfología celular y regular la expresión de marcadores de la EMT, también aumenta la capacidad migratoria e invasiva de las células derivadas de GBM.

### Células U251



### Células U87



**FIGURA 16. El E2 incrementa la migración e invasión de células de GBM.** Análisis de la capacidad migratoria e invasiva de las células U251 y U87 que fueron tratadas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%) y E2 (10 nM). **(A-B)** Los ensayos de cierre de herida (*wound healing*) determinaron la capacidad migratoria de las células. Se presentan las imágenes representativas del cierre de la herida a las 0, 10 y 20 horas, así como la cuantificación del área de la herida en los tres tiempos. El E2 incrementó la capacidad migratoria de las células U251 y U87. **(C-D)** El ensayo de *Transwell* determinó el potencial de invasión de las células. Las células que invadieron se observan teñidas con colorante cristal violeta al 0.1%. Las imágenes representativas de las células que invadieron la membrana, así como la cuantificación del número de estas células, revelan que el tratamiento con E2 incrementó el potencial invasivo de las células U251 y U87. \* $p < 0.05$  vs V; media  $\pm$  EEM,  $n = 3$ .

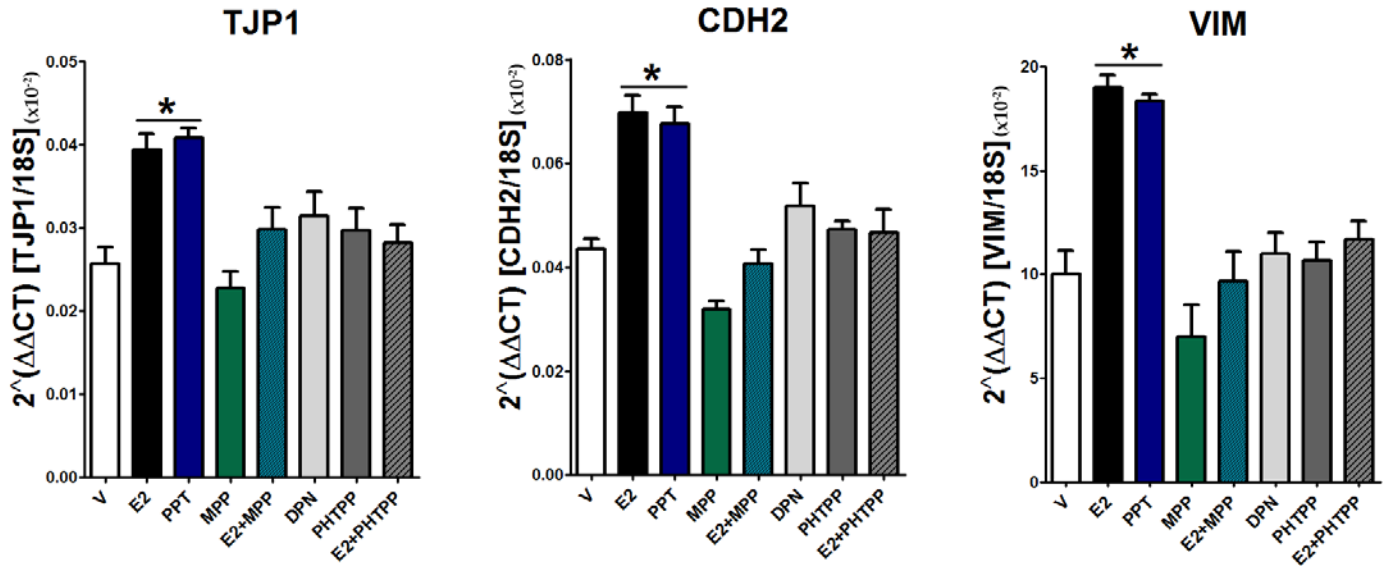
## 7.6 Los efectos del E2 asociados a la EMT son regulados a través del ER- $\alpha$

El E2 ejerce sus efectos a través de varios tipos de receptores. Existen dos subtipos de receptores intracelulares específicos a estrógenos, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , que son factores de transcripción activados por ligando que regulan directamente la expresión génica. Para determinar el subtipo de receptor intracelular a través del cual el E2 promovió los efectos asociados a la EMT, se utilizaron agonistas y antagonistas específicos a los dos subtipos del ER para evaluar la expresión de los marcadores de la EMT y la migración celular. Para el ER- $\alpha$ , se utilizó el PPT como agonista y el MPP como antagonista. En cambio, para el ER- $\beta$  se utilizó el DPN como agonista y el PHTPP como antagonista.

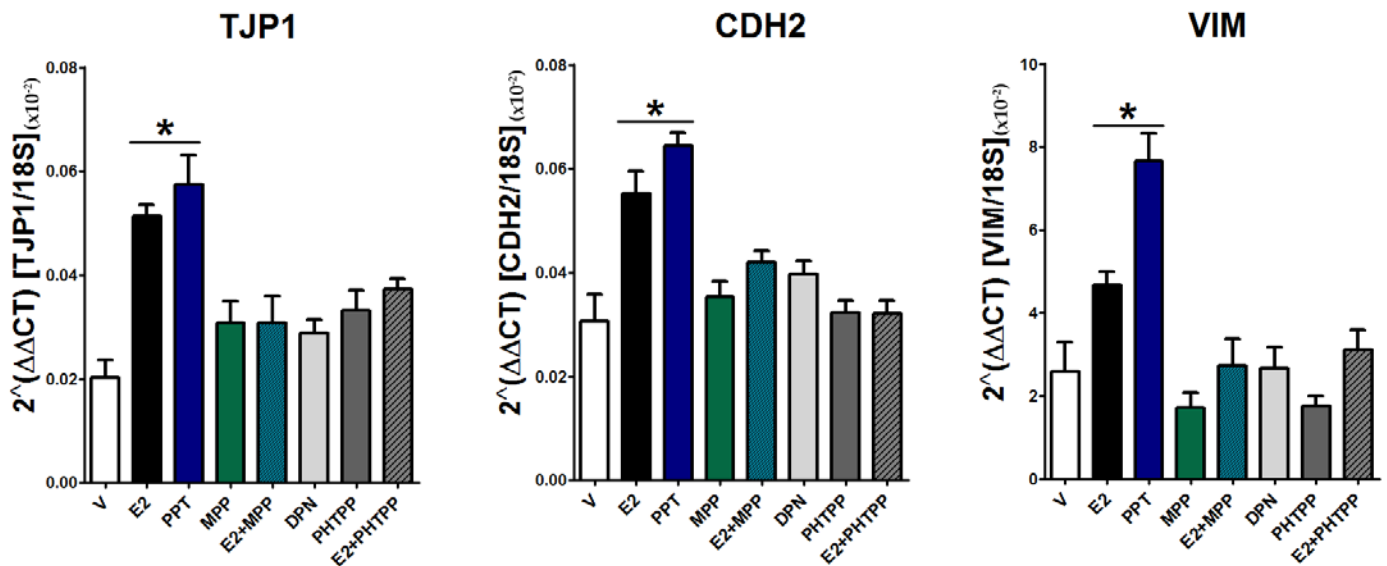
El tratamiento con el PPT, agonista selectivo al ER- $\alpha$ , incrementó la expresión de los genes TJP1, CDH2 y VIM en las células U251 y U87 (**Figura 17A-B**). Asimismo, el antagonista del ER- $\alpha$  (MPP) bloqueó los efectos del E2 en ambos tipos celulares. Los tratamientos con el agonista y antagonista selectivos al ER- $\beta$  no mostraron tener ningún efecto significativamente estadístico en la regulación de la expresión de los marcadores de la EMT ni en las células U251 ni en U87 (**Figura 17A-B**). Estos datos sugieren que la regulación del E2 sobre la expresión de los marcadores de la EMT es llevada a cabo a través del subtipo ER- $\alpha$ . Para verificar funcionalmente el papel del ER- $\alpha$  en el proceso de la EMT, se llevaron a cabo ensayos de cierre de herida usando el agonista PPT y el antagonista MPP. Las células U251 que fueron tratadas con PPT cerraron rápidamente la herida desde las 10 h en comparación con las células que solo recibieron el vehículo, mientras que el antagonista MPP bloqueó el efecto del PPT (**Figura 18A**). De manera similar, el tratamiento con PPT incrementó la velocidad del cierre de la herida de las células U87 en comparación con el vehículo, y el tratamiento conjunto con MPP bloqueó los efectos del agonista (**Figura 18B**).



## A. Células U251



## B. Células U87



**FIGURA 17.** Efecto de agonistas y antagonistas selectivos de ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  sobre la expresión de marcadores de la EMT en las células de GBM. Las células U251 (A) y U87 (B) se trataron por 48 horas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%+DMSO al 0.01%), E2 (10 nM), PPT (10 nM, agonista selectivo al ER- $\alpha$ ), MPP (1  $\mu$ M, antagonista selectivo al ER- $\alpha$ ), tratamiento conjunto de E2+MPP, DPN (10 nM, agonista selectivo al ER- $\beta$ ), PHTPP (1 $\mu$ M, antagonista selectivo al ER- $\beta$ ) y el tratamiento conjunto de E2+PHTPP. Se cuantificó la expresión del gen epitelial TJP1, y de los genes mesenquimales VIM y CDH2, por RT-qPCR usando el método comparativo  $2^{\Delta\Delta Ct}$  con respecto al gen de referencia 18S rRNA. La expresión de los tres marcadores aumentó por efecto del PPT de manera similar al E2, y el tratamiento conjunto con el MPP bloqueó los efectos del E2. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM, n= 3. \*p<0.05 vs todos los demás grupos.

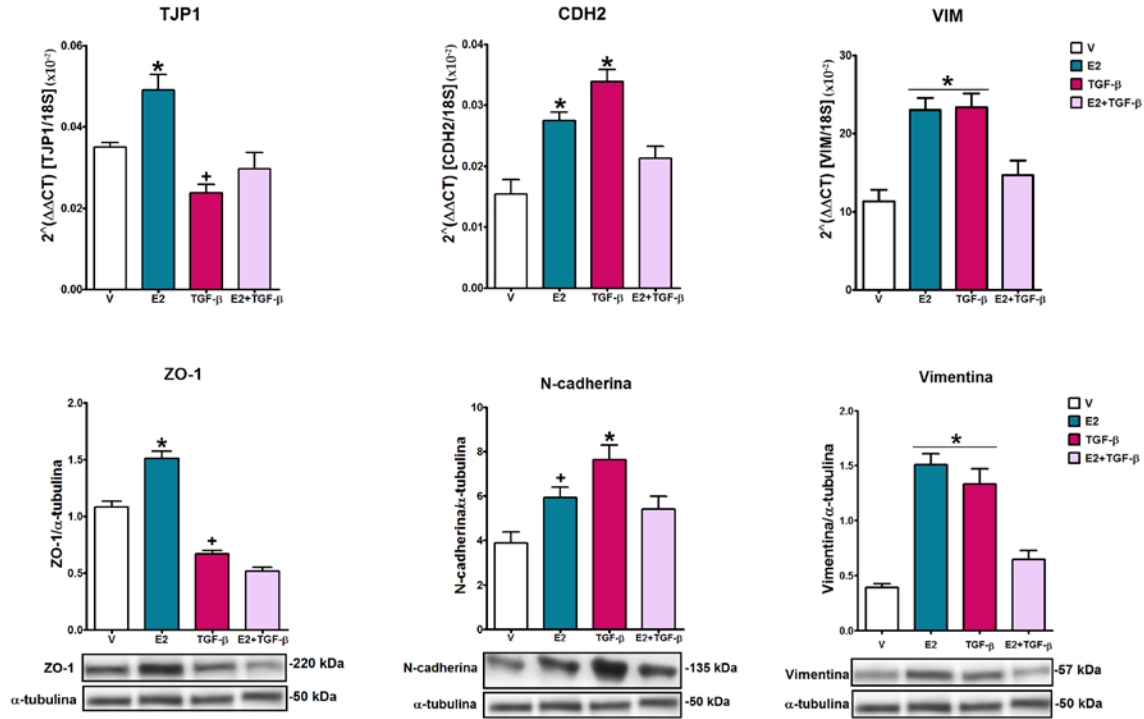


**FIGURA 18. Efecto del agonista y antagonista selectivos de ER- $\alpha$  en la migración de las células de GBM.** Análisis de la capacidad migratoria de las células (A) U251 y (B) U87 que fueron tratadas durante 20 horas con vehículo (V: DMSO al 0.01%), PPT (10 nM, agonista selectivo al ER- $\alpha$ ), MPP (1  $\mu$ M, antagonista selectivo al ER- $\alpha$ ) y el tratamiento conjunto de PPT+MPP. Los ensayos de cierre de herida (*wound healing*) determinaron la capacidad migratoria de las células U87. Se presentan las imágenes representativas del cierre de la herida a las 0, 10 y 20 horas, así como la cuantificación del área de la herida en los tres tiempos. El PPT incrementó la capacidad migratoria de las células y el antagonista MPP bloqueó sus efectos. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM, n= 3. \*p<0.05 vs todos los demás grupos.

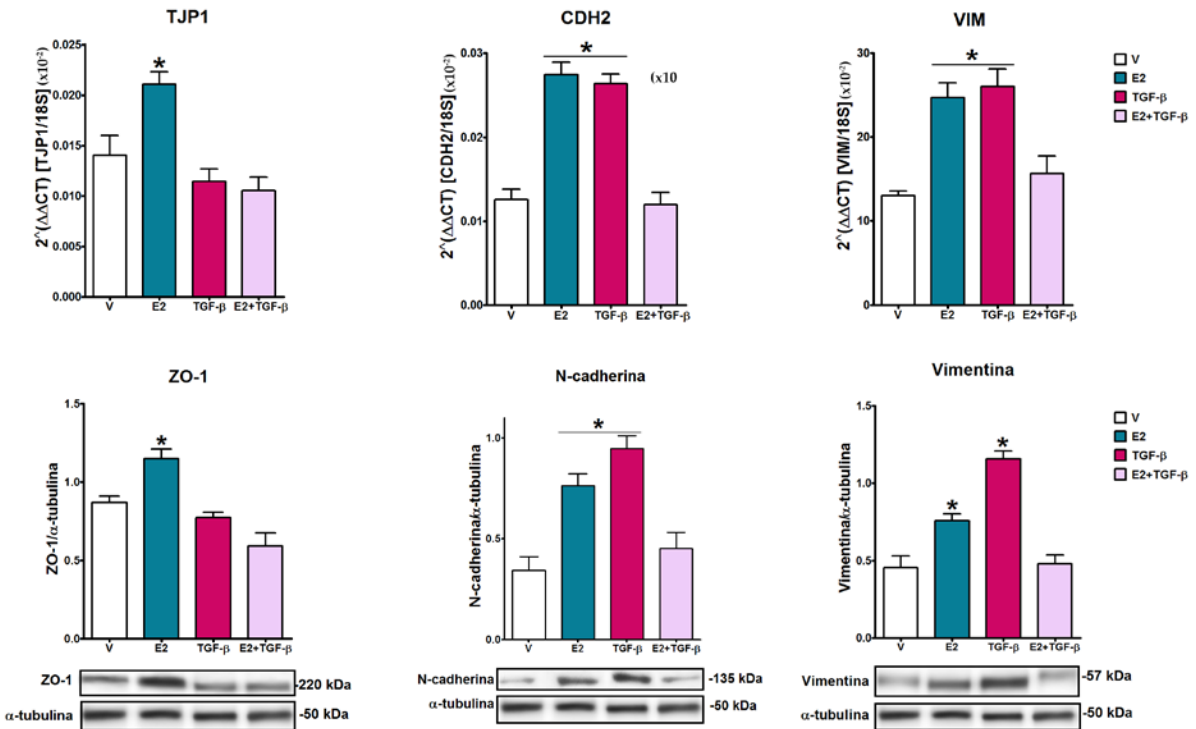
## 7.7 El E2 y el TGF- $\beta$ inhiben mutuamente sus efectos sobre la expresión de los marcadores de la EMT

Diversos estudios han establecido el entrecruzamiento de la vía de señalización canónica del TGF- $\beta$  con la señalización del E2 (Ito et al. 2010; Malek et al. 2006; Matsuda et al. 2001; Schwartz et al. 2016; Wu et al. 2003). Esta intercomunicación de las dos vías de señalización no se ha estudiado en el contexto del GBM. Anteriormente, se mostró en este trabajo que el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  bloquea los cambios morfológicos que ambos inductores provocan individualmente en las células (**Figuras 9-10**); por lo que ahora, se evaluó el efecto del E2 con el TGF- $\beta$  sobre la expresión de los marcadores de la EMT en las células de GBM (**Figura 19**). Se ha demostrado ampliamente que la red de señalización del TGF- $\beta$  juega un papel importante en la EMT (Xu et al. 2009). En las células U251, el tratamiento con TGF- $\beta$  disminuyó la expresión de TJP1 y aumentó la expresión de CDH2 y VIM. Asimismo, este resultado se replicó a nivel de proteína, ya que el TGF- $\beta$  disminuyó la expresión de ZO-1 y aumentó la expresión de N-cadherina y vimentina. La regulación del TGF- $\beta$  sobre la expresión de los marcadores de la EMT utilizados se diferencia de la regulación del E2, ya que el tratamiento con E2 aumentó la expresión de los tres marcadores (**Figura 19A**). En cambio, en las células U87 el TGF- $\beta$  no modificó los niveles de TJP1 ni de ZO-1, pero sí aumentó la expresión de los marcadores mesenquimales (**Figura 19B**). En ambas líneas celulares, el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  inhibió los efectos tanto del E2 como del TGF- $\beta$  en la regulación de la expresión de los marcadores mesenquimales. Sin embargo, el efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de TJP1/ZO-1 en las células U251 no se inhibió por E2, pero sí el efecto del E2 por TGF- $\beta$ . Estos datos sugieren que la vía de señalización del E2-ER- $\alpha$  interactúa en algún punto con la vía del TGF- $\beta$ , por lo que los efectos de ambos factores sobre la expresión de los marcadores mesenquimales se inhiben mutuamente.

### A. Células U251



### B. Células U87



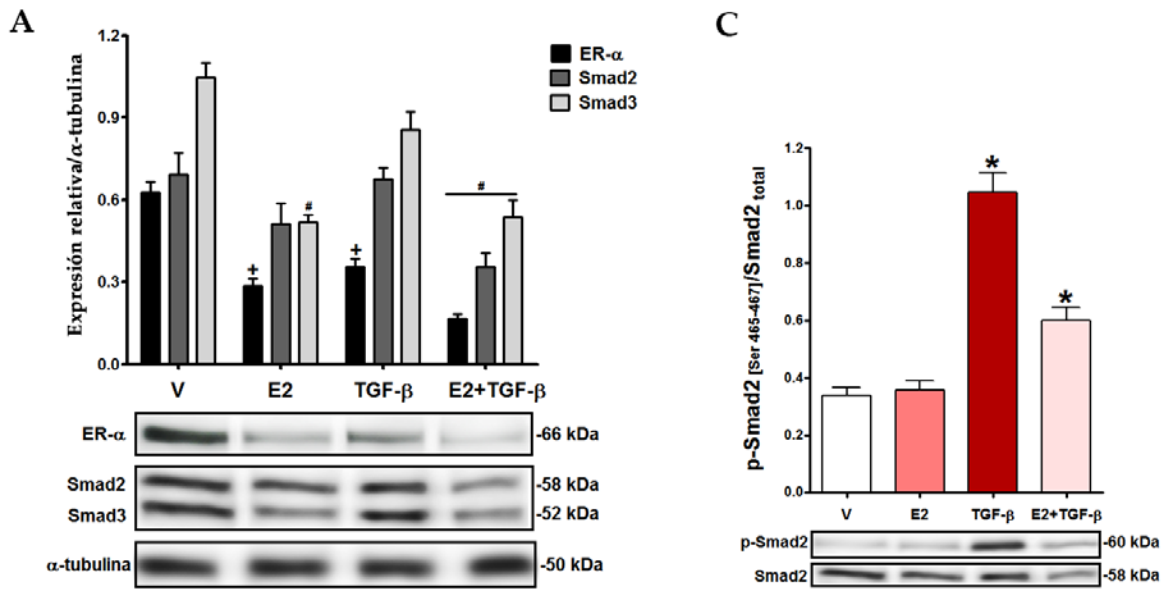
**FIGURA 19.- Efectos del E2 y TGF- $\beta$  en la regulación de la expresión de los marcadores de la EMT en las células de GBM.** Las células (A) U251 y (B) U87 se trataron por 48 horas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF- $\beta$  (10 ng/ml) y E2+TGF- $\beta$ . Se cuantificó la expresión del gen epitelial TJP1, y de los genes mesenquimales VIM y CDH2, por RT-qPCR usando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  con respecto al gen de referencia 18S rRNA. El contenido de ZO-1, vimentina y N-cadherina se determinó por Western blot. Se presenta el análisis densitométrico de la expresión de los marcadores con sus respectivas bandas representativas. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. \* $p < 0.05$  vs todos los demás grupos; + $p < 0.05$  vs V y E2/TGF- $\beta$ ; media  $\pm$  EEM,  $n = 3$ .

## 7.8 El E2 inhibe la vía de señalización del TGF- $\beta$ al disminuir tanto la expresión de Smad2 y Smad3, así como los niveles de fosforilación de Smad2

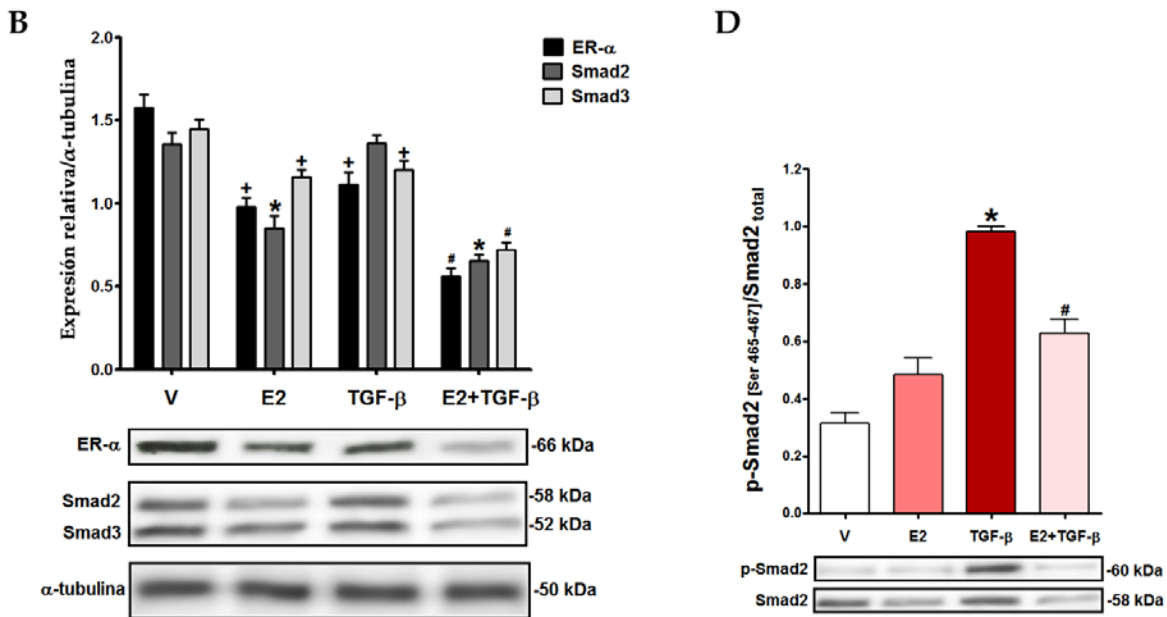
El TGF- $\beta$  activo se une al receptor de serina/treonina cinasa tipo II (T $\beta$ RII), lo que conduce al reclutamiento del T $\beta$ RI al complejo y su posterior fosforilación. La cascada de señalización está mediada por la fosforilación de Smads regulados por receptor (R-Smads), Smad2 y Smad3. Los R-Smads fosforilados forman un complejo con co-Smad, Smad4. Una vez formado, el complejo se transloca al núcleo donde recluta coactivadores transcripcionales como p300 y CBP [*CREB(cAMP response element-binding protein)-binding protein*] para inducir la acetilación y la activación de la expresión de genes blanco de TGF- $\beta$  (Xu et al. 2009). Los estudios que se han realizado con respecto al entrecruzamiento de la vía de señalización del E2 y TGF- $\beta$  han determinado que el ER- $\alpha$  inhibe la vía de señalización del TGF- $\beta$  al interactuar directamente con los efectores Smads, ya sea al inhibir su actividad por secuestro o por promover su degradación (Ito et al. 2010; Malek et al. 2006; Matsuda et al. 2001; Schwartz et al. 2016; Wu et al. 2003). Por lo tanto, en este estudio evaluamos los niveles de expresión del ER- $\alpha$  y de los efectores R-Smads, Smad2 y Smad3, por efecto del E2 y del TGF- $\beta$  (**Figura 20, A-B**). En las células U251 y U87 el tratamiento separado con E2 y TGF- $\beta$  disminuyó la expresión del ER- $\alpha$ , mientras que el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  la disminuyó aún más. La expresión de Smad2 disminuyó por efecto del E2 solo en las células U87, y por el tratamiento E2+TGF- $\beta$  en ambas líneas celulares. Mientras tanto, la expresión de Smad3 disminuyó por efecto del E2 y E2+TGF- $\beta$  en las células U251, y por E2, TGF- $\beta$  y E2+TGF- $\beta$  en las células U87. Por otro lado, también se evaluó el nivel de fosforilación de Smad2 en los residuos de serina 465 y 467 por efecto de los tratamientos con E2 y del TGF- $\beta$  (**Figura 20, C-D**). Tanto en las células U251 como en las U87, el TGF- $\beta$  aumentó considerablemente la fosforilación de Smad2 (*phospho-Smad2*, p-Smad2), mientras que el E2 bloqueó los efectos del TGF- $\beta$ .

Para evaluar la activación y subsecuente translocación al núcleo de los efectores R-Smads, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia contra Smad2/3 para evaluar su localización subcelular. Las células que recibieron vehículo y E2 como tratamiento mostraron al complejo Smad2/3 localizadas principalmente en el citoplasma; mientras que el tratamiento con TGF- $\beta$  mostró que la mayoría de las células tenía al complejo Smad2/3 localizado en el núcleo, sin embargo; el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  disminuyó la localización nuclear de Smad2/3 tanto en las células U251 (**Figura 21**) como en las células U87 (**Figura 22**).

Finalmente, estos datos revelan que el E2 inhibe la vía de señalización del TGF- $\beta$  por disminuir tanto la expresión de Smad2 y Smad3, así como los niveles de fosforilación de Smad2 y la subsecuente translocación al núcleo del complejo Smad2/3.

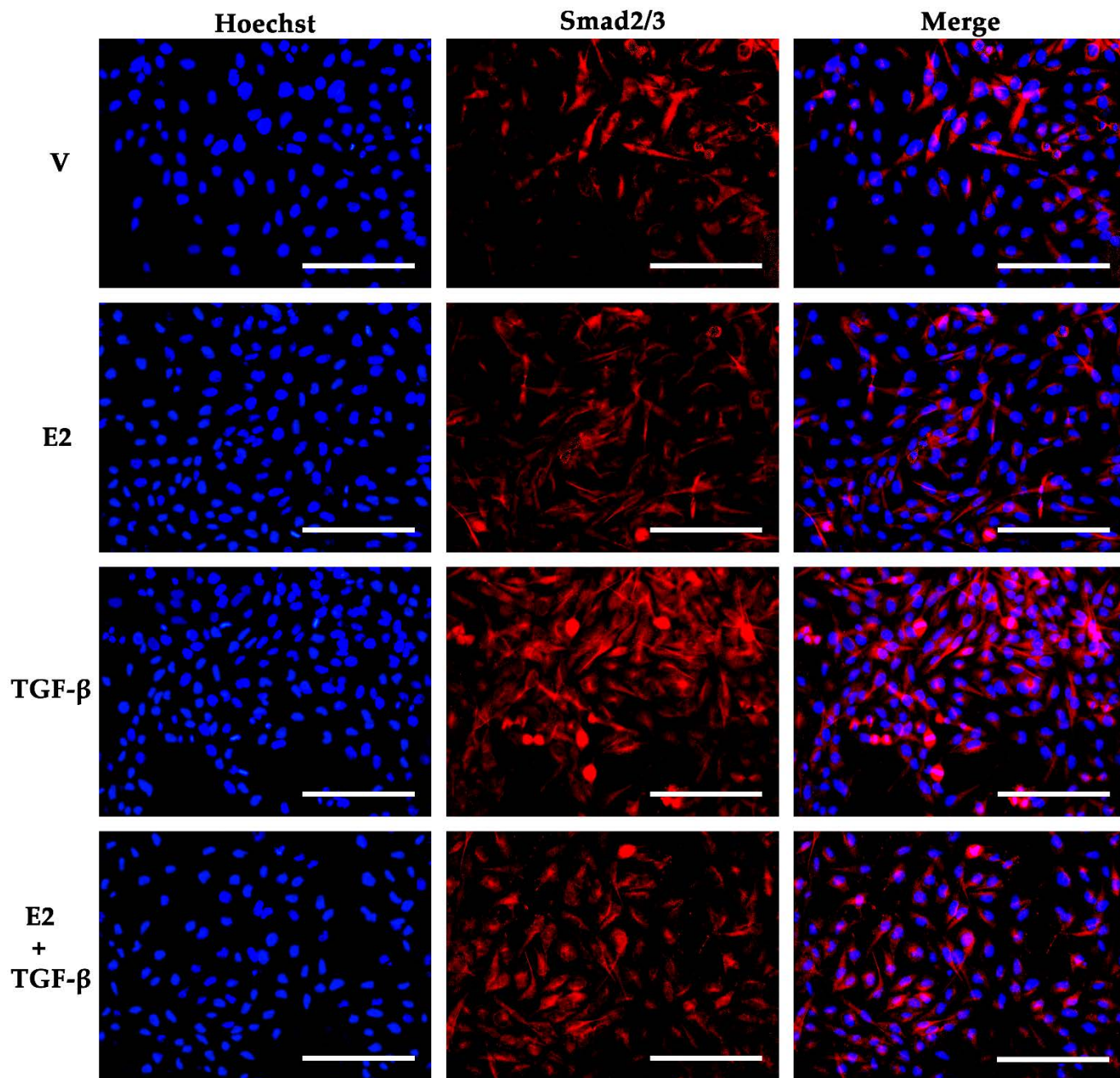


Células U87



**20.** El tratamiento conjunto de E2 y TGF- $\beta$  disminuye la expresión del ER- $\alpha$  y de los efectores Smad2 y Smad3, así como los niveles de fosforilación de SMAD2. Las células U251 y U87 se trataron por 48 horas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF- $\beta$  (10 ng/ml) y E2+TGF- $\beta$ . (A) El contenido del ER- $\alpha$ , de los efectores Smad2 y Smad3 y (B) Smad2 fosforilada en Los residuos de serina 465-467 (*phospho*-Smad2, p-Smad2), se determinó por Western blot. Se presenta el análisis densitométrico de la expresión de cada proteína con sus respectivas bandas representativas. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. \* $p < 0.05$  vs todos los demás grupos; # $p < 0.05$  vs V y TGF- $\beta$ ; + $p < 0.05$  vs V; media  $\pm$  EEM,  $n = 3$ .

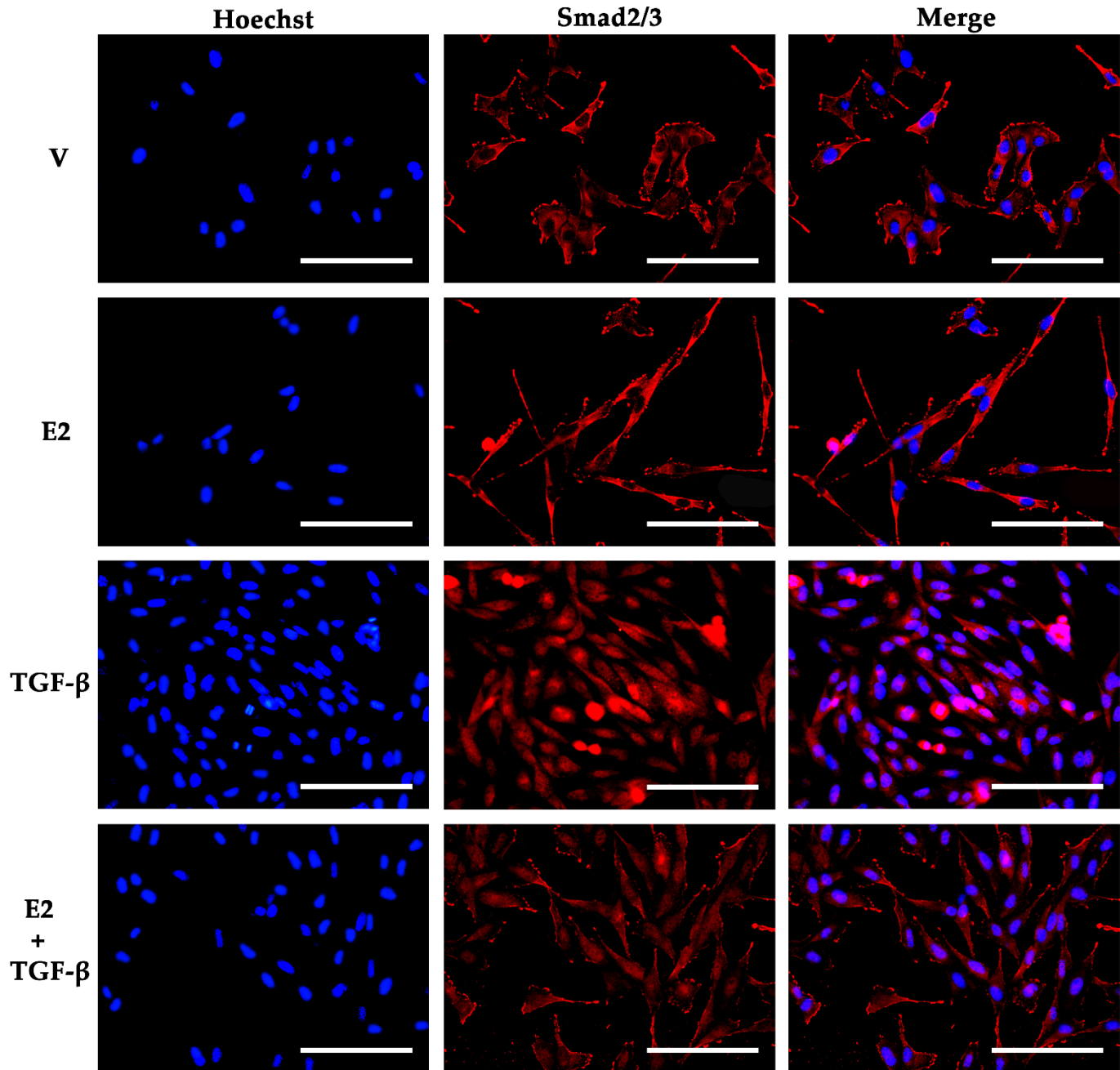
## Células U251



**FIGURA 21.** *El E2 inhibe la translocación al núcleo del complejo de Smad2/3 inducida por TGF-β en las células U251.* Las células U251 se trataron por 48 horas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF-β (10 ng/ml) y E2+TGF-β. La localización de los efectores R-Smads fue evaluada a través de un ensayo de inmunofluorescencia contra Smad2 y Smad3. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia y se capturaron imágenes con un aumento de 400× en seis campos arbitrarios en cada grupo experimental. El tratamiento con TGF-β aumentó la co-localización del complejo Smad2/3 con el núcleo, pero disminuyó con el tratamiento conjunto de E2+TGF-β. Barra de aumento blanca=100 μm.



## Células U87



**FIGURA 22.** *El E2 inhibe la translocación al núcleo del complejo de Smad2/3 inducida por TGF-β en las células U87.* Las células U87 se trataron por 48 horas con vehículo (V: ciclodextrina al 0.01%), E2 (10 nM), TGF-β (10 ng/ml) y E2+TGF-β. La localización de los efectores R-Smads fue evaluada a través de un ensayo de inmunofluorescencia contra Smad2 y Smad3. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia y se capturaron imágenes con un aumento de 400× en seis campos arbitrarios en cada grupo experimental. El tratamiento con TGF-β aumentó la co-localización del complejo Smad2/3 con el núcleo, pero disminuyó con el tratamiento conjunto de E2+TGF-β. Barra de aumento blanca=100 μm.

## VIII. Discusión

El presente estudio proporciona evidencia de los efectos del E2 sobre los procesos moleculares y celulares relacionados con la EMT en células derivadas de GBM humano. La EMT comprende un conjunto de estados entre el fenotipo epitelial y el mesenquimal, y su activación podría estar relacionada con la heterogeneidad fenotípica del GBM.

Debido a la alta heterogeneidad molecular y celular del GBM, el TCGA determinó la existencia de cuatro principales subtipos con diferente perfil de expresión molecular (Verhaak et al. 2010); y más tarde, se demostró la presencia simultánea de estos subtipos dentro de un mismo tumor, tanto a nivel regional (Sottoriva et al. 2013) como en una sola célula (Patel et al. 2014), lo que podría reflejar la transición entre estados fenotípicos. Las células de GBM con expresión proneural y mesenquimal son los subtipos más consistentes en la literatura, en donde el subtipo proneural está relacionado con un pronóstico más favorable y el subtipo mesenquimal tiende a tener la peor tasa de supervivencia (Lin et al. 2014; Olar and Aldape 2014; Phillips et al. 2006). Diversos estudios han demostrado la presencia de tumores recurrentes con expresión mesenquimal después del tratamiento con radioterapia y quimioterapia, en tumores que inicialmente mostraban una expresión proneural (Bhat et al. 2013; Ozawa et al. 2014; Phillips et al. 2006; Segerman et al. 2016), lo que ha llevado a proponer la existencia de una transición proneural-mesénquima (*proneural-mesenchymal transition*, PMT), cuyos eventos moleculares son equivalentes a los de la EMT (Behnan et al. 2019; Fedele et al. 2019). Esta transición entre los dos subtipos moleculares está estrechamente relacionada con un enriquecimiento de células del sistema inmune dentro del microambiente tumoral del GBM, que activan diversas vías de señalización, entre las cuales se encuentran programas inflamatorios que promueven la PMT/EMT (Kaffes et al. 2019; Stanzani et al. 2017; Wang et al. 2018). Los datos mostrados en estos estudios resaltan la importancia de los diversos factores que se encuentran dentro del microambiente tumoral para promover las transiciones fenotípicas entre subtipos del GBM.

En respuesta a los estímulos tumorales, las células del sistema inmune producen quimiocinas y citocinas, incluidos factores de crecimiento y angiogénicos, moléculas inmunosupresoras y enzimas modificadoras de la matriz extracelular, que hacen que los alrededores sean favorables para la progresión del tumor (Quail and Joyce 2017). Entre los muchos factores que se encuentran dentro del microambiente tumoral del GBM, en este trabajo nos enfocamos en el E2, que es producido por las células de la microglía y que tienen propiedades neuroprotectoras dentro del CNS, particularmente ante lesiones del tejido nervioso y enfermedades neurodegenerativas (Baker et al. 2004; Bruce-Keller et al. 2000; Loiola et al. 2019; Vegeto et al. 2003). Por lo tanto, como un primer acercamiento del papel que tiene el E2 y sus receptores (ERs) en la progresión maligna



de este tumor, en este estudio evaluamos los efectos que tiene esta hormona sobre la transición mesenquimal de células de GBM humano.

Ambos subtipos del ER se expresan predominantemente a través del CNS sano, sin embargo; en astrocitomas humanos tanto la expresión del ER- $\alpha$  (Dueñas Jiménez et al. 2014; González-Arenas et al. 2012; Liu et al. 2014; Tavares et al. 2018) como la del ER- $\beta$  (Batistatou et al. 2004; Sareddy et al. 2012) disminuyen conforme aumenta el grado de malignidad del tumor. Los datos obtenidos en este trabajo revelan que la expresión de mRNA de los genes *ESR1* y *ESR2* (que codifican para el ER- $\alpha$  y el ER- $\beta$ , respectivamente), fue mayor en las células de astrocitos que en las cuatro líneas celulares derivadas de GBMs humanos. Estos resultados refuerzan la hipótesis de los estudios mencionados, los cuales establecen que la expresión de ambos subtipos del ER es inversamente proporcional al grado de evolución del tumor. En el GBM se han observado acciones opuestas entre los dos subtipos del ER. Los tratamientos con E2 (10 nM) y PPT (1 nM), el agonista selectivo del ER- $\alpha$ , incrementaron el número de células derivadas de GBM (González-Arenas et al. 2012); mientras que el tratamiento con agonistas específicos del ER- $\beta$  disminuyeron la proliferación de células de GBM (Sareddy et al. 2012).

La EMT es un proceso de transición entre fenotipos celulares, por lo tanto, implica cambios morfológicos de las células que llevan a cabo la transición. El fenotipo epitelial se caracteriza principalmente por una monocapa cerrada de células polarizadas que se encuentran unidas a través de complejos de adhesión intercelular que, en conjunto con el citoesqueleto cortical de actina, proporcionan rigidez y estructura a las células. Cuando sucede la EMT, los complejos de adhesión y la polaridad apical-basal se pierden, las células se individualizan y adquieren una polaridad frente-trasera con proyecciones de filamentos de actina en los bordes delanteros, lo que le confiere a la célula una forma alargada con las extremidades más estrechas que el centro (Lamouille et al. 2014). Sin embargo, estos cambios dependen mucho del tipo celular y del grado en que la transición avanza, particularmente en células tumorales, que tienden a expresar programas parciales de EMT.

Para caracterizar los efectos del E2 sobre los procesos relacionados con la EMT, en este estudio primero evaluamos cambios en la morfología de las células tratadas con E2. La forma de las cuatro líneas celulares evaluadas en el análisis morfológico se ha determinado en varios estudios y por las compañías que las mantienen y distribuyen, por lo que de manera basal se informa que las células U251 tienen forma astrocítica, las células U87 presentan una forma epitelial, las células LN229 tienen una forma triangular o de diamante, y las células T98G tienen forma de fibroblastos (Diao et al. 2019; Torsvik et al. 2014). Además, se ha demostrado que las células U251 y U87 que han sido tratadas con factores que promueven la EMT, cambian hacia un

morfología mesenquimal (Chockalingam and Ghosh 2013; Motaln et al. 2015). La morfología basal de las células que estudiamos fue similar a la que está descrita, excepto por las células T98G, que mostraron una morfología más epitelial en estado basal. Nuestros resultados revelan que el tratamiento con E2 es capaz de cambiar significativamente la morfología de los cuatro tipos celulares, hacia un fenotipo mesenquimal con forma alargada. Además, estos cambios están correlacionados con la reorganización de los filamentos de actina. El E2 regula la reorganización de los filamentos de actina por medio de la fosforilación de proteínas de unión a actina como cofilina y moesina en neuronas, fibroblastos, células de cáncer de mama y endometriales (Briz and Baudry 2014; Carnesecchi et al. 2015; DePasquale 1999; Flamini et al. 2009). Durante la EMT, los filamentos de actina se reorganizan progresivamente desde delgados haces corticales hacia filamentos gruesos y contráctiles que soportan la tensión de las fibras (*stress fibers*). Las células con fenotipo mesenquimal presentan una distribución de filamentos de actina en una polarización frente-trasera, con una red de filamentos cortos de actina ramificados en el borde de ataque y filamentos largos dispuestos en distintos tipos de fibras detrás del borde ataque, los cuales están asociados a estructuras de adhesión. Esta disposición de la red de actina mesenquimal permite a las células llevar a cabo procesos migratorios e invasivos (Hotulainen and Lappalainen 2006; O'Neill 2009; Zaidel-Bar et al. 2003). Por lo tanto, en este estudio mostramos que el E2 promueve un cambio de morfología en las células de GBM hacia un fenotipo mesenquimal debido a la reorganización de los filamentos de actina, que se ensamblaron en paralelo a lo largo de la superficie ventral con largas proyecciones hacia el borde delantero, en cuyos extremos se observaron puntos de expresión de actina que representan la red de filamentos cortos de actina del borde de ataque. Estos cambios de morfología y reorganización de los filamentos de actina sugieren que el E2 podría proporcionar capacidades migratorias e invasivas a las células derivadas de GBM.

Todos los eventos moleculares que ocurren durante la EMT están coordinados espacial y temporalmente durante la transición. Por lo tanto, la reorganización de los filamentos de actina está acoplada a los cambios de expresión que modifican el fenotipo celular. Anteriormente, la definición de la EMT describía una transición completa entre dos únicos estados, el fenotipo epitelial y el mesenquimal. Por lo tanto, la evaluación de la disminución de marcadores epiteliales y el aumento de marcadores mesenquimales ha sido el principal modelo experimental de la EMT. Sin embargo, esta perspectiva ha generado un amplio debate acerca de la presencia de la EMT en ciertas circunstancias, como en la progresión maligna del cáncer, que tiende a generar fenotipos híbridos epitelial/mesenquimal (E/M) que exhiben tanto características epiteliales como mesenquimales en un proceso conocido como EMT parcial. Los fenotipos híbridos E/M en células de cáncer presentan mejores capacidades migratorias e invasivas, así como mayor resistencia a la terapia (Aiello et al. 2018; Brabletz et al. 2018; Nieto et al. 2016; Saitoh 2018; Yang et al. 2020).

Nuestros resultados revelaron que el E2 incrementa la expresión del marcador epitelial ZO-1 y de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina en cultivos *in vitro* de las células U251 y U87. Sin embargo, la regulación de la expresión de ZO-1 fue variable entre líneas celulares, ya que en las células U251 sólo aumentó por efecto del E2 a nivel de mRNA a las 48 h, mientras que en las células U87, la expresión aumentó tanto a nivel de mRNA como de la proteína a 48 y 72 h de tratamiento. El marcador ZO-1 es una proteína adaptadora que se une a múltiples componentes, como proteínas integrales de la membrana plasmática: ocludinas, claudinas y miembros de la familia JAM (*junctional adhesion molecule*) (Bazzoni et al. 2000; Ebnet et al. 2000), por lo que se ha observado que su presencia es esencial para el ensamblaje de uniones estrechas y adherentes de células epiteliales, y su silenciamiento provoca la ruptura de estas uniones (Fanning and Anderson 2009; McNeil et al. 2006). Por lo tanto, las células tumorales que provienen de tejidos epiteliales disminuyen la expresión de ZO-1 al activar la EMT (Che et al. 2016; M. C. Chen et al. 2012; Fan et al. 2015; Wang et al. 2012; Zhong et al. 2011). Sin embargo, las implicaciones que pueda tener la expresión de ZO-1 en el GBM aún no se han estudiado. Además, nuestros resultados mostraron que la regulación del E2 sobre la expresión de ZO-1 varía entre diferentes líneas celulares derivadas de GBM humano, posiblemente debido al diferente perfil de expresión entre estas células (Li et al. 2017; Patil et al. 2015).

La N-cadherina es una proteína transmembranal que pertenece a la familia de moléculas de adhesión celular dependiente de calcio (*calcium-dependent cell adhesion molecule family*, CAM) y es característica del tejido mesenquimal. Sus dominios extracelulares median las interacciones entre las células adyacentes, mientras que sus dominios intracelulares interactúan con las cateninas, que a su vez interactúan con el citoesqueleto de actina (Takeichi 1990). El aumento de la expresión de N-cadherina promueve que las células formen cadenas multicelulares alargadas que migran más rápido y persistentemente, con una mayor proporción de fibras de tensión (*stress fibers*) de actina que proporcionan fuerza contráctil durante la migración celular (Derycke and Bracke 2004; Ouyang et al. 2013; Shih and Yamada 2012a, 2012b). La activación de la EMT en células de GBM conlleva un aumento de la expresión de N-cadherina, que está asociado con mayores capacidades migratorias e invasivas (Asano et al. 2004; Guo et al. 2017; Perego et al. 2002; Song et al. 2018; Q. Wang et al. 2017). Por otro lado, la vimentina es una proteína de filamentos intermedios tipo III que tiene una importante función en mantener la integridad de las células mesenquimales al proporcionar apoyo y anclaje a los organelos, además de que ofrece flexibilidad a las células al estabilizar las interacciones dinámicas del citoesqueleto durante la migración celular (Chang and Goldman 2004; Goldman et al. 1996; Katsumoto et al. 1990; Pérez-Sala et al. 2015). Durante la EMT se presenta un cambio extensivo en la composición de los filamentos intermedios de las células epiteliales, que normalmente expresan citoqueratina e inician la expresión de vimentina cuando se diferencian hacia el fenotipo mesenquimal (Mendez et al. 2010). Las células

de GBM aumentan la expresión de vimentina cuando activan el programa de la EMT (Guo et al. 2017; Li et al. 2019; Song et al. 2018; Tian et al. 2015; Ziberi et al. 2019). Nuestros resultados mostraron que el E2 promueve el fenotipo mesenquimal al aumentar la expresión de N-cadherina y vimentina tanto a nivel del mRNA como de la proteína en dos diferentes líneas celulares de GBM humano.

A pesar de que se observó que el E2 aumentó la expresión de marcadores tanto epiteliales como mesenquimales, no podemos afirmar la inducción de una EMT parcial, ya que para ello se requiere el análisis de más marcadores epiteliales y mesenquimales. Sin embargo, nuestros resultados abren nuevas perspectivas con respecto a la determinación del estado de la EMT inducida por el E2 en células derivadas de GBM, ya que esta hormona puede promover la EMT parcial. Independientemente del estado de la EMT inducida por el E2, nuestros resultados mostraron de manera convincente la adquisición de características mesenquimales en células de GBM por efecto de la hormona, ya que los cambios en la expresión de N-cadherina y vimentina son suficientemente contundentes en las dos líneas celulares estudiadas.

En conjunto, los efectos promovidos por el tratamiento con E2 sobre las células de GBM, como lo es la reorganización de los filamentos de actina, así como el aumento en la expresión de N-cadherina y vimentina, están relacionados con el aumento de las capacidades migratorias e invasivas de las células U251 y U87. Estos efectos, que se relacionan con la activación de la EMT, fueron replicados con el PPT, un agonista selectivo al ER- $\alpha$  (Stauffer et al. 2000), lo que sugiere que los efectos del E2 sobre la EMT son regulados a través del ER- $\alpha$ . Esto último lo comprobamos al utilizar un antagonista altamente selectivo del ER- $\alpha$  (MPP,  $K_i=2.7$ ) (Sun et al. 2002), que bloqueó los efectos producidos por E2 sobre la expresión de los marcadores de la EMT, así como el aumento de la capacidad migratoria producido por el PPT. Además, ni el agonista DNP ni el antagonista PHTPP, ambos selectivos del ER- $\beta$  (Meyers et al. 2001), mostraron efectos significativos sobre la expresión de marcadores de la EMT. Por lo tanto, concluimos que los efectos del E2 observados sobre la expresión de marcadores de la EMT son efectuados principalmente por la activación del ER- $\alpha$ .

Aunque en este estudio demostramos que el E2 es capaz de activar el proceso de la EMT, debemos considerar que nuestro modelo experimental está basado en el cultivo *in vitro* de un solo tipo celular con condiciones extracelulares controladas en el medio. Sin embargo, en condiciones *in vivo*, las células de GBM se encuentran dentro de un microambiente tumoral, que es un complejo sistema que contiene múltiples tipos celulares, que incluye a la microglía (macrófagos especializados que residen en CNS), células dendríticas, neutrófilos, linfocitos, fibroblastos, astrocitos, oligodendrocitos, CSCs, células troncales mesenquimales y células de GBM (considerando los diferentes subtipos que pueden encontrarse en el mismo tumor) (Bradshaw et al. 2016; Kawashima et al. 2019; Patel et al. 2014; Quail and Joyce 2017; Sottoriva et al. 2013; Trylcova et

al. 2015; Tumangelova-Yuzeir et al. 2019). Todas estas células se comunican por medio de mecanismos de señalización paracrina principalmente a través de la secreción de señales que inducen cambios en el comportamiento de las células cercanas. Por lo tanto, el microambiente tumoral se encuentra inmerso en una ECM enriquecida con diversos factores de señalización que son determinantes en la progresión tumoral del GBM (Fane and Weeraratna 2020; Joyce 2005; Sujata and Chaudhuri 2008). La transducción de todos estos factores forma complejas redes que resultan de la interconexión (*crosstalk*) entre las vías de señalización que cada factor activa, donde proteínas o enzimas de una vía canónica actúa sobre otras vías. La dinámica del flujo en estas redes de señalización depende de las señales de entrada y de la expresión de proteínas específicas de cada tipo o subtipo celular. De esta manera, la respuesta a una determinada señal varía de acuerdo con la presencia de otras señales en el medio extracelular, ya sea porque su señalización intracelular se interconecta o, porque tienen efectos opuestos o aditivos. Asimismo, considerando la heterogeneidad de las células de GBM, cada subtipo responde de forma distinta debido la diferencia en el perfil de expresión (Hill 1998; Jordan et al. 2000; Kolch et al. 2015; Rowland et al. 2012; Rowland et al. 2017). Por consiguiente, la inducción de la EMT en estas condiciones microambientales es un proceso muy complejo, ya que son varios los estímulos que pueden activarla, y las vías de señalización de estos estímulos se interconectan en muchos casos. Por lo tanto, el resultado de la activación de la EMT depende enteramente del contexto y tipo celular. Debido a esto, pensamos que la activación del programa de la EMT por efecto del E2 podría variar en el contexto microambiental del GBM *in vivo* por interactuar con las vías de señalización de otros inductores de la EMT, como el TGF- $\beta$  (Goto et al. 2014; Hawse et al. 2008; Ito et al. 2010; Matsuda et al. 2001; Smith et al. 2018; Stope et al. 2010; Wu et al. 2003).

En este trabajo, confirmamos los conocidos efectos del TGF- $\beta$  sobre la inducción de la EMT en las células U251 y U87, y a su vez, evaluamos estos efectos en conjunto con el E2. De acuerdo con nuestros resultados, el TGF- $\beta$  inhibió los efectos del E2 sobre los cambios morfológicos y en la expresión de los marcadores de la EMT de las células de GBM, a excepción del aumento de N-cadherina en las células U251. No obstante, en las células U87 el efecto del E2 sobre la expresión de N-cadherina sí fue inhibida por el TGF- $\beta$ . Asimismo, los efectos del TGF- $\beta$  sobre los cambios en la morfología celular y en la expresión de los marcadores mesenquimales se inhibieron por E2 en ambas líneas celulares. Sin embargo, el efecto del TGF- $\beta$  sobre la disminución de la expresión de ZO-1 en las células U251 no se afectó por E2, mientras que en las células U87 el TGF- $\beta$  no tuvo efecto. Estos resultados revelan que hay diferencias en los efectos del TGF- $\beta$  sobre la regulación de la expresión de marcadores de la EMT entre líneas celulares derivadas de GBM, probablemente debido a las diferencias en el perfil de expresión entre estas células (Li et al. 2017; Patil, Pal, and Somasundaram 2015). Mostramos que, de manera similar con otros estudios en donde utilizaron células

derivadas de cáncer de mama, el bloqueo entre ambas vías de señalización es debido a que el E2 disminuye la expresión de las proteínas Smad2 y Smad3 (Ito et al. 2010; Matsuda et al. 2001). Sin embargo, aún queda por determinar si esta disminución en la expresión se debe a una regulación directa sobre la expresión génica de Smad2 y Smad3 o, por mecanismos que induzcan la degradación de estas proteínas. Aunque por ahora, en ningún estudio se han descrito elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en los promotores de Smad2 y Smad3, ni tampoco se ha determinado la unión del ER en estos promotores. No obstante, Ito y colaboradores mostraron que el ER- $\alpha$  conduce a la terminación de la señalización del TGF- $\beta$  al formar un complejo con Smad2/3 y la ubiquitina ligasa *Smurf*, que aumenta la ubiquitinación de Smad2/3 y su degradación por el proteasoma (Ito et al. 2010). Asimismo, al igual que los resultados encontrados por Ito et al., también mostramos que el E2 disminuye los niveles de Smad2 fosforilada (p-Smad2). Se piensa que esta disminución en los niveles de fosforilación de Smad2 podría ser consecuencia de la formación del complejo ER- $\alpha$ /Smad2/3, que al unirse al ER- $\alpha$ , Smad2 pasa por un mecanismo de desfosforilación (Ito et al. 2010; Jiang et al. 2015). Aunque en este trabajo no mostramos la interacción directa entre el ER- $\alpha$  y Smad2/3, algunos estudios ya han demostrado la formación de este complejo (Ito et al. 2010; Matsuda et al. 2001; Wu et al. 2003). Los ensayos de inmunofluorescencia contra Smad2/3 demostraron que al tratar a las células con E2+TGF- $\beta$ , se inhibe la translocación de Smad2/3 hacia el núcleo, lo que indica que la disminución de la fosforilación de Smad2 interrumpe la actividad de las R-Smads en la regulación de la transcripción de los genes blanco del TGF- $\beta$ .

Por otro lado, también demostramos que los tratamientos con E2 y TGF- $\beta$  disminuyen la expresión del ER- $\alpha$ . En nuestro laboratorio ya se había mostrado este efecto inhibitor del E2 sobre la expresión del ER- $\alpha$  en otras líneas celulares derivadas de GBM humano (González-Arenas et al. 2012). La degradación del ER- $\alpha$  es inducida por el E2 a través de un mecanismo de autorregulación conocido como proteólisis dependiente de ligando, en el que la fosforilación del receptor inducida por E2 es una señal de degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma (Borrás et al. 1994; Hatsumi and Yamamuro 2006; Liu and Shi 2015; Nawaz et al. 1999; Weigel 1996). Este mecanismo, podría explicar la correlación inversamente proporcional entre las altas concentraciones de E2 y la disminución del ER- $\alpha$  conforme aumenta el grado de malignidad de los astrocitomas (Dueñas Jiménez et al. 2014). Además, también se ha mostrado que el tratamiento con TGF- $\beta$  disminuye la expresión del ER- $\alpha$  en células de cáncer de mama (Stoica et al. 1997) y en células epiteliales bronquiales (Smith et al. 2018). Nuestros resultados indican que el tratamiento conjunto de E2+TGF- $\beta$  tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición de la expresión del ER- $\alpha$ .

Finalmente, aunque mostramos que en general, el E2 y el TGF- $\beta$  pueden inhibir mutuamente sus efectos sobre la expresión de marcadores de la EMT en células derivadas de GBM humano, aún no determinamos que

efecto podría tener el tratamiento conjunto de ambos inductores en la migración e invasión celulares o, sobre otros procesos relacionados con la inducción de CSC, apoptosis, proliferación celular, etc. Aún queda mucho por saber acerca de la dinámica entre ambas vías de señalización dentro del microambiente tumoral. Un estudio más profundo acerca de los mecanismos moleculares de la señalización del E2 sobre el GBM y su interacción con otros factores de señalización en determinados contextos celulares, son necesarios para el entendimiento de los efectos del E2 en este tumor, lo que podría proporcionar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del GBM.

En resumen, el E2 promovió cambios en la morfología celular por medio de la reorganización de los filamentos de actina e incrementó la expresión de los marcadores de la EMT, ZO1, N-cadherina y vimentina, en células derivadas de GBM humano. Estos efectos estuvieron relacionados con un aumento de las capacidades migratorias e invasivas de las células de GBM por el tratamiento con E2. El tratamiento con PPT, un agonista selectivo del ER- $\alpha$ , presentó efectos equivalentes al E2, los cuales fueron inhibidos por MPP, antagonista selectivo del ER- $\alpha$ , lo que indica que la EMT inducida por E2 es regulada a través del ER- $\alpha$ . El agonista DNP y el antagonista PHTPP, ambos selectivos del ER- $\beta$ , no mostraron ningún efecto sobre la expresión de los marcadores de la EMT. Además, el E2 inhibió los efectos del TGF- $\beta$  por medio de la disminución en la expresión de las proteínas Smad2, Smad3 y ER- $\alpha$ , así como de Smad2 fosforilada.

## **IX. Conclusión**

El E2 es capaz de inducir un fenotipo mesenquimal a través del ER- $\alpha$  en células derivadas de GBM humano, y esta señalización puede inhibirse mutuamente con la vía canónica del TGF- $\beta$ .

## X. Perspectivas

Este trabajo abre nuevas perspectivas con respecto a los mecanismos del E2 sobre el programa de la EMT en el GBM, lo que podría establecer nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del tumor. Sin embargo, aún hace falta realizar estudios más profundos que nos permitan dilucidar los mecanismos del E2 sobre los GBMs. Por un lado, es necesario realizar experimentos *in vivo* para estudiar los efectos del E2 en xenoinjertos de células de GBM implantadas en el cerebro de ratas o ratones, y evaluar si estos efectos están relacionados con la inducción o inhibición de la EMT. Asimismo, el silenciamiento del ER- $\alpha$  en células derivadas de GBM así como el uso de ratones *knockout* para el ER- $\alpha$ , podría incrementar nuestro entendimiento acerca de la participación de este receptor en el programa de la EMT. Otra estrategia, sería estudiar los efectos del E2 en CSC derivadas de células de GBM o derivadas de pacientes con tumores de GBM, y evaluar su relación con los procesos de la EMT. Por otro lado, el diseño de experimentos con cultivos tridimensionales de diferentes tipos celulares que asemejen el microambiente tumoral del GBM, nos permitiría tener un mayor conocimiento de la dinámica de la señalización de los estrógenos, así como de las interacciones paracrinas del E2 dentro de este entorno con otros factores de señalización, incluyendo al TGF- $\beta$ . Además, con respecto a este factor de crecimiento, aún es necesario determinar si el ER- $\alpha$  interacciona físicamente con los efectores Smad2 y Smad3, y a través de qué mecanismos regulan su expresión. En conjunto con todas estas estrategias experimentales, el tratamiento con agonistas, antagonistas o moduladores selectivos a los ERs, con una perspectiva terapéutica, nos ayudaría a determinar la importancia de los estrógenos en el tratamiento del GBM. Finalmente, la evaluación de la participación de otros mecanismos del E2, como los mecanismos no clásicos que inducen vías de señalización intracelular rápidas, nos permitiría ampliar el conocimiento que se tiene acerca de los efectos de esta hormona sobre los procesos de la EMT en el GBM.



## XI. Referencias

- Aiello, Nicole M. et al. 2018. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Developmental Cell* 45(6):681–695.e4. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.027>).
- Arabel Vollmann-Zwerenz, Verena Leidgens, Giancarlo Feliciello, Christoph A Klein and Peter Hau. 2020. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 21(6):1932. doi: 10.3390/ijms21061932.
- Arnoux, Valerie, Mayssaa Nassour, Annie L’Helgoualc’h, Robert A. Hipskind, and Pierre Savagner. 2008. “Erk5 Controls Slug Expression and Keratinocyte Activation during Wound Healing” edited by M. B. Omary. *Molecular Biology of the Cell* 19(11):4738–49. Retrieved (<http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e07-10-1078>).
- Asano, Kenichiro et al. 2004. “Correlation of N-Cadherin Expression in High Grade Gliomas with Tissue Invasion.” *Journal of Neuro-Oncology* 70(1):3–15.
- Azcoitia, I., J. G. Yague, and L. M. Garcia-Segura. 2011. “Estradiol Synthesis within the Human Brain.” *Neuroscience* 191:139–47. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.012>).
- Bakal, Chris, George Church, and Norbert Perrimon. 2007. “Regulating Cell Morphology.” *Science* 316(June):1753–56.
- Baker, Ann E., Vielska M. Brautigam, and Jyoti J. Watters. 2004. “Estrogen Modulates Microglial Inflammatory Mediator Production via Interactions with Estrogen Receptor  $\beta$ .” *Endocrinology* 145(11):5021–32.
- Band, Arja M. and Marikki Laiho. 2011. “Crosstalk of TGF- $\beta$  and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16(2):109–15.
- Barakat, Radwa, Oliver Oakley, Heehyen Kim, Jooyoung Jin, and Che Myong Jay Ko. 2016. “Extra-Gonadal Sites of Estrogen Biosynthesis and Function.” *BMB Reports* 49(9):488–96.
- Barros, C. S., S. J. Franco, and U. Muller. 2010. “Extracellular Matrix Functions in the Nervous System.” 1–24.
- 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.
- Batistatou, Anna et al. 2004. “Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ) Is Expressed in Brain Astrocytic Tumors and Declines with Dedifferentiation of the Neoplasm.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*

- 130(7):405–10. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00432-004-0548-9>).
- Bazzoni, Gianfranco et al. 2000. “Interaction of Junctional Adhesion Molecule with the Tight Junction Components ZO-1, Cingulin, and Occludin.” *Journal of Biological Chemistry* 275(27):20520–26.
- Behnan, Jinan, Gaetano Finocchiaro, and Gabi Hanna. 2019. “The Landscape of the Mesenchymal Signature in Brain Tumours.” *Brain* 142(4):847–66.
- Berman, K. F. et al. 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. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Bhat, Krishna P. L. et al. 2011. “The Transcriptional Coactivator TAZ Regulates Mesenchymal Differentiation in Malignant Glioma.” *Genes and Development* 25(24):2594–2609.
- Bhat, Krishna P. L. et al. 2013. “Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- $\kappa$ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma.” *Cancer Cell* 24(3):331–46.
- Borrás, M. et al. 1994. “Estradiol-Induced Down-Regulation of Estrogen Receptor. Effect of Various Modulators of Protein Synthesis and Expression.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 48(4):325–36.
- Bouris, Panagiotis et al. 2015. “Estrogen Receptor Alpha Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition, Expression of Specific Matrix Effectors and Functional Properties of Breast Cancer Cells.” *Matrix Biology* 43:42–60. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.008>).
- 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. Retrieved (<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2010.117>).
- Brabletz, Thomas, Raghu Kalluri, M. Angela Nieto, and Robert A. Weinberg. 2018. “EMT in Cancer.” *Nature Reviews Cancer*. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc.2017.118>).
- Bradshaw, Amy et al. 2016. “Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme.” *Frontiers in Surgery* 3(April):1–15.
- Brennan, Cameron W. et al. 2013. “The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma.” *Cell* 155(2):462–77.

- Briz, Victor and Michel Baudry. 2014. "Estrogen Regulates Protein Synthesis and Actin Polymerization in Hippocampal Neurons through Different Molecular Mechanisms." *Frontiers in Endocrinology* 5(FEB):1–14.
- Bruce-Keller, Annadora J. et al. 2000. "Antiinflammatory Effects of Estrogen on Microglial Activation." *Endocrinology* 141(10):3646–56.
- Carnesecchi, Julie et al. 2015. "Estrogens Induce Rapid Cytoskeleton Re-Organization in Human Dermal Fibroblasts via the Non-Classical Receptor GPR30." *PLoS ONE* 10(3):1–19.
- Carpenter, Anne E. et al. 2006. "CellProfiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes." *Genome Biology* 7(10):R100. Retrieved (<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2006-7-10-r100>).
- Carro, Maria Stella et al. 2010. "The Transcriptional Network for Mesenchymal Transformation of Brain Tumours." *Nature* 463(7279):318–25. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nature08712>).
- Carroll, Rona S., Jianping Zhang, Kathleen Dashner, Madhabananda Sar, and Peter McL. Black. 1995. "Steroid Hormone Receptors in Astrocytic Neoplasms." *Neurosurgery* 37(3):496–504. Retrieved (<https://academic.oup.com/neurosurgery/article/37/3/496/2753897>).
- Chang, Lynne and Robert D. Goldman. 2004. "Intermediate Filaments Mediate Cytoskeletal Crosstalk." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(8):601–13. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/nrm1438>).
- Chang, Rui, Peng Zhang, and Jiacong You. 2016. "Post-Translational Modifications of EMT Transcriptional Factors in Cancer Metastasis." *Open Life Sciences* 11(1):237–43. Retrieved (<https://www.degruyter.com/view/j/biol.2016.11.issue-1/biol-2016-0033/biol-2016-0033.xml>).
- Che, Di et al. 2016. "High Glucose-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Contributes to the Upregulation of Fibrogenic Factors in Retinal Pigment Epithelial Cells." *International Journal of Molecular Medicine* 38(6):1815–22.
- Chen, Man Chin et al. 2012. "Resveratrol Inhibits LPS-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Mouse Melanoma Model." *Innate Immunity* 18(5):685–93.
- Chen, Peng et al. 2018. "Prognostic Significance of Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox Family in Glioblastoma." *Medical Science Monitor* 24:1145–51. Retrieved

(<https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/905902>).

- Chen, Shengyong, Mingzhu Zhao, Guang Wu, Chunyan Yao, and Jianwei Zhang. 2012. “Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis.” *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2012:1–10.
- Cheng, Wei Yi, Jessica J. Kandel, Darrell J. Yamashiro, Peter Canoll, and Dimitris Anastassiou. 2012. “A Multi-Cancer Mesenchymal Transition Gene Expression Signature Is Associated with Prolonged Time to Recurrence in Glioblastoma.” *PLoS ONE* 7(4):1–8.
- Chockalingam, S. and Siddhartha Sankar Ghosh. 2013. “Amelioration of Cancer Stem Cells in Macrophage Colony Stimulating Factor-Expressing U87MG-Human Glioblastoma upon 5-Fluorouracil Therapy.” *PLoS ONE* 8(12):1–9.
- Chung, Sang Hyuk, Silvia Franceschi, and Paul F. Lambert. 2010. “Estrogen and ER $\alpha$ : Culprits in Cervical Cancer?” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21(8):504–11.
- Craene, Bram De and Geert Berx. 2013. “Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression.” *Nature Reviews Cancer* 13(2):97–110. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3447>).
- Cuddapah, Vishnu Anand, Stefanie Robel, Stacey Watkins, and Harald Sontheimer. 2014. “A Neurocentric Perspective on Glioma Invasion.” *Nature Reviews. Neuroscience* 15(7):455–65. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3765>).
- Cunat, Séverine, Pascale Hoffmann, and Pascal Pujol. 2004. “Estrogens and Epithelial Ovarian Cancer.” *Gynecologic Oncology* 94(1):25–32. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825804001994>).
- DeAngelis, Lisa M. M. D. 2001. “Brain Tumors.” *The New England Journal of Medicine* 344(2):114–23.
- Denley, Matthew C. S., Nicholas J. F. Gatford, Katherine J. Sellers, and Deepak P. Srivastava. 2018. “Estradiol and the Development of the Cerebral Cortex: An Unexpected Role?” *Frontiers in Neuroscience* 12(MAY):1–19.
- DePasquale, Joseph A. 1999. “Rearrangement of the F-Actin Cytoskeleton in Estradiol-Treated MCF-7 Breast Carcinoma Cells.” *Histochemistry and Cell Biology* 112(5):341–50.
- Derycke, Lara D. M. and Marc E. Bracke. 2004. “N-Cadherin in the Spotlight of Cell-Cell Adhesion, Differentiation, Embryogenesis, Invasion and Signalling.” *The International Journal of Developmental*

- Biology* 48(5–6):463–76. Retrieved (<http://www.intjdevbiol.com/paper.php?doi=0417931d>).
- Dhasarathy, Archana, Masahiro Kajita, and Paul A. Wade. 2007. “The Transcription Factor Snail Mediates Epithelial to Mesenchymal Transitions by Repression of Estrogen Receptor- $\alpha$ .” *Molecular Endocrinology* 21(12):2907–18. Retrieved (<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2007-0293>).
- Diao, Wenwen et al. 2019. “Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments.” *Scientific Reports* 9(1):1–9. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36347-7>).
- Díaz, H., A. Lorenzo, H. F. Carrer, and A. Ceres. 1992. “Time Lapse Study of Neurite Growth in Hypothalamic Dissociated Neurons in Culture: Sex Differences and Estrogen Effects.” *Journal of Neuroscience Research* 33(2):266–81.
- Díaz, Néstor F. et al. 2007. “Changes in the Content of Estrogen  $\alpha$  and Progesterone Receptors during Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Dopamine Neurons.” *Brain Research Bulletin* 73(1–3):75–80.
- Doehn, Ulrik et al. 2009. “Article RSK Is a Principal Effector of the RAS-ERK Pathway for Eliciting a Coordinate Promotile / Invasive Gene Program and Phenotype in Epithelial Cells.” *Molecular Cell* 35(4):511–22. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.002>).
- Dueñas Jiménez, J. M. et al. 2014. “Aromatase and Estrogen Receptor Alpha mRNA Expression as Prognostic Biomarkers in Patients with Astrocytomas.” *Journal of Neuro-Oncology* 119(2):275–84.
- Duerinck, J. et al. 2018. “Randomized Phase II Trial Comparing Axitinib with the Combination of Axitinib and Lomustine in Patients with Recurrent Glioblastoma.” *Journal of Neuro-Oncology* 136(1):115–25. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/s11060-017-2629-z>).
- Ebnet, Klaus, Christian U. Schulz, Maria Katharina Meyer Zu Brickwedde, Gunther G. Pendl, and Dietmar Vestweber. 2000. “Junctional Adhesion Molecule Interacts with the PDZ Domain-Containing Proteins AF-6 and ZO-1.” *Journal of Biological Chemistry* 275(36):27979–88.
- Elias, Maria C. et al. 2005. “TWIST Is Expressed in Human Gliomas and Promotes Invasion.” *Neoplasia (New York, N.Y.)* 7(9):824–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1501937/>).
- Enmark, Eva et al. 1997. “Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern 1.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82(12):4258–65. Retrieved

(<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.82.12.4470>).

- Fan, Qiong et al. 2015. “Twist Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Cervical Carcinogenesis by Regulating the TGF- $\beta$ /Smad3 Signaling Pathway.” *Oncology Reports* 34(4):1787–94.
- Fane, Mitchell and Ashani T. Weeraratna. 2020. “How the Ageing Microenvironment Influences Tumour Progression.” *Nature Reviews Cancer* 20(2):89–106. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9>).
- Fanning, Alan S. and James M. Anderson. 2009. “Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165:113–20.
- Fedele, Monica, Laura Cerchia, Silvia Pegoraro, Riccardo Sgarra, and Guidalberto Manfioletti. 2019. “Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(11).
- Flamini, M. I. et al. 2009. “Differential Actions of Estrogen and SERMs in Regulation of the Actin Cytoskeleton of Endometrial Cells.” *Molecular Human Reproduction* 15(10):675–85.
- Freije, William A. et al. 2004. “Gene Expression Profiling of Gliomas Strongly Predicts Survival.” *Cancer Research* 64(18):6503–10.
- 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. Retrieved (<http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.037267.114>).
- Friedmann, D. et al. 2012. “Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice.” *Science* 338(6110):1080–84. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1226929>).
- Fuentes, N. and Silveyra, P. 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 116: 135–170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
- Furnari, Frank B. et al. 2007. “Malignant Astrocytic Glioma: Genetics, Biology, and Paths to Treatment.” *Genes & Development* 21(21):2683–2710.
- Gallo, D., C. Ferlini, and G. Scambia. 2010. “The Epithelial-Mesenchymal Transition and the Estrogen-

Signaling in Ovarian Cancer.” *Current* 474–81.

- Gan, Hui K., Martin van den Bent, Andrew B. Lassman, David A. Reardon, and Andrew M. Scott. 2017. “Antibody–drug Conjugates in Glioblastoma Therapy: The Right Drugs to the Right Cells.” *Nature Reviews Clinical Oncology*. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2017.95>).
- Geletneky, Karsten et al. 2017. “Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial.” *Molecular Therapy* 25(12):2620–34. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.016>).
- Goldman, Robert D., Satya Khuon, Ying Hao Chou, Puneet Opal, and Peter M. Steinert. 1996. “The Function of Intermediate Filaments in Cell Shape and Cytoskeletal Integrity.” *Journal of Cell Biology* 134(4):971–83.
- González-Arenas, Aliesha et al. 2012. “Estradiol Increases Cell Growth in Human Astrocytoma Cell Lines through ER $\alpha$  Activation and Its Interaction with SRC-1 and SRC-3 Coactivators.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1823(2):379–86. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.004>).
- Goto, Natsuka et al. 2014. “Identification of a Novel Compound That Suppresses Breast Cancer Invasiveness by Inhibiting Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling via Estrogen Receptor  $\alpha$ .” *Journal of Cancer* 5(5):336–43.
- Gruber, Christian J., Walter Tschugguel, Christian Schneeberger, and Johannes C. Huber. 2002. “Production and Actions of Estrogens.” *New England Journal of Medicine* 346(5):340–52. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra000471>).
- Guo, Xing et al. 2017. “Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Vasculogenic Mimicry Formation Induced by Hypoxia via CXCR4/AKT/EMT Pathway in Human Glioblastoma Cells.” *Oncotarget* 8(46):80358–72.
- Guttilla, Irene K., Brian D. Adams, and Bruce A. White. 2012. “ER $\alpha$ , microRNAs, and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer.” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23(2):73–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.001>).
- Hamblett, K. J. et al. 2015. “AMG 595, an Anti-EGFRvIII Antibody-Drug Conjugate, Induces Potent Antitumor Activity against EGFRvIII-Expressing Glioblastoma.” *Molecular Cancer Therapeutics* 14(7):1614–24. Retrieved (<http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-14-1078>).

- Han, Sung Pil et al. 2011. "SNAI1 Is Involved in the Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells." *Cellular and Molecular Neurobiology* 31(3):489–96.
- Hanahan, Douglas and Robert A. Weinberg. 2011. "Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation." *Cell* 144(5):646–74. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>).
- Handa, R. J., S. Ogawa, J. M. Wang, and A. E. Herbison. 2012. "Roles for Oestrogen Receptor  $\beta$  in Adult Brain Function." *Journal of Neuroendocrinology* 24(1):160–73.
- Hansberg-Pastor, Valeria, Alisha 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).
- Haraguchi, Shogo et al. 2012. "Estradiol Promotes Purkinje Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis during Neonatal Life by Inducing the Expression of BDNF." *Cerebellum* 11(2):416–17.
- Hatsumi, Toshinobu and Yutaka Yamamuro. 2006. "Downregulation of Estrogen Receptor Gene Expression by Exogenous 17 $\beta$ -Estradiol in the Mammary Glands of Lactating Mice." *Experimental Biology and Medicine* 231(3):311–16. Retrieved (<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/153537020623100311>).
- Hawse, J. R. et al. 2008. "Estrogen-TGF $\beta$  Cross-Talk in Bone and Other Cell Types: Role of TIEG, Runx2, and Other Transcription Factors." *Journal of Cellular Biochemistry* 103(2):383–92.
- Hill, Steven M. 1998. "Receptor Crosstalk: Communication through Cell Signaling Pathways." *Anatomical Record* 253(2):42–48.
- Hotulainen, Pirta and Pekka Lappalainen. 2006. "Stress Fibers Are Generated by Two Distinct Actin Assembly Mechanisms in Motile Cells." *Journal of Cell Biology* 173(3):383–94.
- Hurt, Elaine M., Jessica N. Saykally, Bynthia M. Anose, Kimberly R. Kalli, and Michel M. Sanders. 2008. "Expression of the ZEB1 ( $\delta$ EF1) Transcription Factor in Human: Additional Insights." *Molecular and Cellular Biochemistry* 318(1–2):89–99.
- Imai, Tsutomu et al. 2003. "Hypoxia Attenuates the Expression of E-Cadherin via Up-Regulation of SNAIL in Ovarian Carcinoma Cells." *The American Journal of Pathology* 163(4):1437–47. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010635018>).
- 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. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/med.21408>).
- Ito, Ichiaki et al. 2010. “Estrogen Inhibits Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling by Promoting Smad2/3 Degradation.” *Journal of Biological Chemistry* 285(19):14747–55.
- Jelks, K. B., R. Wylie, C. L. Floyd, A. K. McAllister, and P. Wise. 2007. “Estradiol Targets Synaptic Proteins to Induce Glutamatergic Synapse Formation in Cultured Hippocampal Neurons: Critical Role of Estrogen Receptor-.” *Journal of Neuroscience* 27(26):6903–13. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0909-07.2007>).
- Jiang, He Song et al. 2015. “Estradiol Attenuates the TGF- $\beta$ 1-Induced Conversion of Primary TAFs into Myofibroblasts and Inhibits Collagen Production and Myofibroblast Contraction by Modulating the Smad and Rho/ROCK Signaling Pathways.” *International Journal of Molecular Medicine* 36(3):801–7.
- Jiménez-Salazar, Javier E. et al. 2014. “Membrane-Initiated Estradiol Signaling of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Mechanisms Through Regulation of Tight Junctions in Human Breast Cancer Cells.” *Hormones and Cancer* 5(3):161–73. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s12672-014-0180-3>).
- Jordan, J.Dedrick, Emmanuel M. Landau, and Ravi Iyengar. 2000. “Signaling Networks: The Origins of Cellular Multitasking.” *Cell* 103(2):193–200.
- Joseph, J. V. et al. 2014. “TGF- $\beta$  Is an Inducer of ZEB1-Dependent Mesenchymal Transdifferentiation in Glioblastoma That Is Associated with Tumor Invasion.” *Cell Death & Disease* 5(10):e1443–e1443. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.395>).
- Joseph, Justin V et al. 2015. “Hypoxia Enhances Migration and Invasion in Glioblastoma by Promoting a Mesenchymal Shift Mediated by the HIF1 $\alpha$ –ZEB1 Axis.” *Cancer Letters* 359(1):107–16. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.010>).
- Joyce, Johanna A. 2005. “Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment.” *Cancer Cell* 7(6):513–20.
- Kaffes, Ioannis et al. 2019. “Human Mesenchymal Glioblastomas Are Characterized by an Increased Immune Cell Presence Compared to Proneural and Classical Tumors Presence Compared to Proneural and Classical Tumors.” *OncImmunity* 8(11). Retrieved (<https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1655360>).

- Kahlert 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):42–53. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.024>).
- Kahlert, U. D., G. Nikkhah, and J. Maciaczyk. 2013. "Epithelial-to-Mesenchymal ( -like ) Transition as a Relevant Molecular Event in Malignant Gliomas." *Cancer Letters* 331(2):131–38. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.010>).
- Kahlert U.D., Joseph J.V., Kruyt F.A. 2017. " EMT- And MET-related Processes in Nonepithelial Tumors: Importance for Disease Progression, Prognosis, and Therapeutic Opportunities". *Mol Oncol*;11(7):860-877
- Katsumoto, Tetsuo, Akira Mitsushima, and Takashi Kurimura. 1990. "The Role of the Vimentin Intermediate Filaments in Rat 3Y1 Cells Elucidated by Immunoelectron Microscopy and Computer-Graphic Reconstruction." *Biology of the Cell* 68(1–3):139–46.
- Kaur, Balveen et al. 2005. "Hypoxia and the Hypoxia-Inducible-Factor Pathway in Glioma Growth and Angiogenesis." *Neuro-Oncology* 7(2):134–53. Retrieved (<http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/7/2/134/1000502/Hypoxia-and-the-hypoxiainduciblefactor-pathway-in>).
- Kawashima, Toshiyuki et al. 2019. "Oligodendrocytes up-Regulate the Invasive Activity of Glioblastoma Cells via the Angiopoietin-2 Signaling Pathway." *Anticancer Research* 39(2):577–84.
- Khalid, Humayun, Akio Yasunaga, Masao Kishikawa, and Shobu Shibata. 1995. "Immunohistochemical Expression of the Estrogen Receptor-Related Antigen (ER-D5) in Human Intracranial Tumors." *Cancer* 75(10):2571–78. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819950515%2975%3A10%3C2571%3A%3AAID-CNCR2820751026%3E3.0.CO%3B2-U>).
- Kim, K. K. et al. 2006. "Alveolar Epithelial Cell Mesenchymal Transition Develops in Vivo during Pulmonary Fibrosis and Is Regulated by the Extracellular Matrix." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(35):13180–85. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605669103>).
- Kim, Young et al. 2009. "Integrin  $\alpha\beta 1$ –dependent  $\beta$ -Catenin Phosphorylation Links Epithelial Smad Signaling to Cell Contacts." *The Journal of Cell Biology* 184(2):309–22. Retrieved (<http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200806067>).
- Kleuser, Burkhard, Daniela Malek, Ronald Gust, Heinz H. Pertz, and Henrik Potteck. 2008. "17-Beta-

- Estradiol Inhibits Transforming Growth Factor-Beta Signaling and Function in Breast Cancer Cells via Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase through the G Protein-Coupled Receptor 30.” *Molecular Pharmacology* 74(6):1533–43.
- Kolch, Walter, Melinda Halasz, Marina Granovskaya, and Boris N. Kholodenko. 2015. “The Dynamic Control of Signal Transduction Networks in Cancer Cells.” *Nature Reviews Cancer* 15(9):515–27. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3983>).
- Koš, Martin, George Reid, Stefanie Denger, and Frank Gannon. 2001. “Minireview: Genomic Organization of the Human ER $\alpha$  Gene Promoter Region.” *Molecular Endocrinology* 15(12):2057–63. Retrieved (<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.15.12.0731>).
- Kovács, T.; Szabó-Meleg, E. and Ábrahám, I. 2020. Estradiol-Induced Epigenetically Mediated Mechanisms and Regulation of Gene Expression. *Int J Mol Sci* 21(9):3177. doi: 10.3390/ijms21093177.
- Kubelt, Carolin, Kirsten Hattermann, Susanne Sebens, H.Maximilian Mehdorn, and Janka Held-Feindt. 2015. “Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Paired Human Primary and Recurrent Glioblastomas.” *International Journal of Oncology* 46(6):2515–25.
- Kumar, Mahesh M. et al. 2016. “Role of Estrogen Receptor Alpha in Human Cervical Cancer-Associated Fibroblasts: A Transcriptomic Study.” *Tumor Biology* 37(4):4409–20.
- Kumar, Vijay et al. 1987. “Functional Domains of the Human Estrogen Receptor.” *Cell* 51(6):941–51. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3690665>).
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. “Molecular Mechanisms of Epithelial–mesenchymal Transition.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(3):178–96. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3758>).
- Lapointe, Sarah, Arie Perry, and Nicholas A. Butowski. 2018. “Primary Brain Tumours in Adults.” *The Lancet* 392(10145):432–46. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5)).
- Lee, Joo Ho et al. 2018. “Human Glioblastoma Arises from Subventricular Zone Cells with Low-Level Driver Mutations.” *Nature* 560(7717):243–47. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>).
- Lepilina, Alexandra et al. 2006. “A Dynamic Epicardial Injury Response Supports Progenitor Cell Activity during Zebrafish Heart Regeneration.” *Cell* 127(3):607–19.

- Li, Hezhen et al. 2017. "Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines." *Turkish Neurosurgery* 27(6):894–903.
- Li, Hong et al. 2019. "HMGB1-Induced p62 Overexpression Promotes Snail-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioblastoma Cells via the Degradation of GSK-3 $\beta$ ." *Theranostics* 9(7):1909–22.
- Li, Ronghui et al. 2010. "A Mesenchymal-to-Epithelial Transition Initiates and Is Required for the Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts." *Cell Stem Cell* 7(1):51–63.
- Li, Xinbo et al. 2004. "Neuronal connexin36 Association with Zonula Occludens-1 Protein (ZO-1) in Mouse Brain and Interaction with the First PDZ Domain of ZO-1." *European Journal of Neuroscience* 19(8):2132–46.
- Liau, Linda M. et al. 2018. "First Results on Survival from a Large Phase 3 Clinical Trial of an Autologous Dendritic Cell Vaccine in Newly Diagnosed Glioblastoma." *Journal of Translational Medicine* 16(1):1. Retrieved (<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1507-6>).
- Lim, Jormay and Jean Paul Thiery. 2012. "Epithelial-Mesenchymal Transitions: Insights from Development." *Development* 139(19):3471–86.
- Lim, Michael, Yuanxuan Xia, Chetan Bettgowda, and Michael Weller. 2018. "Current State of Immunotherapy for Glioblastoma." *Nature Reviews Clinical Oncology* 15(7):422–42. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>).
- Lin, Ning et al. 2014. "Prevalence and Clinicopathologic Characteristics of the Molecular Subtypes in Malignant Glioma: A Multi-Institutional Analysis of 941 Cases." *PLoS ONE* 9(4):1–5.
- Liu, Ce, Yanyang Tu, Xiaoyang Sun, Jian Jiang, and Xiaodong Jin. 2011. "Wnt / Beta-Catenin Pathway in Human Glioma : Expression Pattern and Clinical / Prognostic Correlations." 105–12.
- Liu, Chang et al. 2014. "Expression of Estrogen Receptors, Androgen Receptor and Steroid Receptor Coactivator-3 Is Negatively Correlated to the Differentiation of Astrocytic Tumors." *Cancer Epidemiology* 38(3):291–97. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2014.03.001>).
- Liu, Feng et al. 2008. "Activation of Estrogen Receptor- $\beta$  Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Improves Memory." *Nature Neuroscience* 11(3):334–43. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn2057>).

- Liu, Xian and Haifei Shi. 2015. "Regulation of Estrogen Receptor Expression in the Hypothalamus by Sex Steroids: Implication in the Regulation of Energy Homeostasis." *International Journal of Endocrinology* 2015.
- Liu, Xiaoyang et al. 2015. "Estrogen Receptor  $\beta$  Agonist Enhances Temozolomide Sensitivity of Glioma Cells by Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Pathway." *Molecular Medicine Reports* 11(2):1516–22.
- Llaguno, Sheila Alcantara et al. 2009. "Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model." *Cancer Cell* 15(1):45–56. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.006>).
- Lo, Hui-wen et al. 2007. "Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-Regulation of TWIST Gene Expression." (19):9066–77.
- Loiola, Rodrigo Azevedo, Edward S. Wickstead, Egle Solito, and Simon McArthur. 2019. "Estrogen Promotes Pro-Resolving Microglial Behavior and Phagocytic Cell Clearance through the Actions of Annexin A1." *Frontiers in Endocrinology* 10(JUN):1–12.
- Louis, David N. et al. 2007. "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System." *Acta Neuropathologica* 114(2):97–109.
- Louis, David N. et al. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica* 131(6):803–20.
- Lu, Kan V. et al. 2012. "VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition through a MET/VEGFR2 Complex." *Cancer Cell* 22(1):21–35. Retrieved (<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610812002528>).
- Mahabir, Roshan et al. 2014. "Sustained Elevation of Snail Promotes Glial-Mesenchymal Transition after Irradiation in Malignant Glioma." *Neuro-Oncology* 16(5):671–85.
- Malek, Daniela, Ronald Gust, and Burkhard Kleuser. 2006. "17- $\beta$ -Estradiol Inhibits Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -Induced MCF-7 Cell Migration by Smad3-Repression." *European Journal of Pharmacology* 534(1–3):39–47.
- Maschler, Sabine et al. 2005. "Tumor Cell Invasiveness Correlates with Changes in Integrin Expression and Localization." *Oncogene* 24(12):2032–41. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/1208423>).

- Matsuda, Tadashi, Tetsuya Yamamoto, Atsushi Muraguchi, and Fahri Saatcioglu. 2001. "Cross-Talk between Transforming Growth Factor- $\beta$  And Estrogen Receptor Signaling through Smad3." *Journal of Biological Chemistry* 276(46):42908–14.
- McCarthy, MM. 2008. "Estradiol and the Developing Brain." *Physiological Reviews* 88:91–134. Retrieved (<http://physrev.physiology.org/content/88/1/91.short>).
- McLendon, Roger et al. 2008. "Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways." *Nature* 455(7216):1061–68.
- McNeil, Elizabeth, Christopher T. Capaldo, and Ian G. Macara. 2006. "Zonula Occludens-1 Function in the Assembly of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells." *Molecular Biology of the Cell* 17(4):1922–32. Retrieved (<https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e05-07-0650>).
- Mendez, Melissa G., Shin-Ichiro Kojima, and Robert D. Goldman. 2010. "Vimentin Induces Changes in Cell Shape, Motility, and Adhesion during the Epithelial to Mesenchymal Transition." *The FASEB Journal* 24(6):1838–51.
- Meyers, M. J. et al. 2001. "Estrogen Receptor- $\beta$  Potency-Selective Ligands: Structure-Activity Relationship Studies of Diarylpropionitriles and Their Acetylene and Polar Analogues." *Journal of Medicinal Chemistry* 44(24):4230–51.
- Mikheeva, Svetlana A. et al. 2010. "TWIST1 Promotes Invasion through Mesenchymal Change in Human Glioblastoma." *Molecular Cancer* 9:1–18.
- Mishra, Sweta et al. 2015. "Estrogen and Estrogen Receptor Alpha Promotes Malignancy and Osteoblastic Tumorigenesis in Prostate Cancer." *Oncotarget* 6(42):44388–402.
- Motaln, Helena et al. 2015. "Heterogeneous Glioblastoma Cell Cross-Talk Promotes Phenotype Alterations and Enhanced Drug Resistance." *Oncotarget* 6(38):40998–17.
- Mur, Pilar et al. 2015. "Molecular Classification Defines 4 Prognostically Distinct Glioma Groups Irrespective of Diagnosis and Grade." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 74(3):241–49.
- 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. Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966907>).

- Nawaz, Zafar, David M. Lonard, Andrew P. Dennis, Carolyn L. Smith, and Bert W. O'Malley. 1999. "Proteasome-Dependent Degradation of the Human Estrogen Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(5):1858–62.
- Nelles, Jason L., Wen-yang Hu, and Gail S. Prins. 2011. "Estrogen Action and Prostate Cancer." *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 6(3):437–51. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eem.11.20>).
- Nieto, M. Angela. 2017. "Context-Specific Roles of EMT Programmes in Cancer Cell Dissemination." *Nature Cell Biology* 19(5):416–18. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ncb3520>).
- Nieto, M. Angela, Ruby Yun Y. J. Huang, Rebecca A. A. Jackson, and Jean Paul P. Thiery. 2016. "Emt: 2016." *Cell* 166(1):21–45.
- Nilsson, Stefan et al. 2001. "Mechanisms of Estrogen Action." *Physiological Reviews* 81(4):1535–65. Retrieved (<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>).
- Noushmehr, Houtan et al. 2010. "Identification of a CpG Island Methylator Phenotype That Defines a Distinct Subgroup of Glioma." *Cancer Cell* 17(5):510–22.
- O'Neill, Geraldine M. 2009. "The Coordination between Actin Filaments and Adhesion in Mesenchymal Migration." *Cell Adhesion and Migration* 3(4):1–4.
- Ohgaki, Hiroko and Paul Kleihues. 2013. "The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma." *Clinical Cancer Research* 19(4):764–72.
- Olar, Adriana and Kenneth D. Aldape. 2014. "Using the Molecular Classification of Glioblastoma to Inform Personalized Treatment." *Journal of Pathology* 232(2):165–77.
- Österlund, Marie K. and Yasmin L. Hurd. 2001. "Estrogen Receptors in the Human Forebrain and the Relation to Neuropsychiatric Disorders." *Progress in Neurobiology* 64(3):251–67.
- Ostrom, Quinn T. et al. 2019. "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016." *Neuro-Oncology* 21(5):v1–100.
- Ouyang, Gaoliang, Zhe Wang, Xiaoguang Fang, Jia Liu, and Chaoyong James Yang. 2010. "Molecular Signaling of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Generating and Maintaining Cancer Stem Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(15):2605–18.

- Ouyang, Mingxing et al. 2013. “N-Cadherin Regulates Spatially Polarized Signals through Distinct p120ctn and  $\beta$ -Catenin-Dependent Signalling Pathways.” *Nature Communications* 4.
- Ozawa, Tatsuya et al. 2014. “Article Most Human Non-GCIMP Glioblastoma Subtypes Evolve from a Common Proneural-like Precursor Glioma.” *Cancer Cell* 26(2):288–300. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.005>).
- Park, Se-Hyung, Lydia W. T. Cheung, Alice S. T. Wong, and Peter C. K. Leung. 2008. “Estrogen Regulates Snail and Slug in the Down-Regulation of E-Cadherin and Induces Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells through Estrogen Receptor  $\alpha$ .” *Molecular Endocrinology* 22(9):2085–98. Retrieved (<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2007-0512>).
- Patel, A. P. et al. 2014. “Single-Cell RNA-Seq Highlights Intratumoral Heterogeneity in Primary Glioblastoma.” *Science* 344(6190):1396–1401.
- Patel, Anoop P. et al. 2019. “Global, Regional, and National Burden of Brain and Other CNS Cancer, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.” *The Lancet Neurology* 18(4):376–93.
- Patil, Vikas, Jagriti Pal, and Kumaravel Somasundaram. 2015. “Elucidating the Cancer-Specific Genetic Alteration Spectrum of Glioblastoma Derived Cell Lines from Whole Exome and RNA Sequencing.” *Oncotarget* 6(41):43452–71.
- Payne, L. S. and P. H. Huang. 2013. “The Pathobiology of Collagens in Glioma.” *Molecular Cancer Research* 11(10):1129–40. Retrieved (<http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-13-0236>).
- Pearce, Sandra Timm and V.Crai. Jordan. 2004. “The Biological Role of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in Cancer.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50(1):3–22. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842803002506>).
- 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. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/nrc2131>).
- Perego, Carla et al. 2002. “Invasive Behaviour of Glioblastoma Cell Lines Is Associated with Altered Organisation of the Cadherin-Catenin Adhesion System.” *Journal of Cell Science* 115(16):3331–40.



- Pérez-Sala, Dolores et al. 2015. "Vimentin Filament Organization and Stress Sensing Depend on Its Single Cysteine Residue and Zinc Binding." *Nature Communications* 6.
- Perry, Arie and Pieter Wesseling. 2016. *Histologic Classification of Gliomas*. 1st ed. Elsevier B.V. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0>).
- Pfaffl, M. W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29(9):e45.
- Phillips, Heidi S. et al. 2006. "Molecular Subclasses of High-Grade Glioma Predict Prognosis, Delineate a Pattern of Disease Progression, and Resemble Stages in Neurogenesis." *Cancer Cell* 9(3):157–73.
- Ponglikitmongkol, M., S. Green, and P. Chambon. 1988. "Genomic Organization of the Human Oestrogen Receptor Gene." *The EMBO Journal* 7(11):3385–88. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03211.x>).
- Preca, Bogdan Tiberius et al. 2015. "A Self-Enforcing CD44s/ZEB1 Feedback Loop Maintains EMT and Stemness Properties in Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 137(11):2566–77.
- Prossnitz, Eric R. and Matthias Barton. 2011. "The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER in Health and Disease." *Nature Reviews Endocrinology* 7(12):715–26. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>).
- Ptetz, J., E. Naftolin, and L. M. Garcia Segura. 1990. "Sexual Differentiation of Synaptic Connectivity and Neuronal Plasma Membrane in the Arcuate Nucleus of the Rat Hypothalamus Thin Sections." *Brain Research* 527:116–22.
- Puisieux, Alain, Thomas Brabletz, and Julie Caramel. 2014. "Oncogenic Roles of EMT-Inducing Transcription Factors." *Nature Cell Biology* 16(6):488–94. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ncb2976>).
- Qi, Shasha et al. 2018. "Melatonin Inhibits 17 $\beta$ -Estradiol-Induced Migration, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition in Normal and Endometriotic Endometrial Epithelial Cells." *Reproductive Biology and Endocrinology* 16(1):62. Retrieved (<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0375-5>).
- Quail, Daniela F. and Johanna A. Joyce. 2017. "The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors." *Cancer Cell* 31(3):326–41. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.009>).

- Reifenberger, Guido, Hans Georg Wirsching, Christiane B. Knobbe-Thomsen, and Michael Weller. 2017. "Advances in the Molecular Genetics of Gliomas-Implications for Classification and Therapy." *Nature Reviews Clinical Oncology* 14(7):434–52.
- Ren, Zhou-Xin, Hai-Bin Yu, Jian-Sheng Li, Jun-Ling Shen, and Wen-Sen Du. 2015. "Suitable Parameter Choice on Quantitative Morphology of A549 Cell in Epithelial - Mesenchymal Transition." *Bioscience Reports* 1–7.
- Riddick, Gregory et al. 2017. "A Core Regulatory Circuit in Glioblastoma Stem Cells Links MAPK Activation to a Transcriptional Program of Neural Stem Cell Identity." *Scientific Reports* 7(March):1–15. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/srep43605>).
- Rowland, Michael A., Walter Fontana, and Eric J. Deeds. 2012. "Crosstalk and Competition in Signaling Networks." *Biophysical Journal* 103(11):2389–98. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.006>).
- Rowland, Michael A., Joseph M. Greenbaum, and Eric J. Deeds. 2017. "Crosstalk and the Evolvability of Intracellular Communication." *Nature Communications* 8(May):1–8. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms16009>).
- Russo, J. and Irma H. Russo. 2006. "The Role of Estrogen in the Initiation of Breast Cancer." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102(1–5 SPEC. ISS.):89–96.
- Saha, Dipongkor et al. 2018. "Combinatorial Effects of Vegfr Kinase Inhibitor Axitinib and Oncolytic Virotherapy in Mouse and Human Glioblastoma Stem-like Cell Models." *Clinical Cancer Research* 24(14):3409–22.
- Saitoh, Masao. 2018. "Involvement of Partial EMT in Cancer Progression." *The Journal of Biochemistry* 164(4):257–64. Retrieved (<https://academic.oup.com/jb/article/164/4/257/4992040>).
- 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.
- Al Saleh, Sanaa, Fahd Al Mulla, and Yunus A. Luqmani. 2011. "Estrogen Receptor Silencing Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Cells." *PLoS ONE* 6(6).
- Samavarchi-Tehrani, Payman et al. 2010. "Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming." *Cell Stem Cell* 7(1):64–77.

Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.015>).

- Sandmann, Thomas et al. 2015. "Patients with Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit from the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial." *Journal of Clinical Oncology* 33(25):2735–44.
- Sareddy, Gangadhara R. et al. 2012. "Therapeutic Significance of Estrogen Receptor  $\beta$  Agonists in Gliomas." *Molecular Cancer Therapeutics* 11(5):1174–82.
- Sareddy, Gangadhara R. et al. 2016. "Selective Estrogen Receptor  $\beta$  Agonist LY500307 as a Novel Therapeutic Agent for Glioblastoma." *Scientific Reports* 6(March):1–13. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/srep24185>).
- Scherbakov, Alexander M., Olga E. Andreeva, Valentina A. Shatskaya, and Mikhail A. Krasil'Nikov. 2012. "The Relationships between snail1 and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 113(6):2147–55.
- Schmid, Ralf S. et al. 2016. "Core Pathway Mutations Induce de-Differentiation of Murine Astrocytes into Glioblastoma Stem Cells That Are Sensitive to Radiation but Resistant to Temozolomide." *Neuro-Oncology* 18(7):962–73.
- Schmittgen, Thomas D. and Kenneth J. Livak. 2008. "Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method." *Nature Protocols* 3(6):1101–8. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.73>).
- Schwartz, Nofrat, Anjali Verma, Caroline B. Bivens, Zvi Schwartz, and Barbara D. Boyan. 2016. "Rapid Steroid Hormone Actions via Membrane Receptors." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863(9):2289–98. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.004>).
- Segerman, Anna et al. 2016. "Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition." *Cell Reports* 17(11):2994–3009. Retrieved (<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716316291>).
- Shan, Yongzhi et al. 2015. "Role of IL-6 in the Invasiveness and Prognosis of Glioma." 8(6):9114–20.
- Shi, Xiaoyu et al. 2017. "Estradiol Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Benign Prostatic Epithelial Cells." *Prostate* 77(14):1424–37.
- Shibue, Tsukasa and Robert A. Weinberg. 2017. "EMT, CSCs, and Drug Resistance: The Mechanistic Link

- and Clinical Implications.” *Nature Reviews Clinical Oncology* 14(10):611–29. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>).
- Shih, Wenting and Soichiro Yamada. 2012a. “N-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion Promotes Cell Migration in a Three-Dimensional Matrix.” *Journal of Cell Science* 125(15):3661–70.
- Shih, Wenting and Soichiro Yamada. 2012b. “N-Cadherin as a Key Regulator of Collective Cell Migration in a 3D Environment.” *Cell Adhesion and Migration* 6(6):513–17.
- Siebzehnrbubl, Florian A. et al. 2013. “The ZEB1 Pathway Links Glioblastoma Initiation, Invasion and Chemoresistance.” *EMBO Molecular Medicine* 5(8):1196–1212. Retrieved (<http://embomolmed.embopress.org/cgi/doi/10.1002/emmm.201302827>).
- Skrypek, Nicolas, Steven Goossens, Eva De Smedt, Niels Vandamme, and Geert Berx. 2017. “Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity.” *Trends in Genetics* 33(12):943–59. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.004>).
- Smith, L.Cody et al. 2018. “Transforming Growth Factor beta1 Targets Estrogen Receptor Signaling in Bronchial Epithelial Cells.” *Respiratory Research* 19(1):1–17.
- Song, Yang et al. 2018. “Metformin Inhibits TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition-like Process and Stem-like Properties in GBM via AKT / mTOR / ZEB1 Pathway.” 9(6):7023–35.
- Sottoriva, Andrea et al. 2013. “Intratumor Heterogeneity in Human Glioblastoma Reflects Cancer Evolutionary Dynamics.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(10):4009–14.
- Stanzani, Elisabetta et al. 2017. “Radioresistance of Mesenchymal Glioblastoma Initiating Cells Correlates with Patient Outcome and Is Associated with Activation of Inflammatory Program.” *Oncotarget* 8(43):73640–53. Retrieved (<http://www.oncotarget.com/fulltext/18363>).
- Stauffer, S. R. et al. 2000. “Pyrazole Ligands: Structure - Affinity/activity Relationships and Estrogen Receptor- $\alpha$ -Selective Agonists.” *Journal of Medicinal Chemistry* 43(26):4934–47.
- Stoica, Adriana et al. 1997. “The Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  in the Regulation of Estrogen Receptor Expression in the MCF-7 Breast Cancer Cell Line.” *Endocrinology* 138(4):1498–1505.
- Stone, Rivka C. et al. 2016. “Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis.” *Cell and Tissue Research* 365(3):495–506. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/s00441-016-2464-0>).

- Stope, Matthias B., Simone L. Popp, Cornelius Knabbe, and Miriam B. Buck. 2010. "Estrogen Receptor  $\alpha$  Attenuates Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Breast Cancer Cells Independent from Agonistic and Antagonistic Ligands." *Breast Cancer Research and Treatment* 120(2):357–67.
- Stoyanov, George S. et al. 2018. "Cell Biology of Glioblastoma Multiforme: From Basic Science to Diagnosis and Treatment." *Medical Oncology* 35(3):1–10. Retrieved (<https://doi.org/10.1007/s12032-018-1083-x>).
- Stupp, Roger et al. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma." *New England Journal of Medicine* 352(10):987–96. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043330>).
- Sturm, Dominik et al. 2012. "Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma." *Cancer Cell* 22(4):425–37.
- Sturm, Dominik et al. 2014. "Paediatric and Adult Glioblastoma: Multiform (Epi)genomic Culprits Emerge." *Nature Reviews. Cancer* 14(2):92–107. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4003223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Sugiyama, N. et al. 2009. "Spatiotemporal Dynamics of the Expression of Estrogen Receptors in the Postnatal Mouse Brain." 1:223–32.
- Sujata, Law and S. Chaudhuri. 2008. "Stem Cell Niche, the Microenvironment and Immunological Crosstalk." *Cellular and Molecular Immunology* 5(2):107–12.
- Sullivan, N. J. et al. 2009. "Interleukin-6 Induces an Epithelial–mesenchymal Transition Phenotype in Human Breast Cancer Cells." *Oncogene* 28(33):2940–47. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.180>).
- Sun, Jun et al. 2002. "Antagonists Selective for Estrogen Receptor  $\alpha$ ." *Endocrinology* 143(3):941–47.
- Takeichi, M. 1990. "Cadherins: A Molecular Family Important in Selective Cell-Cell Adhesion." *Annual Review of Biochemistry* 59(1):237–52. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.59.070190.001321>).
- Tam, Wai Leong and Robert A. Weinberg. 2013. "The Epigenetics of Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer." *Nature Medicine* 19(11):1438–49.

- Tavares, Cléciton Braga et al. 2018. "Evaluation of Estrogen Receptor Expression in Low-Grade and High-Grade Astrocytomas." *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 64(12):1129–33.
- Thanasupawat, Thatchawan et al. 2017. "Dovitinib Enhances Temozolomide Efficacy in Glioblastoma Cells." *Molecular Oncology* 11(8):1078–98.
- Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial–mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 2(6):442–54. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/nrc822>).
- Thiery, Jean Paul, Ruby Y. J. Huang, and M. Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell* 139:1–13.
- Tian, Yunhong et al. 2015. "Radioactive 125I Seeds Inhibit Cell Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Glioblastoma Multiforme via a ROS-Mediated Signaling Pathway." *BMC Cancer* 15(1):1–13.
- Timmerman, Luika A. 2004. "Notch Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition during Cardiac Development and Oncogenic Transformation." *Genes & Development* 18(1):99–115. Retrieved (<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.276304>).
- Toran-allerand, C. Dominique. 1976. "Sex Steroids and the Development of the Newborn Mouse Hypothalamus and Preoptic Area in Vitro: Implications for Sexual Differentiation." *Brain Research* 106:407–12.
- Torsvik, Anja et al. 2014. "U-251 Revisited: Genetic Drift and Phenotypic Consequences of Long-Term Cultures of Glioblastoma Cells." *Cancer Medicine* 3(4):812–24. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/cam4.219>).
- Trelstad, R. L., E. D. Hay, and J. D. Revel. 1967. "Cell Contact during Early Morphogenesis in the Chick Embryo." *Developmental Biology* 16(1):78–106.
- Trylcova, Jana et al. 2015. "Effect of Cancer-Associated Fibroblasts on the Migration of Glioma Cells in Vitro." *Tumor Biology* 36(8):5873–79.
- Tso, C. L. 2006. "Primary Glioblastomas Express Mesenchymal Stem-Like Properties." *Molecular Cancer Research* 4(9):607–19.
- Tumangelova-Yuzeir, Kalina et al. 2019. "Mesenchymal Stem Cells Derived and Cultured from Glioblastoma Multiforme Increase Tregs, Downregulate th17, and Induce the Tolerogenic Phenotype of

- Monocyte-Derived Cells.” *Stem Cells International* 2019.
- Tzanakakis, George et al. 2018. “Role of the Extracellular Matrix in Cancer-Associated Epithelial to Mesenchymal Transition Phenomenon.” *Developmental Dynamics* 247(3):368–81.
- Urbańska, Kaja, Justyna Sokołowska, Maciej Szmidt, and Paweł Sysa. 2014. “Glioblastoma Multiforme - an Overview.” *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)* 18(5):307–12. Retrieved (<http://www.termedia.pl/doi/10.5114/wo.2014.40559>).
- Vaquero, Jesús, María L. Marcos, Roberto Martínez, and Gonzalo Bravo. 1983. “Estrogen- and Progesterone-Receptor Proteins in Intracranial Tumors.” *Surgical Neurology* 19(1):11–13.
- Varshney, Mukesh K. et al. 2017. “Role of Estrogen Receptor Beta in Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(48):E10428–37.
- Vegeto, Elisabetta et al. 2003. “Estrogen Receptor- $\alpha$  Mediates the Brain Antiinflammatory Activity of Estradiol.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16):9614–19.
- Vehlow, Anne and Nils Cordes. 2013. “Invasion as Target for Therapy of Glioblastoma Multiforme.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1836(2):236–44. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.07.001>).
- Verhaak, Roel G. W. et al. 2010. “Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized.” *Cancer Cell* 17(1):98–110.
- 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. Retrieved (<http://www.mdpi.com/2077-0383/5/1/11>).
- Walf, Alicia A. and Cheryl A. Frye. 2006. “A Review and Update of Mechanisms of Estrogen in the Hippocampus and Amygdala for Anxiety and Depression Behavior.” *Neuropsychopharmacology* 31(6):1097–1111.
- Wan, Shu et al. 2018. “Estrogen Nuclear Receptors Affect Cell Migration by Altering Sublocalization of AQP2 in Glioma Cell Lines.” *Cell Death Discovery* 5(1):49. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/s41420-018-0113-y>).

- Wang, Bin et al. 2012. "The T Box Transcription Factor TBX2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion of Normal and Malignant Breast Epithelial Cells." *PLoS ONE* 7(7).
- Wang, Joanna and Chetan Bettegowda. 2015. "Genomic Discoveries in Adult Astrocytoma." *Current Opinion in Genetics and Development* 30:17–24. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2014.12.002>).
- Wang, Ling, Sandra Andersson, Margaret Warner, and Jan Åke Gustafsson. 2003. "Estrogen Receptor (ER) $\beta$  Knockout Mice Reveal a Role for ER $\beta$  in Migration of Cortical Neurons in the Developing Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2):703–8.
- Wang, Qiang et al. 2017. "Luteolin Reduces Migration of Human Glioblastoma Cell Lines via Inhibition of the P-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway." *Oncology Letters* 14(3):3545–51.
- Wang, Qianghu et al. 2018. "Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment." *Cancer Cell* 33(1):152. Retrieved (<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610817305640>).
- Wang, Xingqiang et al. 2017. "The Critical Role of EGF/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Glioblastoma." *OncoTargets and Therapy* Volume 10:2781–89. Retrieved (<https://www.dovepress.com/the-critical-role-of-egf-beta-catenin-signaling-in-the-epithelial-mese-peer-reviewed-article-OTT>).
- Weigel, Nancy L. 1996. "Steroid Hormone Receptors and Their Regulation by Phosphorylation." *Biochemical Journal* 319(3):657–67.
- Wenger, Katharina J. et al. 2017. "Bevacizumab as a Last-Line Treatment for Glioblastoma Following Failure of Radiotherapy, Temozolomide and Lomustine." *Oncology Letters* 14(1):1141–46.
- Wik, Elisabeth et al. 2013. "Lack of Estrogen Receptor- $\alpha$  Is Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition and PI3K Alterations in Endometrial Carcinoma." *Clinical Cancer Research* 19(5):1094–1105.
- Wu, Liyu et al. 2003. "Smad4 as a Transcription Corepressor for Estrogen Receptor  $\alpha$ ." *Journal of Biological Chemistry* 278(17):15192–200.
- Xie, Mian et al. 2012. "Activation of Notch-1 Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition in Gefitinib-Acquired Resistant Lung Cancer Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 1513(December 2011):n/a-



- n/a. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24019>).
- Xu, Hui et al. 2015. “Activation of Hypoxia Signaling Induces Phenotypic Transformation of Glioma Cells: Implications for Bevacizumab Antiangiogenic Therapy.” *Oncotarget* 6(14). Retrieved (<http://www.oncotarget.com/fulltext/3592>).
- Xu, Jian, Samy Lamouille, and Rik Derynck. 2009. “TGF- $\beta$ -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition.” *Cell Research* 19(2):156–72.
- Yadav, Arti, Bhavna Kumar, Jharna Datta, T. N. Teknos, and P. Kumar. 2011. “IL-6 Promotes Head and Neck Tumor Metastasis by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition via the JAK-STAT3-SNAI1 Signaling Pathway.” *Molecular Cancer Research* 9(12):1658–67. Retrieved (<http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-11-0271>).
- Yang, Hong Wei, Lata G. Menon, Peter M. Black, Rona S. Carroll, and Mark D. Johnson. 2010. “SNAI2/Slug Promotes Growth and Invasion in Human Gliomas.” *BMC Cancer* 10(1):301. Retrieved (<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-301>).
- Yang, Jing et al. 2020. “Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–mesenchymal Transition.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Yang, Muh-hwa et al. 2008. “Direct Regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  Promotes Metastasis.” *Nature Cell Biology* 10(3):295–305. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/ncb1691>).
- Yaşar, Pelin, Gamze Ayaz, Sırma Damla User, Gizem Güpür, and Mesut Muyan. 2017. “Molecular Mechanism of Estrogen–estrogen Receptor Signaling.” *Reproductive Medicine and Biology* 16(1):4–20.
- Yook, Jong In et al. 2006. “A Wnt–Axin2–GSK3 $\beta$  Cascade Regulates Snail1 Activity in Breast Cancer Cells.” *Nature Cell Biology* 8(12):1398–1406. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/ncb1508>).
- Yue, Wei et al. 2010. “Effects of Estrogen on Breast Cancer Development: Role of Estrogen Receptor Independent Mechanisms.” *International Journal of Cancer* 127(8):1748–57. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25207>).
- Zaidel-Bar, Ronen, Christoph Ballestrem, Zvi Kam, and Benjamin Geiger. 2003. “Early Molecular Events in the Assembly of Matrix Adhesions at the Leading Edge of Migrating Cells.” *Journal of Cell Science* 116(22):4605–13.
- Zarkoob, Hadi, Joseph H. Taube, Sheila K. Singh, Sendurai A. Mani, and Mohammad Kohandel. 2013.

“Investigating the Link between Molecular Subtypes of Glioblastoma, Epithelial-Mesenchymal Transition, and CD133 Cell Surface Protein.” *PLoS ONE* 8(5).

- Di Zazzo, Erika, Giovanni Galasso, Pia Giovannelli, Marzia Di Donato, and Gabriella Castoria. 2018a. “Estrogens and Their Receptors in Prostate Cancer: Therapeutic Implications.” *Frontiers in Oncology* 8(January):1–7. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00002/full>).
- Di Zazzo, Erika, Giovanni Galasso, Pia Giovannelli, Marzia Di Donato, and Gabriella Castoria. 2018b. “Estrogens and Their Receptors in Prostate Cancer: Therapeutic Implications.” *Frontiers in Oncology* 8(January):1–7. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00002/full>).
- Zeisberg, Michael et al. 2007. “Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition.” *Journal of Biological Chemistry* 282(32):23337–47.
- Zhang, L. et al. 2016. “SHP-2-Upregulated ZEB1 Is Important for PDGFR $\alpha$ -Driven Glioma Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion in Mice and Humans.” *Oncogene* 35(43):5641–52.
- Zhang, Li, Huaijun Liu, Xiaodan Mu, Jianling Cui, and Zhigang Peng. 2017. “Dysregulation of Fra1 Expression by Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling Promotes Glioma Aggressiveness through Epithelial–mesenchymal Transition.” *Bioscience Reports* 37(2):BSR20160643. Retrieved (<http://bioscirep.org/lookup/doi/10.1042/BSR20160643>).
- Zhong, Qian et al. 2011. “Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Epithelial-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells: Effects of Misfolded Surfactant Protein.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45(3):498–509.
- Zhou, Binhua P. et al. 2004. “Dual Regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -Mediated Phosphorylation in Control of Epithelial–mesenchymal Transition.” *Nature Cell Biology* 6(10):931–40. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/ncb1173>).
- Ziberi, Sihana et al. 2019. “Upregulation of Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and P2X7 Receptors Is Associated to Increased Invasiveness Caused by P2X7 Receptor Stimulation in Human Glioblastoma Stem Cells.” *Cells* 9(1):85.

## **XII.Anexos**

### **12.1 .PUBLICACIÓN EN REVISTA INDIZADA**

# Estradiol Induces Epithelial to Mesenchymal Transition of Human Glioblastoma Cells

Ana M. Hernández-Vega <sup>1</sup>, Aylin Del Moral-Morales <sup>1</sup>, Carmen J. Zamora-Sánchez <sup>1</sup>, Ana G. Piña-Medina <sup>2</sup>, Aliesha González-Arenas <sup>3</sup> and Ignacio Camacho-Arroyo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City CP 11000, México; anahdzvg@gmail.com (A.M.H.-V.); ayvindmm@gmail.com (A.D.M.-M.); carmenjaninzamora@comunidad.unam.mx (C.J.Z.-S.)

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City CP 04510, México; a.gabriela.pime@gmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City CP 04510, México; alieshag@iibiomedicas.unam.mx

\* Correspondence: camachoarroyo@gmail.com; Tel.: +52 55 5622 3732

Received: 04 July 2020; Accepted: 11 August 2020; Published: date

**Abstract:** The mesenchymal phenotype of glioblastoma multiforme (GBM), the most frequent and malignant brain tumor, is associated with the worst prognosis. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a cell plasticity mechanism involved in GBM malignancy. In this study, we determined 17 $\beta$ -estradiol (E2)-induced EMT by changes in cell morphology, expression of EMT markers, and cell migration and invasion assays in human GBM-derived cell lines. E2 (10 nM) modified the shape and size of GBM cells due to a reorganization of actin filaments. We evaluated EMT markers expression by RT-qPCR, Western blot, and immunofluorescence. We found that E2 upregulated the expression of the mesenchymal markers, vimentin, and N-cadherin. Scratch and transwell assays showed that E2 increased migration and invasion of GBM cells. The estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ )-selective agonist 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT, 10 nM) affected similarly to E2 in terms of the expression of EMT markers and cell migration, and the treatment with the ER- $\alpha$  antagonist methyl-piperidino-pyrazole (MPP, 1  $\mu$ M) blocked E2 and PPT effects. ER- $\beta$ -selective agonist diarylpropionitrile (DNP, 10 nM) and antagonist 4-[2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazole[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (PHTPP, 1  $\mu$ M) showed no effects on EMT marker expression. These data suggest that E2 induces EMT activation through ER- $\alpha$  in human GBM-derived cells.

**Keywords:** epithelial–mesenchymal transition (EMT); glioblastoma multiforme (GBM); 17 $\beta$ -estradiol (E2); estrogen receptors (ERs)

## 1. Introduction

Malignant tumors of the central nervous system (CNS) are among the cancers with the worst prognosis. Glioblastoma multiforme (GBM) comprises approximately half of the malignant primary brain tumors and causes 3–4% of cancer-related deaths [1]. The World Health Organization defines GBM as a grade IV astrocytoma tumor characterized by uncontrolled proliferation, necrosis propensity, angiogenesis, deep infiltration, apoptosis resistance, genomic instability, and extensive heterogeneity at the cellular and molecular levels [2,3]. The Cancer Genome Atlas (TCGA) network identified four molecular subtypes of GBM on the basis of the gene expression profile of neural progenitor cells (proneural, PN), neurons (neural, N), proliferative cells with activation of the tyrosine kinase receptor (classical, CL), and mesenchymal tissue (mesenchymal, MES) [4]. The mesenchymal phenotype of GBM tends to have the worst survival rates compared to the other subtypes, and it is associated with a highly invasive behavior [5–7].

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a mechanism of cellular plasticity that regulates a set of transient states between the epithelial and mesenchymal phenotype. During EMT, epithelial cells lose their junctions with other cells and the apicobasal polarity while they acquire a mesenchymal phenotype with migratory and invasive properties [8]. EMT is a highly dynamic and transient mechanism induced by diverse signals and orchestrated by EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs), which act in close association with the epigenetic machinery by repressing epithelial genes and activating mesenchymal genes [9]. The reverse process is the mesenchymal–epithelial transition (MET) [10]. EMT is essential in diverse physiological and pathological processes [11]. This mechanism is associated with embryogenesis [12–14], heart regeneration [15], wound healing, fibrosis, and organ repair [16]. In tumor cells, the activation of EMT-TFs promotes the mechanisms of migration, invasion, metastasis, apoptosis inhibition, resistance to radio- and chemotherapy, as well as maintenance of the plasticity of cancer stem cells [17].

Although EMT is typical in epithelial tumors, evidence suggests that EMT-TFs also lead to a gain in mesenchymal properties and the promotion of malignancy of non-epithelial tumors, including brain tumors, hematopoietic malignancies, and sarcomas [18,19]. Currently, the classic description of EMT as a process of change between two alternative states (epithelial and mesenchymal) has been replaced by a new concept of cellular plasticity and transient states, which proposes that cells move through a spectrum of various intermediate phases, which means that cells can carry out partial EMT programs [20]. Several studies have shown the role of EMT in GBM progression. Large-scale expression analysis of 85 highly diffuse glioma tumors revealed a set of genes associated with mesenchymal tissue overexpressed in GBM biopsies [21]. Tso et al. showed that a subset of primary GBM tumors expresses cellular and molecular markers associated with mesenchymal stem cells [22]. Then, the definition of the GBM mesenchymal subtype convincingly showed the clinical importance of the EMT program in tumor diagnosis and treatment [4,5]. Molecular profile analysis of the four GBM subtypes demonstrated that the mesenchymal subtype, unlike the other subtypes, presents the molecular characteristics of EMT [23].

Determination of the complete molecular network of the EMT program, as well as the fundamental mechanisms necessary to activate it, could provide new therapeutic approaches for GBM treatment. Autocrine and paracrine interactions within the GBM microenvironment induce EMT through intracellular signaling pathways that activate EMT-TFs. Although different studies have described several signaling pathways that induce EMT in GBM, the role of the different factors within the tumor microenvironment, as well as all the interactions that coordinate this cellular program, is still not understood.

Sex steroid hormones such as estrogens participate in a wide variety of functions throughout the nervous system. These hormones are mainly synthesized in the gonads and the adrenal glands, but they can also be produced *de novo* within the brain [24,25]. Estrogens include estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), and estriol (E3). E2 is involved in many brain functions, such as brain development during sexual differentiation [26], differentiation of neurons and glial cells [27,28], and regulation of neurite growth and synaptic patterns [29,30], and it interacts with the glutamatergic, dopaminergic, and serotonergic neurotransmission pathways that influence the generation of memory, learning, and emotional state [31–33]. Estrogens act by binding specific intracellular and membrane receptors. There are two estrogen-specific intracellular receptor subtypes, estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ), which are ligand-activated transcription factors that directly regulate gene expression. Moreover, these receptors are associated with the plasma membrane, where they activate intracellular signaling pathways [34].

E2 concentrations, as well as ERs expression and activity, are determinant in the malignant progression of tumors growing in estrogen-sensitive tissues [35–38]. Based on these studies, ER- $\alpha$  promotes cell proliferation, whereas ER- $\beta$  has anti-proliferative effects [39]. ER expression status in GBM is controversial. Some studies have reported the absence of ER in GBM [40,41], while other researchers have determined that ER expression varies according to malignancy degree, suggesting that these receptors are involved in GBM malignant progression [42–50]. ER subtypes have shown different effects in GBMs. E2 and 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trispheanol (PPT), a selective agonist of ER- $\alpha$ , increased the number of cells derived from human GBM [45], while ER- $\beta$ -specific agonists decreased GBM cell proliferation [44]. However, the molecular mechanisms of E2 related to GBM malignant progression are still unclear.

E2-promoted signaling is known to be related to EMT induction in estrogen-responsive tissues. In ovarian and prostate cancer, E2 treatment induces ER- $\alpha$ -dependent EMT, while receptor silencing inhibits EMT [51–53]. Nevertheless, loss of ER- $\alpha$  expression in breast and endometrial cancer promotes morphological changes, motility, and improved invasion, as well as increased expression of EMT markers [54–58]. These investigations demonstrate the importance of specific cell context in the E2-induced EMT. However, E2 involvement in the EMT program in GBM is unknown.

To increase the knowledge regarding the EMT program of GBM, in this study, we investigated the participation of E2 on EMT induction in human GBM-derived cells expressing both ER subtypes. Our results showed that the treatment with E2 (10 nM) promoted: (1) changes in cell morphology and the structure of the actin cytoskeleton, (2) increased expression of mesenchymal markers such as vimentin and N-cadherin, and (3) increased migratory and invasive capacity of GBM cells. These effects were dependent on ER- $\alpha$ , since the treatment with its agonist, PPT (10 nM), produced similar results to E2, while the treatment with its antagonist methyl-piperidino-pyrazole (MPP, 1  $\mu$ M), blocked the effects of E2 and PPT.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. TCGA Data Analysis

Ribonucleic acid sequencing (RNA-Seq) counts were obtained from low-grade gliomas (LGG,  $n = 167$ ) and glioblastoma (GBM,  $n = 155$ ) projects of The Cancer Genome Atlas (TCGA) repository (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). The data were downloaded and processed using TCGAbiolinks package version 2.12.6 for R [59]. Additionally, expression profiles were obtained from healthy brain cortex samples ( $n = 249$ ) in the GTEx database (<https://gtexportal.org/home/>). Data were normalized by DESeq2 version 1.22.2 [60] and plotted. TCGA\_analyse\_survival utility from the TCGAbiolinks package for R performed survival analysis.

### 2.2. Cell Cultures

Human GBM-derived cell lines U87, U251, T98, and LN229 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, L0107-500) high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; S1650), 1.0 mM pyruvate (L0642-100), 1.0 mM antibiotic (streptomycin 10 g/L; penicillin G 6.028 g/L; and amphotericin B 0.025 g/L, L0010), and 0.1 mM non-essential amino acids (X0557-100, Biowest, Nuaille, PDL, France). Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. At 60% confluence (24 h before treatments), cells were culture in DMEM no phenol red (ME-019 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% charcoal/dextran-treated FBS (SH30068.03, Thermo Fisher Scientific), 1.0 mM pyruvate, 1.0 mM antibiotics, and 0.1 mM non-essential amino acids. When indicated, cells were treated with E2 (10 nM, E4389, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ER- $\alpha$ -selective agonist PPT (10 nM, 1426, Tocris, Bristol, UK, England), ER- $\beta$ -selective agonist diarylpropionitrile (DNP, 10 nM, 1494, Tocris), ER- $\alpha$ -selective antagonist MPP (1  $\mu$ M, 1991, Tocris), and ER- $\beta$ -selective antagonist 4-[2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazole[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (PHTPP, 1  $\mu$ M, 2662, Tocris). In combined treatments, antagonists MPP and PHTPP were added 2 h before the addition of agonist.

### 2.3. Cell Morphology Analysis

The epithelial phenotype is characterized by a polygonal shape, while the mesenchymal phenotype is spindle-shaped. Therefore, the geometric characteristics of both phenotypes differ from each other. Geometric characteristics can be quantified using high-performance software for the analysis of cell images [61–64]. The morphological changes of the U251, U87, T98G, and LN229 cells treated with vehicle and E2 at 0, 48, and 72 h were determined by phase contrast microscopy (IX71, inverted microscope Olympus, Shinjuku, TY, Japan), digitally capturing six arbitrary fields with a 400X magnification for each of the treatments. Adobe Photoshop CS6 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) was used to process the background correction and illumination of the captured images. Subsequently, the orientation, shape, and position of each of the cells in each image was determined to segment them with the Image-Pro software 10.0.6 (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA), which has automated algorithms to identify, separate, and quantify each of the cells that appear in the image. This quantification allows the extraction of various geometric characteristics that determine morphological parameters of the cells segmented in the two-dimensional plane.

### 2.4. RT-qPCR

Total RNA was extracted from cells by guanidine–thiocyanate–phenol–chloroform method with TRIzol LS Reagent (10296028, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the supplier's protocol, and was measured by spectrophotometry (Nanodrop 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was checked by

electrophoresis with 1.5% agarose gel in Tris-Borate-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (TBE: 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.0 mM EDTA (pH 8.3)) detected by fluorescence with GreenSafe (MB13201, NZYTech, Lisboa, PT, Portugal). Human astrocyte RNA was purchased from ScienCell Research Laboratories (1805, Carlsbad, CA, USA). Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, 28025013, Thermo Fisher Scientific) was used to obtain the complementary DNA (cDNA) from one microgram of extracted RNA following the protocol recommended by the provider. Gene expression relative to the 18S ribosomal RNA (rRNA) gene was quantified through the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using standardized primers for each gene: ESR1 (estrogen receptor 1/ $\alpha$ ) (FW-5'-agcaccctgaagtctctgga-3', RV-5'-gatgtgggagaggatgagga-3'); ESR2 (estrogen receptor 2/ $\beta$ ) (FW-5'-aagaagattcccggctttgt-3', RV-5'-tctacgattcccctcatc-3'); VIM (vimentin) (FW-5'-ggaccagctaaccaacgaca-3', RV-5'-aaggtaacagctgccagag-3'); CDH2 (cadherin-2/N-cadherin) (FW-5'-ctggagacattggggacttc-3', RV-5'-gagccactgcctcatagt-3'); TJP1 (tight junction protein 1/zonula occludens 1 (ZO-1)) (FW-5'-gccattcccgaaggagtga-3', RV-5'-atcacagtgtggaagcg-3'); rRNA18S (FW-5'-agtgaactgcgaatggctc-3', RV-5'-ctgaccgggttggtttgat-3'). FastStart DNA Master SYBR Green I kit (12239264001, Roche, Basel, Switzerland) was used to perform gene amplification in a LightCycler 2.0 instrument (03531414001, Roche). Relative expression was quantified by the comparative  $2^{\Delta\Delta Ct}$  method [65,66].

## 2.5. Western Blot

U251, U87, T98G, and LN229 cells were detached from culture plates using cold phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4)) and cell scraper. The pellet obtained from the centrifuged cells at  $45 \times g$  for 3 min were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (pH 8.0)) supplemented with protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Total proteins were extracted by centrifugation at  $20,817 \times g$  at 4 °C for 15 min and quantified by spectrophotometry (NanoDrop 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the Pierce 660 nm protein assay reagent (22660, Thermo Fisher Scientific). Thirty  $\mu\text{g}$  of total protein was separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 80 V for 4 h and then transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (IPVH00010, Merck, Kenilworth, NY, USA) at 20 V in semidry conditions at room temperature for 45 min. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA, A9418, Sigma-Aldrich) in Tris-buffered saline-Tween (TBST: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.1% Tween (pH 7.6)) with constant agitation at 37 °C for 2 h, and then incubated with primary antibodies: anti-ER $\alpha$  (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , rabbit polyclonal, ab3575, Abcam, Cambridge, UK, England), anti-ER $\beta$  (0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mouse monoclonal 1531: sc-53494), anti-ZO-1 (0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , rat monoclonal R40.76: sc-33725), anti-N-cadherin (0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mouse monoclonal D-4: sc-8424), anti-vimentin (0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mouse monoclonal V9: sc-6260), and  $\alpha$ -tubulin (0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mouse monoclonal A-6: sc-398103) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), diluted with 5% BSA in TBST at 4 °C for 48 h. Subsequently, the membranes were washed with TBST three times every 5 min and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP): anti-rabbit (0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , goat polyclonal Immunoglobulin G (IgG) containing two heavy chains (H) and two light chains (L) (H+L), 65-6120; Thermo Fisher Scientific), anti-mouse (0.013  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , purified recombinant mouse IgG $\kappa$  light chain: sc-516102; Santa Cruz Biotechnology), and anti-rat (0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , goat polyclonal IgG (H+L), ab97057, Abcam) at room temperature and constant agitation for 45 min, and again washed with TBST three times every 5 min. Finally, Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate reagent (34096, Thermo Fisher Scientific) was incubated in the membranes, and immunoreactive bands were detected by chemiluminescence exposing blots to Kodak Biomax Light Film (Z370371, Sigma-Aldrich) captured by a digital camera of 14.1 megapixels (SD1400IS, Canon Inc., Ota, TY, Japan). ImageJ software (1.52u, National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD, USA) performed the densitometric analysis of blot images.

## 2.6. Immunofluorescence

U251 and U87 cells were fixed with 4% paraformaldehyde (4% PFA) at room temperature for 20 min, washed with PBS, and then incubated in permeabilizing blocking solution (1% BSA, 1% glycine, 0.2% Triton X-100, diluted in PBS) at room temperature for 90 min. Subsequently, cells were incubated with primary antibodies: anti-Actin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , goat polyclonal C-11, sc-1615), anti-ZO-1 (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , rat monoclonal R40.76: sc-33725), anti-N-cadherin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mouse monoclonal D-4: sc-8424), and anti-vimentin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mouse monoclonal V9: sc-6260) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) at 4 °C overnight, and then rinsed three times every 5 min with PBST (PBS with 0.05% Tween). Later, cells were incubated with secondary antibodies: anti-mouse (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , goat polyclonal IgG (H+L) Alexa Fluor 488: A11001, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-rat (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , goat polyclonal IgG (H+L) Alexa Fluor 488:

ab150157, Abcam, Cambridge, UK, England), and anti-goat (8 µg/mL, donkey IgG-FITC: sc-2024, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 90 min, and again rinsed with PBST three times every 5 min. Nuclei were stained with Hoechst 33,342 (1 mg/mL, 62249, Thermo Fisher Scientific) at room temperature for 7 min and rinsed three times every 5 min with PBST. Finally, cells were coverslipped with mounting medium (18606-20, Polysciences, Warrington, PA, USA) and visualized by fluorescence microscopy (Bx43, light microscope, Olympus, Shinjuku, TY, Japan), digitally capturing six arbitrary fields with a 400× magnification. Fluorescence density was measured as integrated density from the *Analyze* menu of ImageJ software.

### 2.7. Migration Assay

Wound healing assays were performed to determine the migratory capacity of cells. U251 and U87 cells grew in DMEM high glucose supplemented until reaching 70% confluence. Then, the medium was changed to DMEM no phenol red supplemented 10% charcoal/dextran-treated FBS, 1.0 mM pyruvate, 1.0 mM antibiotics, and 0.1 mM non-essential amino acids, and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Upon 90% confluence, a scratch was made using a 200 µL pipette tip. Cells floating were rinsed with PBS and DMEM no phenol red-supplemented 10% charcoal/dextran treated-FBS, 1.0 mM pyruvate, 1.0 mM antibiotics, and 0.1 mM non-essential amino acids were added again. One hour before adding the experimental treatments, we incubated the cells with cytosine β-D-arabino-furanoside hydrochloride (10 µM, Ara-C, C1768, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a selective inhibitor of DNA synthesis. Images of the wound area captured at 100× magnification with an Infinity 1-2C camera (Lumenera, Ottawa, ON, Canada) connected to an inverted microscope (CKX41, Olympus, Shinjuku, TY, Japan) at 0, 12, and 24 h of treatment were analyzed using the MRI Wound Healing Tool plugins of Image J software.

### 2.8. Invasion Assay

Transwell assay determined the invasion potential of cells. Transwell inserts with 10 µm membrane thickness and 8 µm pore size (3422, Corning, Corning, NY, USA) were placed in 24-well plates, and each well was covered with 50 µL of ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (2 mg/mL, matrigel E1270, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in DMEM no phenol red without supplement, and immediately incubated at 37 °C for 2 hours. Then, 15,000 U87 cells or 10,000 U251 cells suspended in 150 µL DMEM no phenol red and without supplement with 10 µM Ara-C and treatments (vehicle or E2 10 nM) were added to the upper insert, while the lower wells were filled with 500 µL DMEM supplemented with 10% FBS as a chemoattractant were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 24 h. Transwell inserts were rinsed with PBS, fixed with 4% PFA for 20 min, and stained with 0.1% crystal violet dye for an additional 20 min. Inserts were washed three times with PBS for each 15 min in order to remove excess dye. Finally, images of invasive cells captured at 100× magnification with an Infinity 1-2C camera (Lumenera, Ottawa, ON, Canada) connected to an inverted microscope (CKX41, Olympus, Shinjuku, TY, Japan) were analyzed using the Cell Counter plugin in the ImageJ software.

### 2.9. Statistical Analysis

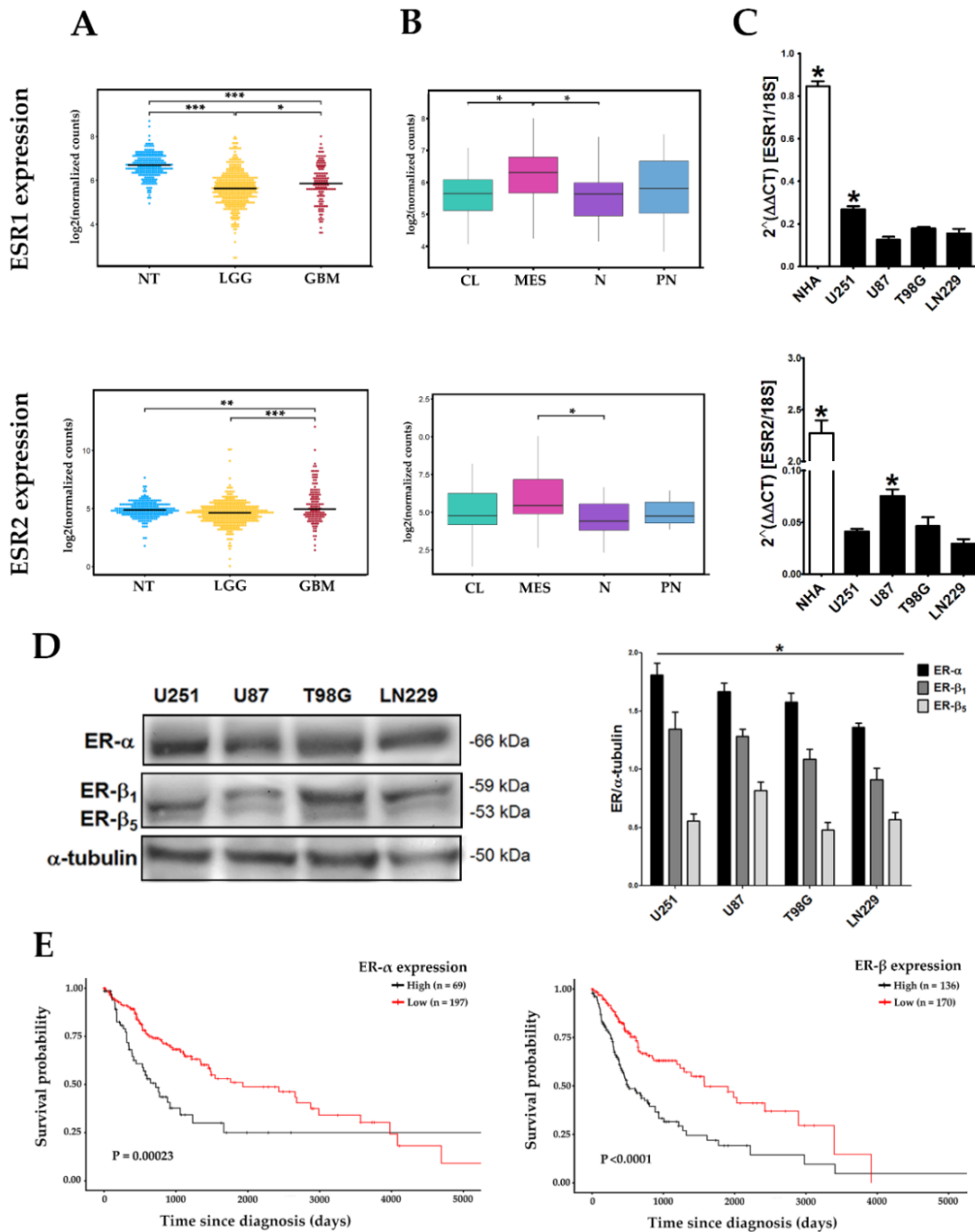
Data were analyzed and plotted with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistical analysis between comparable groups was performed using a one-way ANOVA with a Tukey post hoc-test. Time course analysis was performed using a two-way ANOVA test followed by Bonferroni post-test to compare replicate means by row. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Plotted data are representative of three independent experiments for each treatment.



### 3. Results

#### 3.1. Differential Expression of ER $\alpha$ and ER $\beta$ Subtypes in Human GBM-Derived Cells

We evaluated the mRNA expression levels of ESR1 (ER- $\alpha$ ) and ESR2 (ER- $\beta$ ) genes in astrocytoma samples with different histological grades from the data obtained of the low-grade gliomas (LGG) and glioblastoma (GBM) projects from the TCGA repository, as well as samples of healthy cerebral cortex in the GTEx database. Low ESR1 expression levels were observed in GBM and LGG when compared to healthy tissue. A slight but significant increase was found in ESR1 expression in GBM as compared with LGG. These data highlight two critical points: (1) ESR1 expression was lower in gliomas compared to healthy tissue, (2) but also was higher in GBM compared to LGG, suggesting an important oncogenic role of ER- $\alpha$  in development of low- and high-grade gliomas. In contrast, ESR2 expression levels were higher in GBM as compared with LGG and healthy tissue (Figure 1A). Next, we compared ESR1 and ESR2 expression among the four GBM subtypes defined by Verhaak et al. [4]. The mesenchymal subtype showed higher levels of ESR1 mRNA expression compared to the classical and neural subtypes, without significant differences when compared with the proneural subtype. ESR2 expression in the mesenchymal subtype showed a tendency to be the highest, although it was only significantly higher when compared with the neural subtype ( $p < 0.05$ ) (Figure 1B). It is interesting to highlight that our results showed that expression of both ER subtypes was enriched in the mesenchymal subtype. Analysis of expression in cell lines showed a similar trend to the TCGA data: the expression of both ESR1 and ESR2 in four cell lines derived from human GBM (U251, U87, T98G, and LN229) was found to be lower compared to the expression of normal human astrocytes (NHA). Among GBM cells, the ESR1 gene was expressed in a higher proportion in U251 cells, while ESR2 had a higher expression in U87 cells (Figure 1C). We evaluated the expression of both ERs subtypes at the protein level in GBM cells, and a higher content of ER- $\alpha$  than that of ER- $\beta$  was observed in all cell lines. Moreover, we found two isoforms of ER- $\beta$  (ER- $\beta$ 1 and ER- $\beta$ 5) expressed in GBM cells; ER- $\beta$ 1 was more abundant than ER- $\beta$ 5 (Figure 1D). An analysis of the clinical outcome of ER expression in GBM patients showed that the higher expression of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  was correlated with a poor prognosis. Therefore, patients with a low expression of both ER subtypes live longer than those with higher levels of expression (Figure 1E). Importantly, although lower ER- $\alpha$  expression was observed in GBM TCGA data compared to healthy tissue, survival analysis showed that high ER- $\alpha$  expression is a poor prognostic factor for the patients, which suggests that ER- $\alpha$  expression levels in GBM may not always be proportional to its oncogenic activity. These results suggest that ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  expression differentially changes among healthy tissue, LGG, and GBM, both in vivo and in vitro, and it also varies among GBM subtypes.












**Figure 1.** The estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ) subtype gene expressions in human glioblastoma multiforme (GBM). **(A)** Ribonucleic acid sequencing (RNA-Seq) counts obtained from low-grade gliomas (LGG,  $n = 167$ ) and GBM ( $n = 155$ ) projects from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and expression profiles obtained from healthy brain cortex samples (normal tissue, NT;  $n = 249$ ) in the GTEx database. LGG includes grade I, II, and III gliomas. **(B)** RNA-Seq counts from GBM subtypes: classical (CL), mesenchymal (MES), neural (N), and proneural (PN) obtained from TCGA. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . **(C)** RT-qPCR quantified gene expression of estrogen receptor 1/ $\alpha$  (ESR1) and estrogen receptor 2/ $\beta$  (ESR2) relative to the reference gene 18S ribosomal RNA (rRNA) using the comparative  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method in total RNA from normal human astrocyte (NHA) and U251, U87, T98G, and LN229 human GBM-derived cells. Both receptor subtypes were less expressed in GBM cells than in NHAs. \*  $p < 0.05$  vs. all other groups; mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $n = 3$ . **(D)** ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  content analyzed by Western blot using  $\alpha$ -tubulin as load control. The two main isoforms of ER- $\beta$  expressed in GBM are shown: ER- $\beta_1$  and ER- $\beta_5$ . Representative blot image and the corresponding densitometric analysis for ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in human GBM-derived cells. \*  $p < 0.05$  ER- $\alpha$  vs. ER- $\beta$  and ER- $\beta_1$  vs. ER- $\beta_5$ ; mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . **(E)** Survival analysis for ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  expression in GBM using TCGA data.

### 3.2. Changes in Cell Morphology During E2-Induced EMT

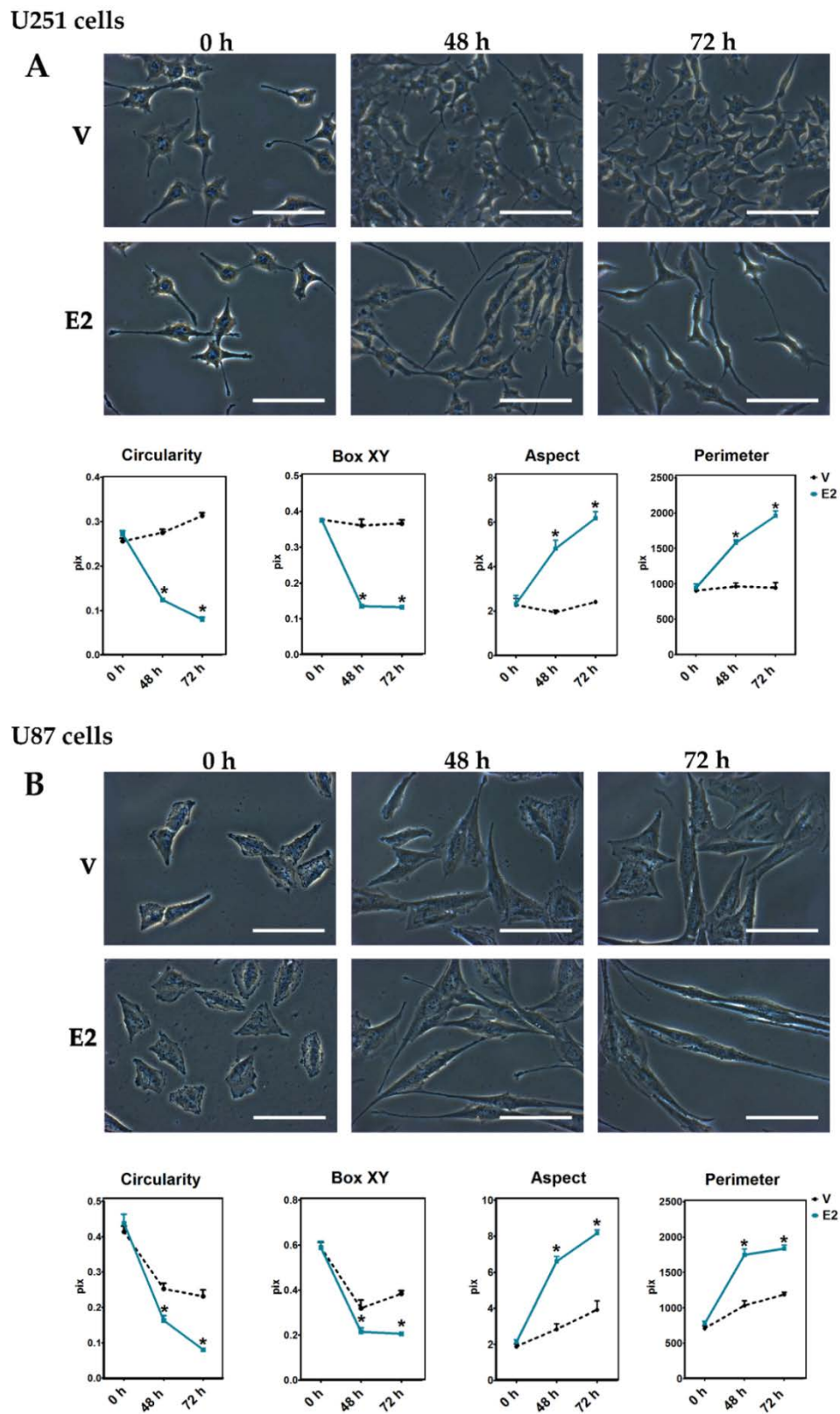
Morphological changes associated with EMT in U251 and U87 cells were evaluated after E2 (10 nM) treatment. At the beginning of the treatments, U251 cells presented a typical star-like morphology, and U87 cells a polygonal shape. Interestingly, the cells treated with E2 showed a spindle-shape and the typical features of mesenchymal cells at 48 and 72 h (Figure 2). Table 1 details the geometric parameters quantified in this work. Values close to the unity of the circularity and box XY (width/height) measurements are characteristic of a polygonal shape, while a high aspect (major/minor axis) and perimeter denote a fusiform shape. Plots show that E2 decreased circularity and box XY, while increased aspect and perimeter (Figure 2). This effect on the cellular morphology was consistent in T98G and LN229 cells (Figures S1 and S2). These results show that E2 promotes morphological changes associated with EMT.

**Table 1.** Geometric parameters of Image-Pro software.

Parameter	Description	Image
Area	The area included in the polygon that defines the figure contour	
Axis major	Major axis length of an imaginary ellipse surrounding figure	
Axis minor	Minor axis length of an imaginary ellipse surrounding figure	
Aspect	The ratio between the major and minor axis of an ellipse	
Bound box height	Bounding box height of the figure	
Bound box width	Bounding box width of the figure	
Box XY	The ratio of width to height of bounding box	
Circularity	The ratio of figure area to the diameter of a circle around it	
Perimeter	Length of the region surrounding the figure	

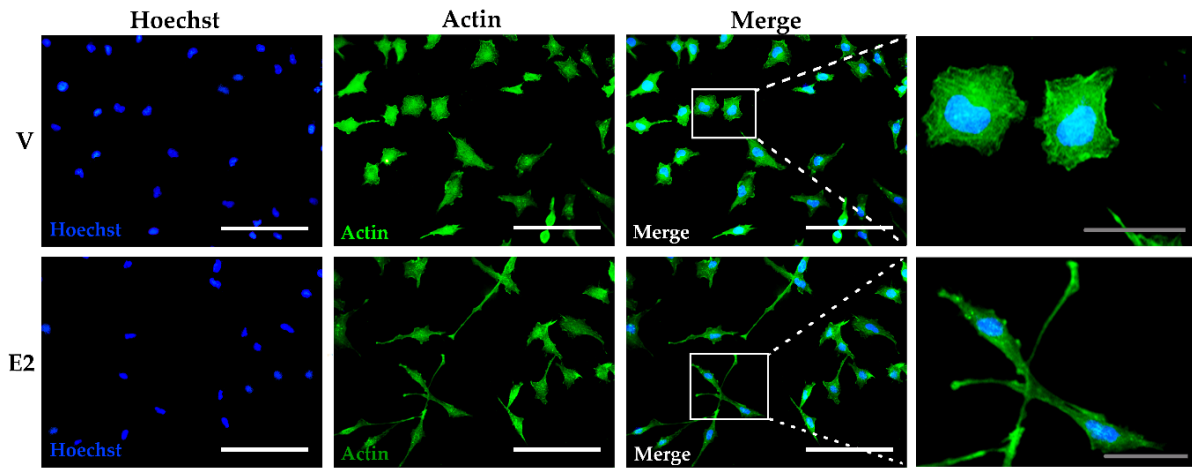
### 3.3. E2-Induced Reorganization of Actin Filaments

To determine whether the morphological changes observed above were related to changes in the arrangement of actin filaments, we performed immunofluorescence assays in U251 and U87 cells. In U251 cells treated with vehicle, the actin filaments were predominantly organized into bundles of dense reticulated mesh, characteristic of cortical actin. In contrast, in cells treated with E2 (10 nM), the actin filaments assembled in parallel along the ventral surface of the cell, forming long projections towards the leading edge, which in the extreme showed focal sites with a high concentration of actin (Figure 3). In U87 cells, we observed a higher proportion of concentrated actin focal points, both in vehicle and E2 treated cells. However, cells incubated with E2 showed long parallel filament projections with a high concentration of actin around the edge (Figure 3). Thereby, the morphological changes induced by E2 in GBM cells were related to a reorganization of the actin filaments.

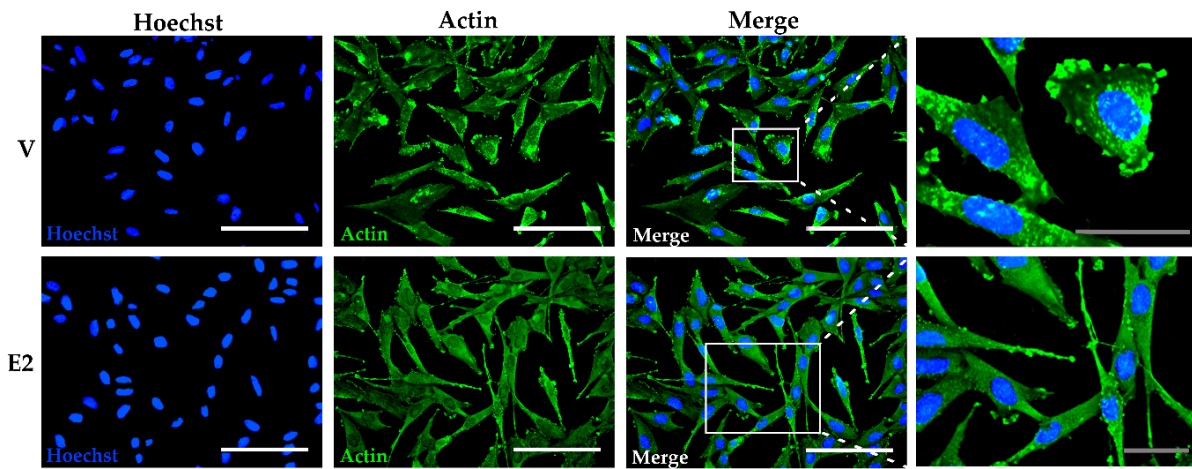


**Figure 2.** 17β-Estradiol (E2)-induced morphological changes in human GBM-derived cells. (A) U251 and (B) U87 cells observed by phase-contrast microscopy with a magnification of 400× at 0, 48, and 72 h after adding 17β-estradiol (E2, 10 nM) and the vehicle (V, 0.01% cyclodextrin). Magnification white bar = 100 μm. Plots represent the quantification of the geometric parameters (circularity, box XY, aspect, perimeter) in this study. Results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM);  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  vs. V.

### U251 cells



### U87 cells



**Figure 3.** E2 rearranged the actin cytoskeleton of human GBM-derived cells. Actin immunostaining in U251 and U87 cells treated with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10 nM) and vehicle (V, 0.01% cyclodextrin) for 48 h. Representative images captured under a fluorescence microscope at a magnification of 400 $\times$ . Magnification white bar = 100  $\mu$ m and gray bar = 30  $\mu$ m.

### 3.4. E2 Regulated EMT Marker Expression

We analyzed the effects of E2 on EMT marker expression and distribution in GBM cells by RT-qPCR, Western blot, and immunofluorescence. We evaluated the peripheral membrane protein zonula occludens 1 (ZO-1, encoded by the TJP1 gene) as an epithelial marker, and the evaluated mesenchymal phenotype markers were N-cadherin (encoded by the CDH2 gene) and vimentin (encoded by the VIM gene). In U251 cells, E2 increased TJP1 expression only at 48 h, CDH2 expression from 24 to 72 h, and VIM expression from 48 h (Figure 4A). Importantly, ZO-1 protein content showed no changes due to E2 treatment, while the hormone increased the content of N-cadherin and vimentin proteins at 72 h (Figure 4B). E2 effects on U87 cells were like those of U251 cells. E2 upregulated TJP1 and ZO-1 expression from 48 h, CDH2 expression from 24 h, and N-cadherin expression from 48 h; VIM expression increased at 24 h, and decreased at 72 h, while the vimentin protein content increased at 72 h (Figure 4C,D).

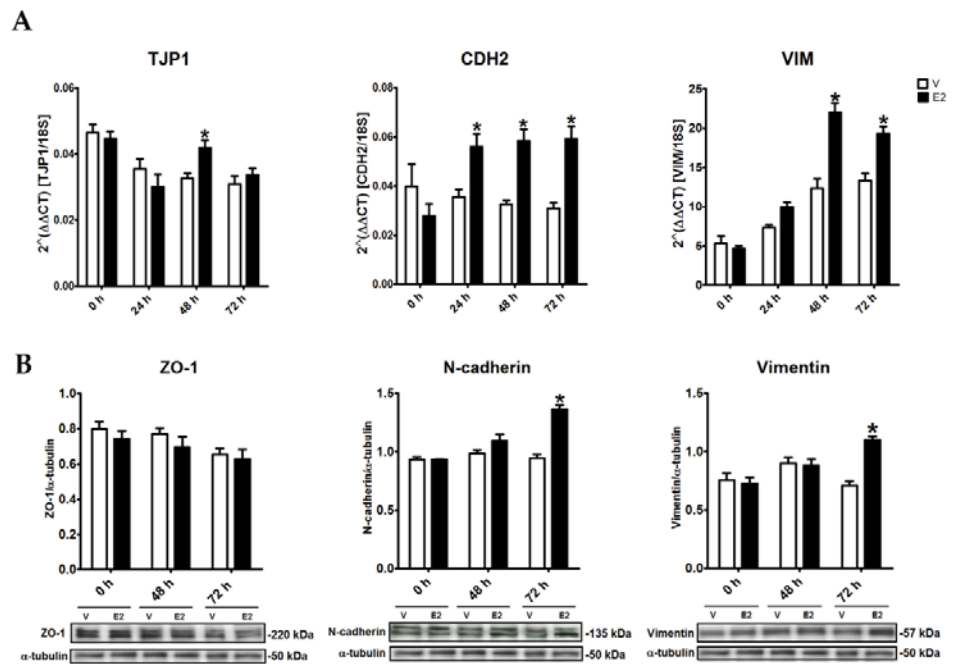
The analysis of EMT markers by immunofluorescence showed that in U251 and U87 cells treated with the vehicle, ZO-1, and N-cadherin proteins were expressed in localized regions of the plasmatic membrane, particularly at cell-binding sites. In contrast, in E2-treated cells, these proteins were shown along the entire cell surface, especially in long projections at the cell ends (Figure 5A,B). Vimentin filaments formed a network within the cytoplasm in cells without E2, whereas in E2-incubated cells, vimentin filaments were arranged in parallel along the ventral surface of the cell, particularly at the borders, similar to actin filaments (Figure 5A,B). Overall, the fluorescence intensity of EMT markers significantly increased in E2-treated U251 and U87 cells (Figure 5C). These results show that E2 induces EMT marker expression and its redistribution in GBM cells.

Furthermore, the increase in both epithelial and mesenchymal markers suggests that E2 promotes the induction of a partial EMT, which expresses both phenotypes. Nevertheless, the increase in ZO-1 in U251 cells was not as evident as in U87 cells, and thus these results are not sufficient to determine the status of E2-induced EMT. However, these results showed that E2 significantly induced the expression of mesenchymal markers, promoting the mesenchymal phenotype of cells derived from GBM.

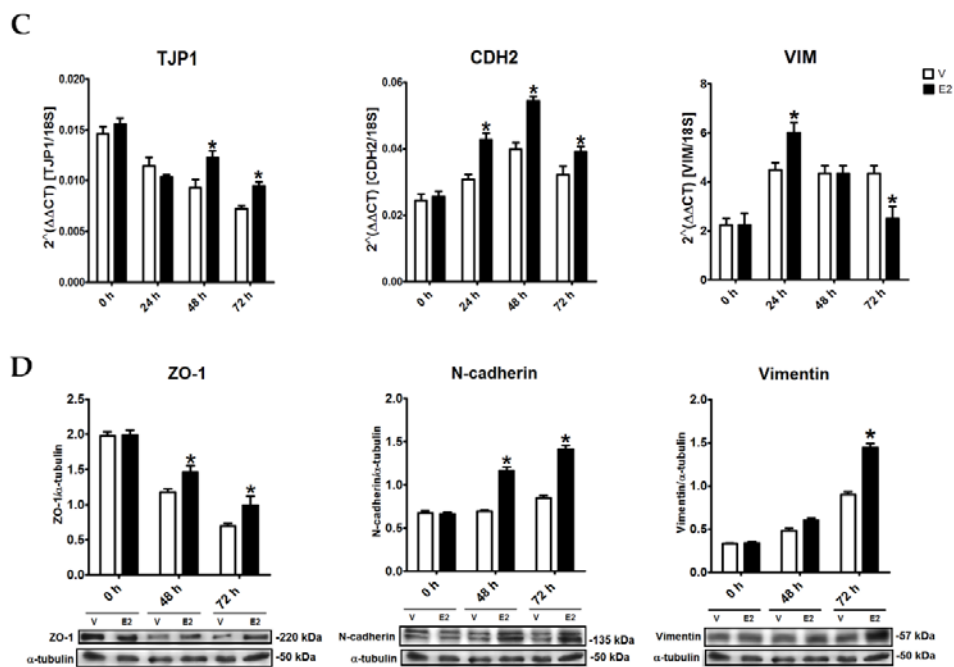
### 3.5. E2 Promoted Migration and Invasion of Human GBM-Derived Cells

We evaluated cell migration by wound healing assay, and we observed that E2-treated U251 and U87 cells showed a higher migratory capacity by rapidly closing the wound compared to cells without E2 (Figure 6A,B). We also evaluated invasive capacity through transwell assay. E2 increased the number of invading U251 and U87 cells as compared with the vehicle (Figure 6C,D). These data show that E2, in addition to changing cell morphology and regulating EMT marker expression, also increased the migratory and invasive capacity of GBM-derived cells.

U251 cells

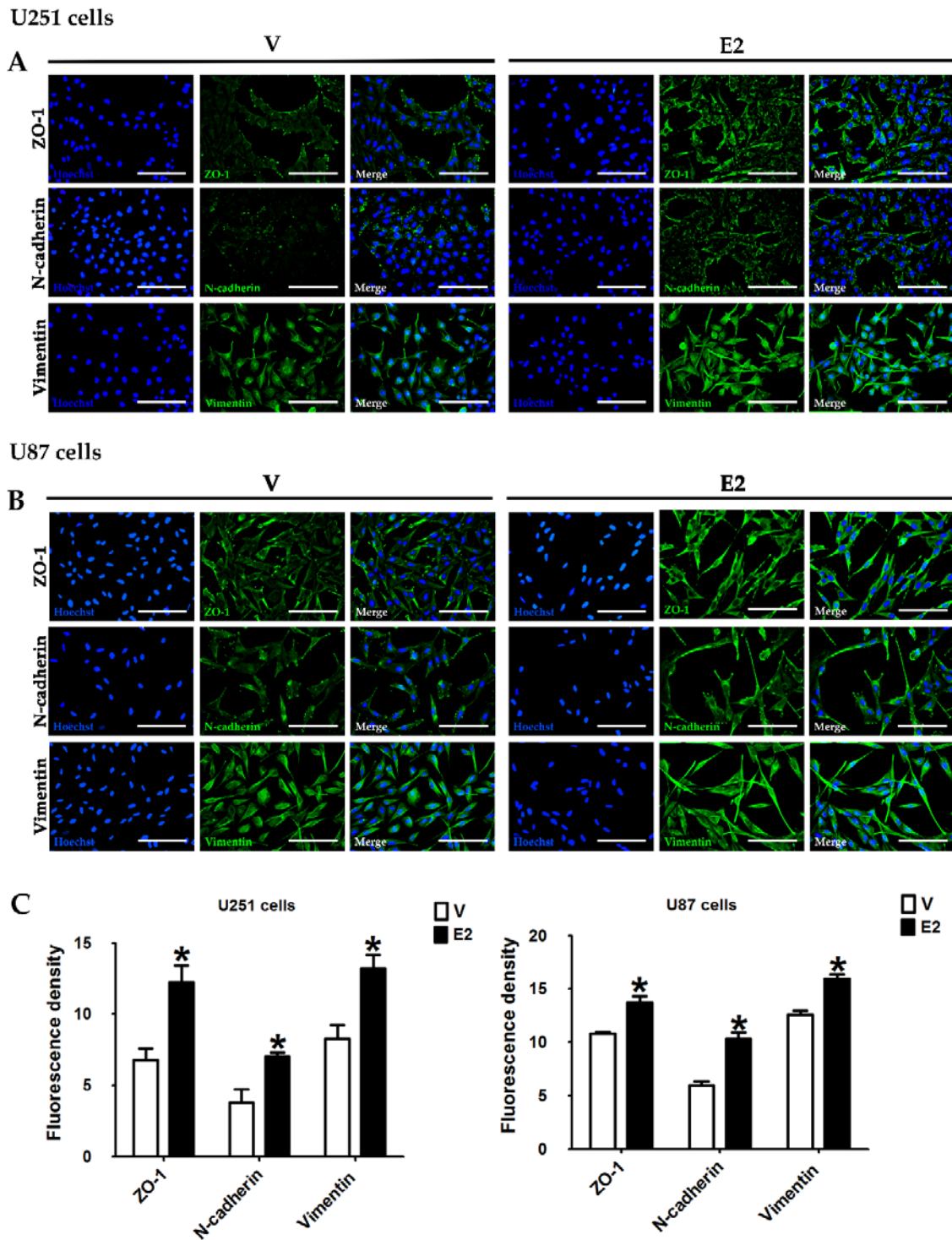


U87 cells



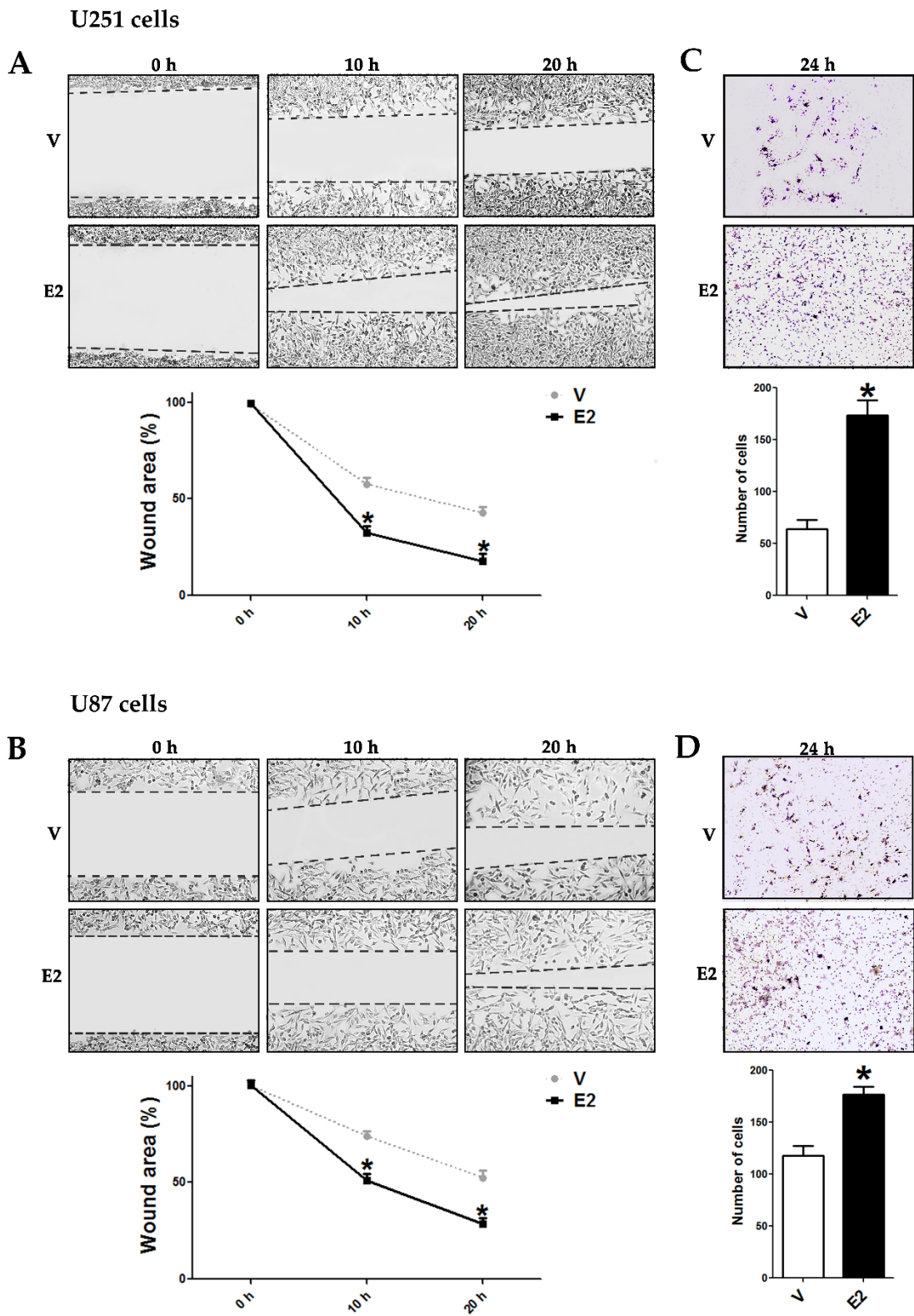
**Figure 4.** E2-regulated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) marker expression of human GBM-derived cells. (A,B) U251 and (C,D) U87 cells were treated with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10 nM) and vehicle (V, 0.01% cyclodextrin) for 24, 48, and 72 h. (A,C) Epithelial gene (tight junction protein 1 (TJP1)) and mesenchymal genes (vimentin (VIM) and cadherin-2/N-cadherin (CDH2)) expression was quantified by RT-qPCR using the comparative method  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  concerning the reference gene 18S rRNA. (B,D) Zonula occludens 1 (ZO-1), N-cadherin, and vimentin content was determined by Western blot. Densitometric analysis of EMT marker expression with their respective representative bands using  $\alpha$ -tubulin as a load control showed that E2 increased EMT marker expression with different temporal dynamics. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM);  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  vs. V.





**Figure 5.** E2 modified EMT marker distribution and immunoreactivity in human GBM-derived cells. ZO-1, N-cadherin, and vimentin immunostaining in (A) U251 and (B) U87 cells treated with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10 nM) and vehicle (V, 0.01% cyclodextrin) for 48 h. Representative images were captured under a fluorescence microscope at a magnification of 400 $\times$ . (C) EMT marker expression measured as a fluorescence density. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM);  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  vs. V.

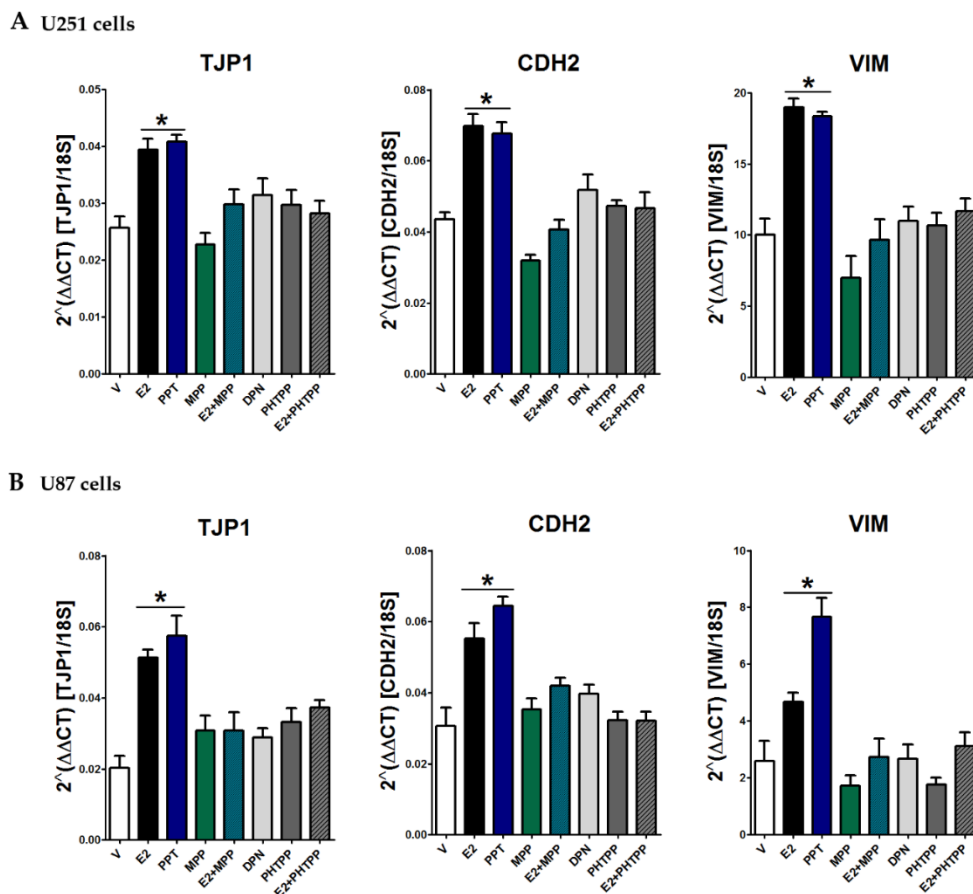




**Figure 6.** E2 increased migration and invasion of human GBM-derived cells. (A,B) Wound healing assays were performed in U251 and U87 cells treated with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10 nM) and vehicle (V, cyclodextrin 0.01%). Representative images of wound closure at 0, 10, and 20 h and quantification of the wound area are shown. (C,D) Transwell assays were carried out in both cell lines. Quantification of cells staining with 0.1% crystal violet dye shows the number of invasive cells. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM);  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  vs. V.

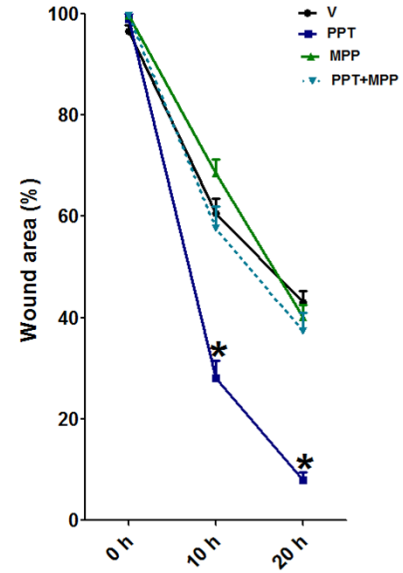
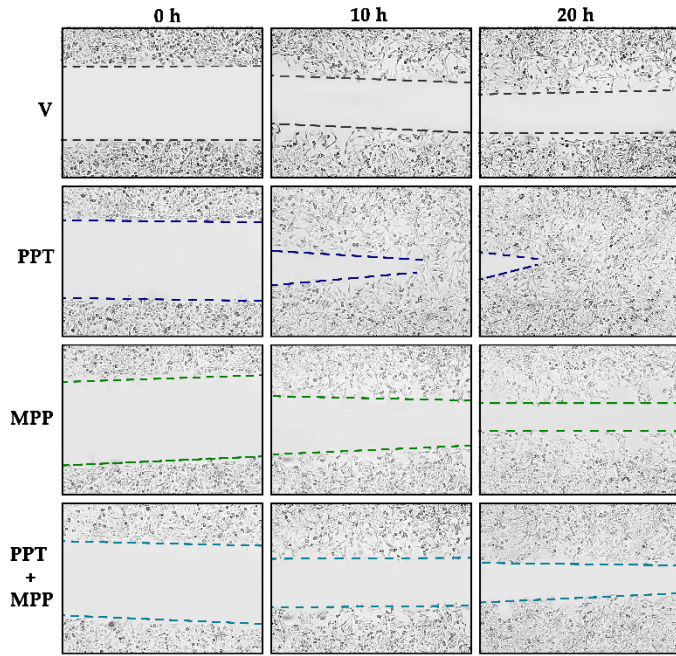
### 3.6. ER- $\alpha$ Mediated E2 Effects on EMT

To determine the intracellular receptor subtype involved in E2 effects, we used specific agonists and antagonists' ER subtypes and assessed the expression of EMT markers. PPT, a selective ER- $\alpha$  agonist, increased TJP1, CDH2, and VIM gene expression in a similar way to E2 in U251 and U87 cells, and ER- $\alpha$  antagonist MPP blocked E2 effects in both cell types (Figure 7A,B). Treatment with antagonist alone did not show a significant effect on the expression of EMT markers, consistent with characterization of the effects of MPP in vitro, which showed that the antagonist does not behave as a partial or inverse agonist when administered in absence of an agonist. Treatments with the ER- $\beta$ -selective agonist DPN and the antagonist PHTPP did not show any significant statistical effect on the regulation of EMT marker expression in either U251 or U87 cells (Figure 7A,B). These data suggest that E2 regulates EMT marker expression through the ER- $\alpha$  subtype. To functionally assess the role of ER- $\alpha$  in the EMT process, we performed wound healing assays using PPT and MPP. PPT-treated U251 cells rapidly closed the wound compared to cells treated with the vehicle, while the antagonist MPP blocked the PPT effect. Similarly, PPT increased the wound closure rate of U87 cells, and MPP blocked the agonist effect (Figure 8).

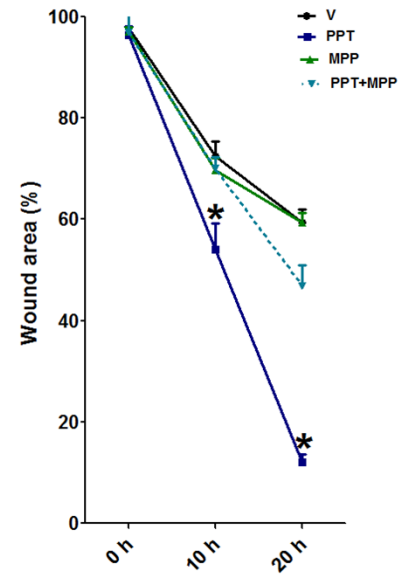
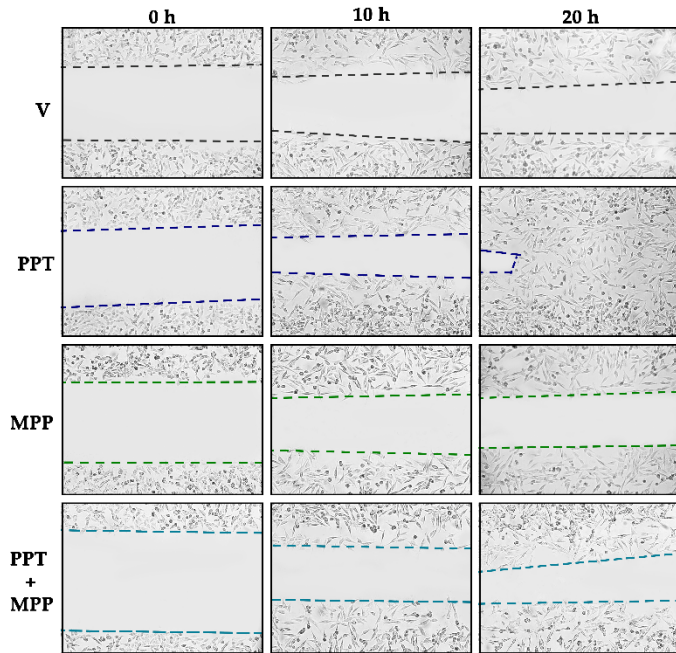


**Figure 7.** Effect of selective ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  agonists and antagonists on the EMT marker expression in GBM cells. U251 (A) and U87 (B) cells were treated with vehicle (V, 0.01% cyclodextrin + 0.01% DMSO), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10 nM), 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT, 10 nM, selective ER- $\alpha$  agonist), methyl-piperidino-pyrazole (MPP, 1  $\mu$ M, selective ER- $\alpha$  antagonist), E2 + MPP, diarylpropionitrile (DPN, 10 nM, selective ER- $\beta$  agonist), 4-[2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazole[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (PHTPP, 1  $\mu$ M, selective ER- $\beta$  antagonist), and E2 + PHTPP for 48 h. Epithelial gene (TJP1) and mesenchymal gene (VIM and CDH2) expression were quantified by RT-qPCR using the comparative method  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  concerning the reference gene 18S rRNA. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM);  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  vs. all other groups.

### U251 cells



### U87 cells



**Figure 8.** Effect of the selective ER- $\alpha$  agonist and antagonist on the migration of GBM cells. (A) U251 and (B) U87 cells that were treated for 20 h, with PPT (10 nM, selective ER- $\alpha$  agonist), MPP (1  $\mu$ M, selective ER- $\alpha$  antagonist), PPT + MPP, and vehicle (V, DMSO 0.01%). Wound healing assays determined the migratory capacity of the U251 and U87 cells. Representative images show wound closure at 0, 10, and 20 h and quantification of the wound area. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM);  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  vs. all other groups.

#### 4. Discussion

The present study provides evidence of E2 effects on EMT-related molecular and cellular processes in human GBM-derived cells. EMT comprises a set of states between the epithelial and mesenchymal phenotypes, and its activation could be closely related to the high degree of phenotypic heterogeneity of GBM.

GBM is a highly heterogeneous tumor at both the molecular and cellular levels. The TCGA determined the existence of four main subtypes with different molecular expression profiles [4], and some studies have shown the simultaneous presence of these subtypes within the same tumor [67,68]. GBM cells with proneural and mesenchymal expression are the most consistent subtypes in the literature. The proneural subtype is related to a more favorable prognosis, and the mesenchymal subtype tends to have the worst survival rate [5,69,70]. It has been shown that recurring GBM tumors that initially showed proneural expression presented mesenchymal expression profile after radiotherapy and chemotherapy [6,71,72], which has led to the proposal of a proneural–mesenchymal transition (PMT), whose molecular events are equivalent to those of EMT [7,73]. The transition between the two molecular subtypes is closely related to an enrichment of cells of the immune system within the GBM tumor microenvironment, which activate various signaling pathways that promote PMT/EMT [74–76]. The data shown in these studies highlight the importance of the factors found within the tumor microenvironment that promote phenotypic transitions between GBM subtypes. Immune system cells produce chemokines, cytokines, growth and angiogenic factors, immunosuppressive molecules, and extracellular matrix-modifying enzymes, which make the surroundings favorable for tumor progression [77]. Among the many factors found within the GBM tumor microenvironment, in this work, we focused on E2, which is produced by microglial cells, astrocytes, and GBM cells [78–81]. In this study, we evaluated E2 effects on the mesenchymal transition of human GBM-derived cells.

Both ER subtypes are predominantly expressed through healthy CNS; however, in human astrocytomas, both ER- $\alpha$  [45,47–49] and ER- $\beta$  [44] expression decreases as the grade of tumor malignancy increases. Therefore, different researchers have proposed that ER expression may be reduced or lost during tumor development, although it is not clear if this represents a cause or consequence of tumor development. Much remains to be investigated on this topic, since determining the mechanisms underlying ER decrease during the development of gliomas could better understand the malignant tumor progression. Our results regarding the decrease of ER- $\alpha$  expression in gliomas compared with healthy tissue show agreement with that observed in other investigations. Likewise, we showed that ER- $\alpha$  subtype expression is higher in GBM than LGG (**Figure 1A**), which suggests an important oncogenic role of such receptor in the development of low- and high-grade gliomas. Among gliomas, a higher expression of ER- $\alpha$  could be involved in developing a high-grade glioma (GBM), while lower ER- $\alpha$  expression is associated with LGG development. The decrease or loss of ER expression during tumor development supposes the homeostatic imbalance of the normal functions of ERs in cells. Although this topic is not yet well studied in GBM, in breast cancer, it has been determined in more detail that in the most malignant tumors with multiple metastases, the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) represses ER- $\alpha$  transcription through the enhancer of zeste homolog2 (EZH2), which negatively regulates ER- $\alpha$  transcription [82]. However, NF- $\kappa$ B also improves the recruitment of ER- $\alpha$  to estrogen response elements (EREs) of its target promoters and increases its transcriptional activity [83,84]. The change in ER- $\alpha$  functions may also be due to other factors, such as altered structural conformations that increase interaction with transcriptional coactivators, point mutations that promote active forms of the receptor in the absence of an agonist, or variations by alternative splicing that change receptor transactivation mechanisms [85–87]. These data suggest that ER- $\alpha$  expression levels may not always be proportional to its activity. The positive correlation of ER- $\beta$  expression concerning the GBM malignancy grade observed in this work does not correspond to other studies that find the opposite. However, we must consider that these studies do not specify the brain region of the used healthy tissue. We used expression data from the cerebral cortex, but there are other regions with a higher abundance of ESR2, such as the pons, cerebellum, thalamus, basal ganglia, and hypothalamus. Nevertheless, ESR1 and ESR2 expression on human GBM-derived cell lines were lower compared to healthy astrocytes, reinforcing the hypothesis of the studies above, which establish that the expression of both ER subtypes is inversely proportional to the tumor evolution degree. Different actions have been observed between ER subtypes in GBM. E2 (10 nM) and PPT (1 nM), the selective ER- $\alpha$  agonist, increased the number of cells derived from GBM [45], while treatment with different ER- $\beta$ -specific agonists decreased GBM cell proliferation [44]. Within the cancer context, a positive correlation has been determined between EMT activation and increased cell proliferation [88–91]. Previously, our group determined in GBM-derived cells that E2 induces cell growth and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), and cyclin D1 genes, which are involved in cell proliferation. These effects depended on ER- $\alpha$  activation [45]. This previous study represents the primary antecedent



of our work. Once we demonstrated that E2 induces cell growth in GBM cells, we decided to investigate the relationship between E2 and canonical cellular processes of EMT activation, such as morphological and actin cytoskeleton organization changes, EMT marker expression, as well as cellular migration and invasion, which represent the main functional consequences of cells that undergo EMT. Additionally, it is worth mentioning that recently Castruccio et al. demonstrated that E2 significantly increases cell proliferation in U87 cells [92], which is consistent with our previously published results [45]. Still, our survival analysis showed that both ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  expression was positively correlated with a poor prognosis. It is interesting to highlight that our results showed that expression of both ER subtypes was enriched in the mesenchymal subtype concerning the other subtypes since this data led us to investigate the role of ERs on the induction of the mesenchymal phenotype.

EMT is a transition process between cellular phenotypes; therefore, it involves cellular morphological changes. To characterize the effects of E2 on EMT-related processes, in this study, we first evaluated changes in the morphology of cells treated with E2. Our results showed that E2 significantly changed the morphology of the four GBM-derived cells, towards an elongated mesenchymal phenotype. Moreover, these changes were correlated with an actin filament rearrangement. E2 regulates the reorganization of actin filaments through phosphorylation of actin-binding proteins such as cofilin and moesin in neurons, fibroblasts, and breast and endometrial cancer cells [93–96]. During EMT, actin filaments progressively reorganize from thin cortical bundles to thick contractile filaments that withstand stress fibers. The mesenchymal phenotype presents distribution of actin filaments in a front–rear polarization, with a network of short actin filaments branched at the leading edge, and long filaments arranged in different types of fibers behind the leading edge, which are associated with adhesion structures. This arrangement of the mesenchymal actin network allows cells to carry out migratory and invasive processes [97–99]. Thus, in this study, we demonstrated that E2 promotes a morphology change in GBM cells towards a mesenchymal phenotype due to the rearrangement of actin filaments, which were assembled in parallel along the ventral surface with long projections toward the leading edge. These changes in cellular morphology and reorganization of actin filaments suggest that E2 provides GBM-derived cells migratory and invasive capabilities.

All molecular events that occur during EMT are spatially and temporally coordinated during the transition. Therefore, the reorganization of the actin filaments is coupled with the expression changes that modify the cellular phenotype. Previously, the EMT definition described a complete transition between two different states, the epithelial and mesenchymal phenotype. Therefore, the primary experimental model for EMT evaluated the decrease in epithelial markers and the increase in mesenchymal markers. However, this perspective has generated extensive debate about the presence of EMT in certain circumstances, such as in cancer progression, which tends to create hybrid epithelial/mesenchymal (E/M) phenotypes that exhibit both epithelial and mesenchymal characteristics in a process known as partial EMT. Hybrid E/M phenotypes in cancer cells present better migratory and invasive capacities, as well as higher resistance to therapy [100–102].

We showed that E2 increased the expression of the epithelial marker ZO-1 and the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin in U251 and U87 cells. However, the ZO-1 expression regulation was variable between cell lines, since in U251 cells, it only was increased by E2 at the mRNA level at 48 h, while in U87 cells, the expression increased both at the mRNA and protein levels at 48 and 72 h. ZO-1 marker is an adapter protein that binds to multiple components, such as integral proteins of the plasma membrane [103,104], and its presence is essential for assembly of tight and adherent junctions of epithelial cells [105,106]. Therefore, tumor cells from epithelial tissues decrease ZO-1 expression by activating EMT. The implications that ZO-1 expression may have on GBM have not yet been studied. Furthermore, our results showed that the regulation of E2 on ZO-1 expression varies between different human GBM-derived cell lines, possibly due to the different expression profiles among these cells [107,108].

N-cadherin is a transmembrane protein that belongs to the calcium-dependent cell adhesion molecule (CAMs) family that is characteristic of mesenchymal tissue. Increased N-cadherin expression promotes cells to form elongated multicellular chains that migrate faster and more persistently, with a higher proportion of actin stress fibers that provide contractile forces during cell migration [109–111]. EMT activation in GBM cells leads to increased expression of N-cadherin, which is associated with increased migratory and invasive capacities. Vimentin is a type III intermediate filament protein that has an essential role in integrity maintaining of mesenchymal cells by providing support and anchorage to organelles, in addition to offering flexibility to cells by stabilizing dynamic interactions of the cytoskeleton during cell migration [112–114]. During EMT, there is an extensive change in the composition of intermediate filaments of epithelial cells, which generally express cytokeratin and initiates the expression of vimentin when they differentiate towards the mesenchymal phenotype. Our results showed that E2 promotes the mesenchymal phenotype by increasing the expression of N-cadherin and vimentin both at the mRNA and protein levels in two different human GBM cell lines.

Although it was observed that E2 increased the expression of both epithelial and mesenchymal markers, we cannot affirm the induction of a partial EMT, since doing so requires the analysis of more epithelial and mesenchymal markers. However, our results open new perspectives regarding the determination of the status of E2-induced EMT in cells derived from GBM, since estradiol may promote partial EMT. Regardless of the status of EMT induced by E2, our results convincingly showed the acquisition of mesenchymal characteristics in GBM cells by E2 effect, since the changes in the expression of N-cadherin and vimentin are sufficiently forceful in the two cell lines studied.

Taken together, the effects promoted by E2 on GBM cells, such as reorganization of actin filaments as well as increased expression of N-cadherin and vimentin, are related to increased migratory and invasive capacities of U251 and U87 cells. These effects, associated with EMT activation, were replicated with PPT, a selective ER- $\alpha$  agonist that has a 410-fold relative binding affinity for ER- $\alpha$  over ER- $\beta$  [115], suggesting that the E2 effects on EMT are regulated through ER- $\alpha$ . The latter was verified when using a highly selective ER- $\alpha$  antagonist (MPP,  $K_i=2.7$ ) [116], which blocked effects produced by E2 on EMT marker expression, as well as the increase of the migratory capacity provided by PPT. Furthermore, neither agonist DNP nor antagonist PHTPP, both selective for ER- $\beta$  [117], showed significant effects on the expression of EMT markers. Therefore, we conclude that E2 effects observed on the expression of EMT markers are mainly produced by ER- $\alpha$  activation. Much remains to be known about the actions of both ER subtypes during the GBM's malignant progression. A more in-depth study of the molecular mechanisms of E2 signaling on GBM and its interaction with other signaling factors in specific cellular contexts is necessary for understanding E2 effects on this tumor, which could provide new strategies in GBM treatment.

In this work, we characterized E2-induced EMT in human GBM-derived cells. We found that E2 induces changes in cell morphology through actin filament reorganization and by increased expression of mesenchymal markers. These effects are related to the increased migratory and invasive capacities of GBM cells. Furthermore, E2 effects were mediated by ER- $\alpha$ , since the treatment with its agonist PPT produced similar results to E2, while the treatment with its antagonist MPP blocked these effects. Thus, E2 induces a mesenchymal phenotype through ER- $\alpha$  in cells derived from human GBM.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: E2-induced morphological changes in human GBM-derived T98G cells. Figure S2: E2-induced morphological changes in human GBM-derived LN229 cells.

**Author Contributions:** A.M.H.-V., A.D.M.-M., C.J.Z.-S., and A.G.P.-M. contributed to carrying out the experiments and data analysis. A.M.H.-V., A.G.-A., and I.C.-A. conceived and managed experiments. A.M.H.-V. and I.C.-A. contributed to writing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)*, project IN217120, DGAPA-UNAM, Mexico.

**Acknowledgments:** We would like to thank Marisol De La Fuente-Granada (Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico) for the facilitation of cell culture during morphology analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Gittleman, H.; Patil, N.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* **2019**, *21*, v1–v100, doi:10.1093/neuonc/noz150.
2. Furnari, F.B.; Fenton, T.; Bachoo, R.M.; Mukasa, A.; Stommel, J.M.; Stegh, A.; Hahn, W.C.; Ligon, K.L.; Louis, D.N.; Brennan, C. et al. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2683–2710, doi:10.1101/gad.1596707.
3. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W.. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
4. Verhaak, R.G.W.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
5. Phillips, H.S.; Kharbanda, S.; Chen, R.; Forrest, W.F.; Soriano, R.H.; Wu, T.D.; Misra, A.; Nigro, J.M.; Colman, H.; Soroceanu, L. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 157–173, doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019.

6. Bhat, K.P.L.; Balasubramaniyan, V.; Vaillant, B.; Ezhilarasan, R.; Hummelink, K.; Hollingsworth, F.; Wani, K.; Heathcock, L.; James, J.D.; Goodman, L.D. et al. Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- $\kappa$ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 331–346, doi:10.1016/j.ccr.2013.08.001.
7. Behnan, J.; Finocchiaro, G.; Hanna, G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain* **2019**, *142*, 847–866, doi:10.1093/brain/awz044.
8. Nieto, M.A.; Huang, R.Y.J.; Jackson, R.A.; Thiery, J.P. EMT: 2016. *Cell* **2016**, *166*, 21–45, doi:10.1016/j.cell.2016.06.028.
9. Skrypek, N.; Goossens, S.; De Smedt, E.; Vandamme, N.; Berx, G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet.* **2017**, *33*, 943–959, doi:10.1016/j.tig.2017.08.004.
10. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196, doi:10.1038/nrm3758.
11. Thiery, J.P.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 1–13, doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
12. Trelstad, R.L.; Hay, E.D.; Revel, J.D. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* **1967**, *16*, 78–106, doi:10.1016/0012-1606(67)90018-8.
13. Nieto, M.A.; Sargent, M.; Wilkinson, D.; Cooke, J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* **1994**, *6*, 835–839, doi:10.1126/science.7513443.
14. Lim, J.; Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions: Insights from development. *Development* **2012**, *139*, 3471–3486, doi:10.1242/dev.071209.
15. Lepilina, A.; Coon, A.N.; Kikuchi, K.; Holdway, J.E.; Roberts, R.W.; Burns, C.G.; Poss, K.D. A Dynamic Epicardial Injury Response Supports Progenitor Cell Activity during Zebrafish Heart Regeneration. *Cell* **2006**, *127*, 607–619, doi:10.1016/j.cell.2006.08.052.
16. Stone, R.C.; Pastar, I.; Ojeh, N.; Chen, V.; Liu, S.; Garzon, K.I.; Tomic-Canic, M. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 495–506, doi:10.1007/s00441-016-2464-0.
17. Dongre, A.; Weinberg, R.A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 69–84, doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
18. Kahlert, U.D.; Joseph, J.V.; Kruyt, F.A.E. EMT- and MET-related processes in non-epithelial tumors: Importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. *Mol. Oncol.* **2017**, *11*, 860–877, doi:10.1002/1878-0261.12085.
19. Kahlert, U.D.; Nikkhah, G.; Maciaczyk, J. Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett.* **2013**, *331*, 131–138, doi:10.1016/j.canlet.2012.12.010.
20. Brabletz, T.; Kalluri, R.; Nieto, M.A.; Weinberg, R.A. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 128–134, doi:10.1038/nrc.2017.118.
21. Freije, W.A.; Castro-Vargas, F.E.; Fang, Z.; Horvath, S.; Cloughesy, T.; Liau, L.M.; Mischel, P.S.; Nelson, S.F. Gene Expression Profiling of Gliomas Strongly Predicts Survival. *Cancer Res.* **2004**, *15*, 6503–6510, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0452.
22. Tso, C.L.; Shintaku, P.; Chen, J.; Liu, Q.; Liu, J.; Chen, Z.; Yoshimoto, K.; Mischel, P.S.; Cloughesy, T.F.; Liau, L.M. et al. Primary Glioblastomas Express Mesenchymal Stem-Like Properties. *Mol. Cancer Res.* **2006**, *4*, 607–619, doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0005.
23. Zarkoob, H.; Taube, J.H.; Singh, S.K.; Mani, S.A.; Kohandel, M. Investigating the Link between Molecular Subtypes of Glioblastoma, Epithelial-Mesenchymal Transition, and CD133 Cell Surface Protein. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64169, doi:10.1371/journal.pone.0064169.
24. Azcoitia, I.; Yague, J.G.; Garcia-Segura, L.M. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* **2011**, *191*, 139–147, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.012.
25. Barakat, R.; Oakley, O.; Kim, H.; Jin, J.; Ko, C.M.J. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Rep.* **2016**, *49*, 488–496, doi:10.5483/bmbrep.2016.49.9.141.
26. Toran-allerand, C.D. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area In Vitro: Implications for sexual differentiation. *Brain Res.* **1976**, *106*, 407–412, doi:10.1016/0006-8993(76)91038-6.
27. Díaz, N.F.; Guerra-Arraiza, C.; Díaz-Martínez, N.E.; Salazar, P.; Molina-Hernández, A.; Camacho-Arroyo, I.; Velasco, I. Changes in the content of estrogen  $\alpha$  and progesterone receptors during differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Brain Res. Bull.* **2007**, *73*, 75–80, doi:10.1016/j.brainresbull.2007.02.002.
28. Denley, M.C.S.; Gatford, N.J.F.; Sellers, K.J.; Srivastava, D.P. Estradiol and the development of the cerebral cortex: An unexpected role? *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 245, doi:10.3389/fnins.2018.00245.
29. Díaz, H.; Lorenzo, A.; Carrer, H.F.; Cáceres, A. Time lapse study of neurite growth in hypothalamic dissociated neurons in culture: Sex differences and estrogen effects. *J. Neurosci. Res.* **1992**, *33*, 266–281, doi:10.1002/jnr.490330210.
30. Pérez, J.; Naftolin, F.; García-Segura, L.M. Sexual differentiation of synaptic connectivity and neuronal plasma membrane in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* **1990**, *527*, 116–122, doi:10.1016/0006-8993(90)91068-r.
31. Sugiyama, N.; Andersson, S.; Lathe, R.; Fan, X.; Schwend, T.; Nalvarte, I. Spatiotemporal dynamics of the expression of estrogen receptors in the postnatal mouse brain. *Mol. Psychiatry* **2009**, *14*, 223–232, doi:10.1038/mp.2008.118.

32. Barth, C.; Villringer, A.; Sacher, J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 37, doi:10.3389/fnins.2015.00037.
33. Hansberg-Pastor, V.; González-Arenas, A.; Piña-Medina, A.G.; Camacho-Arroyo, I. Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Front. Psychiatry* **2015**, *6*, 165, doi:10.3389/fpsy.2015.00165.
34. Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Häggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* **1997**, *138*, 863–870, doi:10.1210/endo.138.3.4979.
35. Russo, J.; Russo, I.H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *102*, 89–96, doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.004.
36. Cunat, S.; Hoffmann, P.; Pujol, P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **2004**, *94*, 25–32, doi:10.1016/j.ygyno.2004.03.026.
37. Kumar, M.M.; Davuluri, S.; Poojar, S.; Mukherjee, G.; Bajpai, A.K.; Bafna, U.D.; Devi, U.K.; Kallur, P.P.R.; Kshitish, A.K.; Jayshree, R.S. Role of estrogen receptor alpha in human cervical cancer-associated fibroblasts: A transcriptomic study. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 4409–4420, doi:10.1007/s13277-015-4257-6.
38. Di Zazzo, E.; Galasso, G.; Giovannelli, P.; Di-Donato, M.; Castoria, G. Estrogens and Their Receptors in Prostate Cancer: Therapeutic Implications. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 1–7, doi:10.3389/fonc.2018.00002.
39. Pearce, S.T.; Jordan, V.C. The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *50*, 3–22, doi:10.1016/j.critrevonc.2003.09.003.
40. Vaquero, J.; Marcos, M.L.; Martínez, R.; Bravo, G. Estrogen- and progesterone-receptor proteins in intracranial tumors. *Surg. Neurol.* **1983**, *19*, 11–13, doi:10.1016/0090-3019(83)90201-x.
41. Carroll, R.S.; Zhang, J.; Dashner, K.; Sar, M.; Black, P.M. Steroid Hormone Receptors in Astrocytic Neoplasms. *Neurosurgery* **1995**, *37*, 496–504, doi:10.1227/00006123-199509000-00019.
42. Khalid, H.; Yasunaga, A.; Kishikawa, M.; Shibata, S. Immunohistochemical expression of the estrogen receptor-related antigen (ER-D5) in human intracranial tumors. *Cancer* **1995**, *75*, 2571–2578, doi:10.1002/1097-0142(19950515)75:10<2571:aid-cncr2820751026>3.0.co;2-u.
43. Batistatou, A.; Stefanou, D.; Goussia, A.; Arkoumani, E.; Papavassiliou, A.; Agnantis, N. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2004**, *130*, 405–410, doi:10.1007/s00432-004-0548-9.
44. Sareddy, G.R.; Nair, B.C.; Gonugunta, V.K.; Zhang, Q.g.; Brenner, A.; Brann, D.W.; Tekmal, R.R.; Vadlamudi, R.K. Therapeutic Significance of Estrogen Receptor Agonists in Gliomas. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 1174–1182, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0960.
45. González-Arenas, A.; Hansberg-Pastor, V.; Hernández-Hernández, O.T.; González-García, T.K.; Henderson-Villalpando, J.; Lemus-Hernández, D.; Cruz-Barrios, A.; Rivas-Suárez, M.; Camacho-Arroyo, I. Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER $\alpha$  activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 379–386, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.11.004.
46. Li, W.; Winters, A.; Poteet, E.; Ryou, M.G.; Lin, S.; Hao, S.; Wu, Z.; Yuan, F.; Hatanpaa, K.J.; Simpkins, J.W. et al. Involvement of estrogen receptor  $\beta$ 5 in the progression of glioma. *Brain Res.* **2013**, *1503*, 97–107, doi:10.1016/j.brainres.2013.02.004.
47. Dueñas, J.M.; Candanedo, A.; Santerre, A.; Orozco, S.; Sandoval, H.; Fera, I.; López-Elizalde, R.; Venegas, M.A.; Netel, B.; de la Torre-Valdovinos, B. et al. Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J. Neurooncol.* **2014**, *119*, 275–284, doi:10.1007/s11060-014-1509-z.
48. Liu, C.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Bian, C.; Zhao, Y.; Zhang, J. Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol.* **2014**, *38*, 291–297, doi:10.1016/j.canep.2014.03.001.
49. Tavares, C.B.; Gomes-Braga, F.; Sousa, E.B.; Borges, U.S.; Escórcio-Dourado, C.S.; Da Silva-Sampaio, J.P.; Borges da Silva, B. Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2018**, *64*, 1129–1133, doi:10.1590/1806-9282.64.12.1129.
50. Wan, S.; Jiang, J.; Zheng, C.; Wang, N.; Zhai, X.; Fei, X.; Wu, R.; Jiang, X. Estrogen nuclear receptors affect cell migration by altering sublocalization of AQP2 in glioma cell lines. *Cell Death Discov.* **2018**, *4*, 49, doi:10.1038/s41420-018-0113-y.
51. Park, S.H.; Cheung, L.W.T.; Wong, A.S.T.; Leung, P.C.K. Estrogen Regulates Snail and Slug in the Down-Regulation of E-Cadherin and Induces Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells through Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* **2008**, *22*, 2085–2098, doi:10.1210/me.2007-0512.
52. Mishra, S.; Tai, Q.; Gu, X.; Schmitz, J.; Poullard, A.; Fajardo, R.J.; Mahalingam, D.; Chen, X.; Zhu, X.; Sun, L.Z. Estrogen and Estrogen Receptor Alpha Promotes Malignancy and Osteoblastic Tumorigenesis in Prostate Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 44388–44402, doi:10.18632/oncotarget.6317.
53. Shi, X.; Peng, Y.; Du, X.; Liu, H.; Klocker, H.; Lin, Q.; Shi, J.; Zhang, J. Estradiol promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human benign prostatic epithelial cells. *Prostate* **2017**, *77*, 1424–1437, doi:10.1002/pros.23404.



54. Dhasarathy, A.; Kajita, M.; Wade, P.A. The Transcription Factor Snail Mediates Epithelial to Mesenchymal Transitions by Repression of Estrogen Receptor- $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 2907–2918, doi:10.1210/me.2007-0293.
55. Al Saleh, S.; Al Mulla, F.; Luqmani, Y.A. Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20610, doi:10.1371/journal.pone.0020610.
56. Bouris, P.; Skandalis, S.S.; Piperigkou, Z.; Afratis, N.; Karamanou, K.; Aletras, A.J.; Moustakas, A.; Theocharis, A.D.; Karamanos, N.K. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biol.* **2015**, *43*, 42–60, doi:10.1016/j.matbio.2015.02.008.
57. Scherbakov, A.M.; Andreeva, O.E.; Shatskaya, V.A.; Krasil'nikov, M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **2012**, *113*, 2147–2155, doi:10.1002/jcb.24087.
58. Wik, E.; Ræder, M.B.; Krakstad, C.; Trovik, J.; Birkeland, E.; Hoivik, E.A.; Mjos, S.; Werner, H.M.J.; Mannelqvist, M.; Stefansson, I.M. et al. Lack of estrogen receptor- $\alpha$  is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1094–1105, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3039.
59. Colaprico, A.; Silva, T.C.; Olsen, C.; Garofano, L.; Cava, C.; Garolini, D.; Sabedot, T.S.; Malta, T.M.; Pagnotta, S.M.; Castiglioni, I. et al. TCGAAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e71, doi:10.1093/nar/gkv1507.
60. Costa-Silva, J.; Domingues, D.; Lopes, F.M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0190152, doi:10.1371/journal.pone.0190152.
61. Bakal, C.; Church, G.; Perrimon, N. Quantitative Morphological Signatures Define Local Signaling Networks Regulating Cell Morphology. *Science* **2007**, *316*, 1753–1756, doi:10.1126/science.1140324.
62. Carpenter, A.E.; Jones, T.R.; Lamprecht, M.R.; Clarke, C.; Kang, I.; Friman, O.; Guertin, D.A.; Chang, J.H.; Lindquist, R.A.; Moffat, J. et al. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **2006**, *7*, R100, doi:10.1186/gb-2006-7-10-r100.
63. Chen, S.; Zhao, M.; Wu, G.; Yao, C.; Zhang, J. Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis. *Comput. Math. Methods Med.* **2012**, *2012*, 101536, doi:10.1155/2012/101536.
64. Ren, Z.X.; Yu, H.B.; Li, J.S.; Shen, J.L.; Du, W.S. Suitable parameter choice on quantitative morphology of A549 cell in epithelial–mesenchymal transition. *Biosci. Rep.* **2015**, *35*, e00202, doi:10.1042/BSR20150070.
65. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108, doi:10.1038/nprot.2008.73.
66. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45, doi:10.1093/nar/29.9.e45.
67. Sottoriva, A.; Spiteri, I.; Piccirillo, S.G.M.; Touloumis, A.; Collins, V.P.; Marioni, J.C.; Curtis, C.; Watts, C.; Tavaré, S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 4009–4014, doi:10.1073/pnas.1219747110.
68. Patel, A.P.; Tirosh, I.; Trombetta, J.J.; Shalek, A.K.; Gillespie, S.M.; Wakimoto, H.; Cahill, D.P.; Nahed, B.V.; Curry, W.T.; Martuza, R.L. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **2014**, *344*, 1396–1401, doi:10.1126/science.1254257.
69. Lin, N.; Yan, W.; Gao, K.; Wang, Y.; Zhang, J.; You, Y. Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: A multi-institutional analysis of 941 cases. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94871, doi:10.1371/journal.pone.0094871.
70. Olar, A.; Aldape, K.D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 165–177, doi:10.1002/path.4282.
71. Ozawa, T.; Riester, M.; Cheng, Y.; Huse, J.T.; Squatrito, M.; Helmy, K.; Charles, N.; Michor, F.; Holland, E.C. Most Human Non-GCIMP Glioblastoma Subtypes Evolve from a Common Proneural-like Precursor Glioma. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 288–300, doi:10.1016/j.ccr.2014.06.005.
72. Segerman, A.; Niklasson, M.; Haglund, C.; Bergström, T.; Jarvius, M.; Xie, Y.; Westermarck, A.; Sönmez, D.; Hermansson, A.; Kastemar, M. et al. Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 2994–3009, doi:10.1016/j.celrep.2016.11.056.
73. Fedele, M.; Cerchia, L.; Pegoraro, S.; Sgarra, R.; Manfioletti, G. Proneural-mesenchymal transition: Phenotypic plasticity to acquire multitherapy resistance in glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2746, doi:10.3390/ijms20112746.
74. Wang, Q.; Hu, B.; Hu, X.; Kim, H.; Squatrito, M.; Scarpace, L.; deCarvalho, A.C.; Lyu, S.; Li, P.; Li, Y. et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 42–56, doi:10.1016/j.ccell.2017.06.003.
75. Stanzani, E.; Martínez-Soler, F.; Mateos, T.M.; Vidal, N.; Villanueva, A.; Pujana, M.A.; Serra-Musach, J.; Iglesia, N.; Giménez-Bonafé, P.; Tortosa, A. Radioresistance of mesenchymal glioblastoma initiating cells correlates with patient outcome and is associated with activation of inflammatory program. *Oncotarget* **2017**, *8*, 73640–73653, doi:10.18632/oncotarget.18363.

76. Kaffes, I.; Szulzewsky, F.; Chen, Z.; Herting, C.J.; Gabanic, B.; Velazquez, J.E.; Shelton, J.; Switchenko, J.M.; Ross, J.L.; McSwain, L.F. et al. Human Mesenchymal glioblastomas are characterized by an increased immune cell presence compared to Proneural and Classical tumors presence compared to Proneural and Classical tumors. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1655360. doi:10.1080/2162402X.2019.1655360.
77. Quail, D.F.; Joyce, J.A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 326–341, doi:10.1016/j.ccell.2017.02.009.
78. Bruce-Keller, A.J.; Keeling, J.L.; Keller, J.N.; Huang, F.F.; Camondola, S.; Mattson, M.P. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* **2000**, *141*, 3646–3656, doi:10.1210/endo.141.10.7693.
79. Baker, A.E.; Brautigam, V.M.; Watters, J.J. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* **2004**, *145*, 5021–5032, doi:10.1210/en.2004-0619.
80. Acaz-Fonseca, E.; Sanchez-Gonzalez, R.; Azcoitia, I.; Arevalo, M.A.; Garcia-Segura, L.M. Role of Astrocytes in the Neuroprotective Actions of 17 $\beta$ -estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators. *Mol. Cell Endocrinol.* **2014**, *389*, 48–57, doi:10.1016/j.mce.2014.01.009.
81. Pinacho-Garcia, L.M.; Valdez, R.A.; Navarrete, A.; Cabeza, M.; Segovia, J.; Romano, M.C. The Effect of Finasteride and Dutasteride on the Synthesis of Neurosteroids by Glioblastoma Cells. *Steroids* **2020**, *155*, 108556, doi:10.1016/j.steroids.2019.108556.
82. Reijm, E.; Jansen, M.; Ruigrok-Ritstier, K.; van Staveren, I.L.; Look, M.; van Gelder, M.E.M.; Sieuwerts, A.M.; Sleijfer, S.; Foekens, J.A.; Berns, E.M.J.J. Decreased expression of EZH2 is associated with upregulation of ER and favorable outcome to tamoxifen in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2011**, *125*(2), 387–394, doi:10.1007/s10549-010-0836-9.
83. Frasar, J.; Weaver, A.; Pradhan, M.; Dai, Y.; Miller, L.D.; Lin, C.Y.; Stanculescu, A. Positive cross-talk between estrogen receptor and NF- $\kappa$ B in breast cancer. *Cancer Res.* **2009**, *14*, 8918–8925, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2608.
84. Frasar, J.; El-Shennawy, L.; Stender, J.; Kastrati, I. NF $\kappa$ B affects estrogen receptor expression and activity in breast cancer through multiple mechanisms. *Mol. Cell Endocrinol.* **2015**, *418*, 235–239, doi:10.1016/j.mce.2014.09.013.
85. Hui, H.; Hongying, Z.; Qingbin, K.; Yangfu, J. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp. Hematol. Oncol.* **2018**, *7*, 24, doi:10.1186/s40164-018-0116-7.
86. Katzenellenbogen, J.; Mayne, C.; Katzenellenbogen, B.; Greene, G.; Chandarlapaty, S. Structural Underpinnings of Estrogen Receptor Mutations in Endocrine Therapy Resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 377–388, doi:10.1038/s41568-018-0001-z.
87. Christoforos, T.; Gustafsson, J. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* **2015**, *26*, 467–476, doi:10.1016/j.tem.2015.06.007.
88. Thompson, S.; Petti, F.; Sujka-Kwok, I.; Mercado, P.; Bean, J.; Monaghan, M.; Seymour, S.L.; Argast, G.M.; Epstein, D.M.; Haley, J.D. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis* **2011**, *28* (2), 137–155, doi:10.1007/s10585-010-9367-3.
89. D'Souza, R.; Knitte, A.; Nagaraj, N.; van Dinther, M.; Choudhary, C.; Dijke, P.; Mann, M.; Sharma, K. Time-resolved dissection of early phosphoproteome and ensuing proteome changes in response to TGF- $\beta$ . *Sci Signal* **2014**, *7*, 5, doi:10.1126/scisignal.2004856.
90. Rojas-Puente, L.; Cardona, A.; Carranza, H.; Vargas, C.; Jaramillo, L.; Zea, D.; Cetina, L.; Wills, B.; Ruiz-Garcia, E.; Arrieta, O. Epithelial-mesenchymal transition, proliferation, and angiogenesis in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy. *Cancer Med.* **2016**, *5*, 1989–1999, doi:10.1002/cam4.751.
91. Qun-Ying, L.; Zhang, H.; Zhao, B.; Zheng-Yu, Z.; Bai, F.; Xin-Hai, P.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Kun-Liang, G. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 2426–2436, doi:10.1128/MCB.01874-07.
92. Castruccio, C.; Longhitano, L.; Distefano, A.; Anfuso, D.; Kalampoka, S.; Spina, E.L.; Astuto, M.; Avola, R.; Caruso, M.; Nicolosi, D. et al. Role of 17 $\beta$ -Estradiol on Cell Proliferation and Mitochondrial Fitness in Glioblastoma Cells. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 2314693, doi:10.1155/2020/2314693.
93. DePasquale, J.A. Rearrangement of the F-actin cytoskeleton in estradiol-treated MCF-7 breast carcinoma cells. *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *112*, 341–350, doi:10.1007/s004180050415.
94. Briz, V.; Baudry, M. Estrogen regulates protein synthesis and actin polymerization in hippocampal neurons through different molecular mechanisms. *Front. Endocrinol* **2014**, *5*, 22, doi:10.3389/fendo.2014.00022.
95. Carnesecchi, J.; Malbouyres, M.; De Mets, R.; Balland, M.; Beauchef, G.; Vié, K.; Chamot, C.; Lionnet, C.; Ruggiero, F.; Vanacker, J.M. Estrogens Induce Rapid Cytoskeleton Re-Organization in Human Dermal Fibroblasts via the Non-Classical Receptor GPR30. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120672, doi:10.1371/journal.pone.0120672.
96. Flamini, M.I.; Sanchez, A.M.; Goglia, L.; Tosi, V.; Genazzani, A.R.; Simoncini, T. Differential actions of estrogen and SERMs in regulation of the actin cytoskeleton of endometrial cells. *Mol. Hum. Reprod.* **2009**, *15*, 675–685, doi:10.1093/molehr/gap045.
97. O'Neill, G.M. The coordination between actin filaments and adhesion in mesenchymal migration. *Cell Adhes. Migr.* **2009**, *3*, 355–357, doi:10.4161/cam.3.4.9468.

98. Hotulainen, P.; Lappalainen, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 383–394, doi:10.1083/jcb.200511093.
99. Zaidel-Bar, R.; Ballestrem, C.; Kam, Z.; Geiger, B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4605–4613, doi:10.1242/jcs.00792.
100. Saitoh, M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J. Biochem.* **2018**, *164*, 257–264, doi:10.1093/jb/mvy047.
101. Aiello, N.M.; Maddipati, R.; Norgard, R.J.; Balli, D.; Li, J.; Yuan, S.; Yamazoe, T.; Black, T.; Sahmoud, A.; Furth, E.E. et al. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev. Cell* **2018**, *45*, 681–695.e4, doi:10.1016/j.devcel.2018.05.027.
102. Yang, J.; Antin, P.; Berx, G.; Blanpain, C.; Brabletz, T.; Bronner, M.; Campbell, K.; Cano, A.; Casanova, J.; Christofori, G. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 341–352, doi:10.1038/s41580-020-0237-9.
103. Bazzoni, G.; Martínez-Estrada, O.M.; Orsenigo, F.; Cordenonsi, M.; Citi, S.; Dejana, E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20520–20526, doi:10.1074/jbc.M905251199.
104. Ebnet, K.; Schulz, C.U.; Meyer Zu Brickwedde, M.K.; Pendl, G.G.; Vestweber, D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27979–27988, doi:10.1074/jbc.M002363200.
105. McNeil, E.; Capaldo, C.T.; Macara, I.G. Zonula Occludens-1 Function in the Assembly of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 1922–1932, doi:10.1091/mbc.e05-07-0650.
106. Fanning, A.S.; Anderson, J.M. Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1165*, 113–120, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.
107. Patil, V.; Pal, J.; Somasundaram, K. Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget* **2015**, *6*, 43452–43471, doi:10.18632/oncotarget.6171.
108. Li, H.; Lei, B.; Xiang, W.; Wang, H.; Feng, W.; Liu, Y.; Qi, S. Differences in protein expression between the U251 and U87 cell lines. *Turk. Neurosurg.* **2017**, *27*, 894–903, doi:10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1.
109. Derycke, L.D.M.; Bracke, M.E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.* **2004**, *48*, 463–476, doi:10.1387/ijdb.041793ld.
110. Shih, W.; Yamada, S. N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 3661–3670, doi:10.1242/jcs.103861.
111. Shih, W.; Yamada, S. N-cadherin as a key regulator of collective cell migration in a 3D environment. *Cell Adhes. Migr.* **2012**, *6*, 513–517, doi:10.4161/cam.21766.
112. Katsumoto, T.; Mitsushima, A.; Kurimura, T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol. Cell* **1990**, *68*, 139–146, doi:10.1016/0248-4900(90)90299-i.
113. Chang, L.; Goldman, R.D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 601–613, doi:10.1038/nrm1438.
114. Goldman, R.D.; Khuon, S.; Chou, Y.H.; Opal, P.; Steinert, P.M. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 971–983, doi:10.1083/jcb.134.4.971.
115. Stauffer, S.R.; Coletta, C.J.; Tedesco, R.; Nishiguchi, G.; Carlson, K.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B.S.; Katzenellenbogen, J.A. Pyrazole ligands: Structure-Affinity/activity relationships and estrogen receptor- $\alpha$ -selective agonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4934–4947, doi:10.1021/jm000170m.
116. Sun, J.; Huang, Y.R.; Harrington, W.R.; Sheng, S.; Katzenellenbogen, J.A.; Katzenellenbogen, B.S. Antagonists selective for estrogen receptor  $\alpha$ . *Endocrinology* **2002**, *143*, 941–947, doi:10.1210/endo.143.3.8704.
117. Meyers, M.J.; Sun, J.; Carlson, K.E.; Marriner, G.A.; Katzenellenbogen, B.S.; Katzenellenbogen, J.A. Estrogen receptor- $\beta$  potency-selective ligands: Structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4230–4251, doi:10.1021/jm010254a.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).