



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR MEMBRANAL A  
ESTRÓGENOS GPR30 EN CÉLULAS DERIVADAS DE GLIOBLASTOMAS  
HUMANOS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LBD. Karla Mariana Peña Gutiérrez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Unidad de Investigación en Reproducción Humana Instituto Nacional de Perinatología-  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rocío Ángeles García Becerra, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Elizabeth Langley McCarron, Instituto Nacional de Cancerología.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Junio, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Peña Gutiérrez Karla Mariana**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 18 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización de la expresión del receptor membranal a estrógenos GPR30 en células derivadas de glioblastomas humanos**", dirigida por el Dr. **Camacho Arroyo Ignacio**.

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

|            |                                 |
|------------|---------------------------------|
| PRESIDENTE | Velasco Velázquez Marco Antonio |
| VOCAL      | Rodríguez Dorantes Mauricio     |
| VOCAL      | Vázquez Martínez Edgar Ricardo  |
| VOCAL      | Robles Flores Martha            |
| SECRETARIO | González Arenas Aliesha         |

**A LOS MIEMBROS DEL JURADO:**

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **20(Maestría)** días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

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 18 de octubre de 2021**  
**COORDINADORA**



**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

## **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 el Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

Al comité tutorial formado por la Dra. Rocío Ángeles García Becerra, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y a la Dra. Elizabeth Langley McCarron, Instituto Nacional de Cancerología, quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Karina Hernández Ortega del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, por la supervisión y asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

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

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

A los miembros del jurado formado por:

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

Dra. Martha Robles Flores

Dra. Aliesha González Arenas

Por su asesoría y comentarios en esta tesis.

A Raúl García, gracias por ser mi compañero en esta aventura, por todo los días en los que me enseñaste a tener coraje, confianza, fuerza, a escuchar mi propia voz, por todo el apoyo incondicional día tras día. Agradezco que la vida nos allá cruzado en el camino, te amo.

A mi familia, por siempre estar ahí apoyándome, porque siempre serán parte importante de mi vida, porque siempre puedo contar con su abrazo reconfortante para el corazón. Gracias Elizabeth, José, Rebeca, Isaul, Marcela, Margarita, Roberto, Guillermo, Leticia, Tomas.

A Claudia y Carmen, por todos los días que pasamos juntas, por todas las enseñanzas y el apoyo en el laboratorio, por las risas en los momentos de mayor frustración, escuchar en los momentos difíciles y las múltiples tazas de café.

A mi gran amigo Dr. Raúl Sampieri, por siempre apoyarme y darme ánimos, por ser una persona que siempre me inspira y alienta a seguir, también a la Dra. Virginia Inclán, por todo su apoyo, enseñanzas y confianza.

A la Dra. Karina Hernández, por toda tu ayuda, apoyo incondicional, por escucharme y alentarme, por toda la confianza, risas, dulces, por la calidez humana que cada día me brindas.

A mi asesor Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por darme la confianza de ingresar a su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y guía para que me siga desarrollando en este ámbito académico, siempre escuchando y brindando apoyo.

A Karla de 14 años, que soñó un día con estar en un laboratorio para descubrir cosas del cerebro, y que hoy está en un laboratorio descubriendo cosas cada día.

*"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas"*

*Marie Curie*

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....  | 1  |
| SUMMARY.....   | 3  |
| RESUMEN .....  | 5  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 7  |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 9  |
| 2.1. Gliomas.....  | 11 |
| 2.1.1. Glioblastoma.....   | 13 |
| 2.2. Estrógenos.....   | 19 |
| 2.2.1. Síntesis de los estrógenos.....                                       | 19 |
| 2.2.2. Estradiol (E2) y su mecanismo de acción.....                          | 22 |
| 2.2.3. E2 y su mecanismo de acción en diferentes tipos de<br>cáncer.....     | 25 |
| 2.2.4. E2 y su mecanismo de acción en la progresión del GB.....              | 29 |
| 2.3. Receptor a estrógenos acoplado a proteínas G<br>(GPR30/GPER/GPER1)..... | 30 |
| 2.3.1. GPER y su papel en diferentes tipos de cáncer.....                    | 37 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 40 |
| 4. HIPÓTESIS.....  | 40 |
| 5. OBJETIVOS.....  | 40 |
| 5.1. Objetivo general.....   | 40 |
| 5.2. Objetivos particulares.....   | 41 |
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....  | 41 |
| 6.1. Cultivo celular.....  | 41 |
| 6.1.1. Tratamientos con E2 .....   | 41 |
| 6.2. Extracción de RNA.....  | 42 |
| 6.3. Transcripción Reversa (RT).....   | 43 |
| 6.4. RT-qPCR.....  | 43 |
| 6.5. Extracción de proteínas y <i>western blot</i> .....                     | 45 |
| 6.6. Inmunofluorescencia.....  | 46 |
| 6.7 Predicción de elementos de respuesta a estrógenos (ERE).....             | 47 |
| 6.9. Análisis estadístico .....  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| 7. RESULTADOS.....  | 48 |
| 7.1. Expresión basal del RNAm de GPER en líneas celulares derivadas de GBs humanos.....                   | 48 |
| 7.2. Expresión basal de la proteína de GPER en líneas celulares derivadas de GB humano.....               | 49 |
| 7.3. Localización subcelular de GPER en líneas celulares derivadas de GB humano.....                      | 51 |
| 7.4. El E2 incrementa la expresión de la proteína de GPER en líneas celulares derivadas de GB humano..... | 54 |
| 7.5. Presencia de ERE en el promotor de GPER.....   | 56 |
| 7.6. Efecto de E2 en la expresión del RNAm de GPER.....   | 57 |
| 8. DISCUSIÓN.....   | 58 |
| 9. CONCLUSIONES.....  | 66 |
| 10. PERSPECTIVAS.....   | 66 |
| 11. REFERENCIAS.....  | 67 |
| 12. ANEXO.....  | 83 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
Akt: Proteína cinasa B  
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico  
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc  
CTCF: Fluorescencia celular total corregida\*  
E1: Estrona  
E2: Estradiol  
E3: Estriol  
E4: Estetrol  
EGFR: Receptor a factor de crecimiento epidérmico\*  
ER: Receptores a estrógenos\*  
ERE: Elementos de Respuesta a Estrógenos  
ER $\alpha$ : Receptores a estrógenos alfa\*  
ER $\beta$ : Receptores a estrógenos beta\*  
GB: Glioblastoma  
GPCR: Receptor acoplado a proteínas G \*  
GPER (GPR30): Receptor a Estrógenos Acoplado a Proteínas G\*  
IDH 1/2: Isocitrato deshidrogenasa 1 y 2  
Ivy-GAP: Ivy Glioblastoma Atlas Proyecto  
Kd: Constante de disociación  
MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno\*  
MEC: Matriz extracelular  
MGMT: 6-oxo-metilguanina-DNA metiltransferasa  
MISS: Señalización de esteroides iniciada en membrana \*  
NHERF: Factor regulador del intercambiador Na<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa\*  
PLC: Fosfolipasa C\*  
Ras: Proteína GTPasa  
ROI: Región de interés\*



RTK: Receptores tipo Tirosina Cinasas\*

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

7TMRs: Receptores de siete pasos transmembranales

V1aR: Receptor de vasopresina 2A

\*Por sus siglas en inglés

## SUMMARY

Gliomas are malignant brain tumors of glial origin present in the Central Nervous System (CNS), according to the cell type from which they originate they can be divided into astrocytomas (derived from astrocytes), oligodendrogliomas (derived from oligodendrocytes) or ependymomas (derived from ependymal cells). According to their histological characteristics, the World Health Organization (WHO) classifies gliomas into four grades of malignancy where grade 1 are slow-growing and less malignant tumors, while grade 4 gliomas are fast-growing and highly malignant tumors, with glioblastoma (GB) being the most frequent and malignant type of CNS tumor. GB shows predominantly astrocytic differentiation, nuclear atypia, cellular pleomorphism, as well as proliferation, and/or microvascular necrosis. The incidence is approximately 3.22 cases per 100,000 population, primarily affecting adults in the range of 45 to 75 years and a higher proportion of males than females (3:2, respectively) (Louis et al., 2016; Ostrom et al., 2019).

Estradiol (E2), through interaction with its intracellular receptors, has been shown to modulate the expression of genes involved in cell proliferation and progression of GBs, so it has been suggested to be fundamental in the biology of these tumors (González-Arenas et al., 2012; Hernández-Vega et al., 2020). However, the expression of the membrane receptor to estrogen (GPR30/GPER) in the progression of GBs has not been evaluated. In this work, the expression of GPER in U251, U87, LN229, and T98 cell lines derived from human GBs was analyzed at the mRNA and protein levels. Using the RT-qPCR technique, it was observed that at the transcript level, GPER is expressed similarly in the four lines evaluated, while at the protein level it was found that the U87 cell line is the one that expresses a higher GPER content. Likewise, by immunofluorescence, it was observed that GPER is localized in the plasma membrane, cytoplasm, and nucleus.

Additionally, the effect of different concentrations of E2 on the expression of GPER was evaluated, finding that the concentration of 10 nM increased the GPER content in the U251 and U87 cell lines, in the LN229 cell line this effect was observed at a concentration of 1  $\mu$ M, while at this concentration of E2 in the U251 cell line promote a decrease in the expression of the receptor. On the other hand, by *in silico* analysis two potential Estrogen Response Elements (EREs) were found in the promoter region of GPER, suggesting that

GPER transcription may be regulated by E2, however, when evaluating this effect on GPER transcription after treatment with an E2 concentration curve no significant differences were found in the expression of the transcript.

In conclusion, GPER is expressed in U251, U87, LN229, and T98 cell lines derived from human GBs both at the mRNA and protein level, it has a subcellular localization both in the plasma membrane and intracellular regions (nucleus and cytoplasm), furthermore, E2 promotes an increase in the expression of this receptor at the protein level, suggesting that GPER could participate in the pathophysiology of glioblastomas.

## RESUMEN

Los gliomas son tumores cerebrales malignos de origen glial presentes en el Sistema Nervioso Central (SNC), según el tipo celular del que se originan pueden dividirse en astrocitomas (derivados de astrocitos), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrocitos) o ependimomas (derivados de células ependimales). De acuerdo con sus características histológicas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los gliomas en cuatro grados de malignidad donde el grado 1 son tumores de crecimiento lento y menos malignos, mientras que los gliomas de grado 4 son los tumores de crecimiento rápido y de gran malignidad, siendo el glioblastoma (GB) el tipo de tumor del SNC más frecuente y maligno. El GB presenta una diferenciación predominantemente astrocítica, atipia nuclear, pleomorfismo celular, así como proliferación y/o necrosis microvascular. La incidencia es aproximadamente de 3.22 casos por cada 100,000 habitantes, afecta principalmente a los adultos en un rango de 45 a 75 años y en mayor proporción a hombres que a mujeres (3:2, respectivamente) (Louis et al., 2016; Ostrom et al., 2019).

Se ha demostrado que el estradiol (E2), a través de la interacción con sus receptores intracelulares, modula la expresión de genes involucrados en la proliferación celular y progresión de los GBs, por lo que se ha sugerido que es fundamental en la biología de estos tumores (González-Arenas et al., 2012; Hernández-Vega et al., 2020). Sin embargo, no se ha evaluado la expresión del receptor membranal a estrógenos (GPR30/GPER) en la progresión de los GBs. En este trabajo se analizó la expresión de GPER en las líneas celulares U251, U87, LN229 y T98 derivadas de GBs humanos a nivel del RNAm y de la proteína. Mediante la técnica de RT-qPCR se observó que a nivel de transcrito, GPER se expresa de manera similar en las cuatro líneas evaluadas, mientras que a nivel de la proteína se encontró que la línea celular U87 es la que expresa un mayor contenido de GPER. Así mismo, por inmunofluorescencia se observó que GPER se localiza en la membrana plasmática, en el citoplasma y núcleo.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de E2 sobre la expresión del GPER, encontrando que la concentración de 10 nM aumentó el contenido de GPER en las líneas celulares U251 y U87, en la línea celular LN229 se observó este efecto a una concentración de 1  $\mu$ M, mientras que a esta concentración de E2 en la línea celular U251 se observó una disminución en la expresión del receptor. Por otra parte, mediante un análisis *in silico* se encontraron dos potenciales Elementos de Respuesta a Estrógenos (EREs) en la región promotora de GPER, sugiriendo que la transcripción de éste puede ser regulada por E2, no obstante, al evaluar este efecto en la transcripción de GPER tras el tratamiento con una curva de concentración de E2 no se encontraron diferencias significativas en la expresión del transcrito.

En conclusión, GPER se expresa en las líneas celulares U251, U87, LN229 y T98 derivadas de GBs humanos tanto a nivel del RNAm como de la proteína, tiene una localización subcelular tanto en la membrana plasmática como regiones intracelulares (núcleo y citoplasma), además el E2 promueve un aumento en la expresión de este receptor a nivel de la proteína, lo que sugiere que GPER podría participar en la fisiopatología de los glioblastomas.

## 1. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma (GB) es el tumor más frecuente y agresivo del Sistema Nervioso Central (SNC). Se caracteriza por un rápido crecimiento debido a su alta capacidad proliferativa e invasiva (Louis et al., 2016), y por la alteración en procesos mediados por p53 (media las respuestas de estrés celular, reparación del ciclo celular y apoptosis), Rb (una proteína supresora de tumores) y Receptores Tirosina Cinasas (RTK, que activan y regulan vías de señalización involucradas en el desarrollo y progresión de numerosos cánceres) (Brennan et al., 2013).

Se ha demostrado que los estrógenos, en especial el estradiol (E2), están involucrados en la regulación del crecimiento de estos tumores cerebrales al modular la expresión de genes involucrados en la proliferación celular y malignidad, por lo que se ha sugerido que participa en la biología de estos tumores (González-Arenas et al., 2012; Sareddy et al., 2012). Los efectos del E2 se basan en dos mecanismos de acción, el genómico (o clásico) mediado por los receptores intracelulares a estrógenos (ER) y el mecanismo de acción no genómico (no clásico), en el que participa un receptor localizado en la membrana plasmática acoplado a proteínas G (GPR30 o GPER) (Coyoy, A; Guerra-Araiza, C; Camacho-Arroyo, 2016; Delhez, 2019).

GPER pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G clase A (familia de Rhodopsina 1), tiene una estructura que abarca siete regiones transmembranales, su extremo N-terminal es extracelular y el extremo C-terminal es citoplásmico (Figueira et al., 2018). La interacción de E2 con GPER lleva a la activación rápida y transitoria de numerosas vías de señalización intracelular, estimula la producción de AMPc, la movilización intracelular de calcio y la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que a su vez activa vías de señalización como PI3K/Akt (Filardo et al., 2000; Prossnitz & Barton, 2014; Revankar et al., 2005).

Por otra parte, se ha descrito que GPER participa en la progresión de diferentes tipos de neoplasias, tales como cáncer de mama, de ovario, de endometrio, de próstata, entre otros. En relación al GB, recientemente se ha reportado la expresión de la proteína de GPER en las líneas celulares derivadas de GB humanos U251 y LN229 (Hirtz et al., 2021), sin embargo se desconocen los diferentes niveles de expresión de GPER y su posible regulación por E2 en líneas celulares de GBs humanos, así como la presencia de este receptor en otras líneas celulares derivadas de GBs, ya que esta entidad se caracteriza por ser altamente heterogénea.

## 2. ANTECEDENTES

El cáncer es una enfermedad genética somática y algunas veces hereditaria, donde se promueve la expresión génica aberrante, que sensibiliza a las células normales para que ignoren las señales que controlan la proliferación, Hanahan y Weinberg en sus revisiones "*Hallmarks of Cancer*" han determinado seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del cáncer, las cuales siguen proporcionando una base sólida para comprender el desarrollo neoplásico, estas características distintivas comprenden el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de las señales supresoras del crecimiento, resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, así como la activación de la invasión y la metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000; Persano et al., 2013).

Posteriores estudios, han permitido delimitar otras dos características distintivas implicados en la patogénesis de un gran número de neoplasias, una de estas características involucra la capacidad de reprogramación del metabolismo energético (con el fin de aumentar la proliferación celular), mientras que la otra contempla la capacidad de las células cancerosas de evadir la destrucción inmunitaria particularmente de los linfocitos T y B, macrófagos y células *Natural Killer* (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por tanto, la progresión tumoral dada por una sucesión de expansiones clonales puede desencadenar la adquisición de un genotipo mutante, inestabilidad genómica y la adquisición de estas diversas capacidades biológicas (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). No obstante con el avance de las tecnologías, aunado a un creciente número de estudios, la complejidad y forma como vemos el cáncer en la última década ha aumentado, siendo así que Sengra y colaboradores mediante una exhaustiva revisión han delimitado cuatro nuevas características distintivas del cáncer que comprenden: (i) la capacidad de las células de retroceder desde un estado funcional especializado específico hasta un estado de célula troncal progenitora (desdiferenciación celular), (ii) los cambios epigenéticos como la metilación/desmetilación del ADN que pueden afectar a la expresión de los genes fomentando la reprogramación celular hacia un estado pluripotente, (iii) el papel de los microorganismos en la eliminación, el equilibrio y la



evasión durante la tumorigénesis, (iv) la señalización neuronal alterada, debido a que las células cancerosas utilizan los nervios para establecer nuevos vasos sanguíneos y obtener señales proliferativas (Senga & Grose, 2021).

Además, se han sugerido hipótesis relacionadas a la formación de los tumores, entre ellas se encuentra la hipótesis clásica, que se basa en el “modelo estocástico”, que predice que todas las células en un tumor poseen un potencial tumorigénico similar y cualquiera de ellas puede funcionar como una célula iniciadora de tumor, esta hipótesis sugiere, que una célula somática sufre alrededor de cuatro a siete mutaciones independientes que le otorgan un potencial proliferativo incontrolado (George & Levine, 2020). Una hipótesis alternativa, basada en el “modelo jerárquico” y sustentada en una gran cantidad de datos experimentales, respalda la idea de que los tumores malignos son iniciados y mantenidos por una población de células tumorales, las cuales comparten propiedades biológicas similares a las de las células troncales, con la capacidad de generar nuevos tumores ya que poseen una capacidad proliferativa ilimitada, así como la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse a los diversos subtipos celulares que forman el tumor (Persano et al., 2013).

Cabe mencionar, que cada modelo por sí solo no explica adecuadamente la diversidad tumoral, no obstante, puede integrarse en un modelo alternativo de plasticidad celular, el cual permite dar una explicación más completa que describa la heterogeneidad tumoral, este modelo proporciona un marco unificador para ambas hipótesis, al postular que los procesos intrínsecos de las células tumorales y/o estímulos del microambiente tumoral, pueden influir en las células tumorales diferenciadas para que adquieran características de células troncales, de igual manera, se sugiere que estos procesos pueden ocurrir a la inversa, promoviendo que las células troncales cancerosas pasen a un estado de células cancerosas diferenciadas (George & Levine, 2020; Persano et al., 2013; Rich, 2016).

Existen diferentes neoplasias, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS)

describe, ilustra y proporciona los estándares internacionales, para una apropiada clasificación de los tumores del cuerpo humano. En este sentido, la OMS ha publicado periódicamente la clasificación de los tumores cerebrales, la cual se basa en el tipo celular (determinado por criterios morfológicos e inmunohistoquímicos), diagnóstico, el grado de malignidad y las alteraciones moleculares asociadas a esta entidad neoplásica (Louis et al., 2016). Los tumores malignos del SNC, se encuentran entre los cánceres que tienen el peor pronóstico, con un estimado de pérdida de vida media potencial de 20 años respecto a otros cánceres (Reifenberger, 2017). Cabe mencionar, que en el ámbito clínico el grado tumoral es un factor clave en la elección de la terapia, particularmente en la determinación del uso de protocolos de radiación y quimioterapia específica (Louis, David N, Ohgaki H., Wiestler O.D., 2007).

## **2.1 Gliomas**

Los gliomas, son los tumores primarios de origen glial más comunes del SNC al presentarse en 31% de los casos en adultos (Matteoni et al., 2020; Reifenberger, 2017), raramente hacen metástasis ya que sólo el 0,4-2% logran invadir regiones fuera del cerebro, a pesar de ser muy hábiles para infiltrarse (Cuddapah et al., 2014). La invasión ocurre a lo largo de estructuras tales como vasos sanguíneos, materia blanca, el espacio subaracnoideo y es probablemente coordinado por células tumorales que pueden conducir a una invasión colectiva (Vollmann-Zwerenz, 2020).

En 2021, la OMS integró los parámetros histológicos, así como una firma molecular obtenida con nuevas tecnologías como la del metiloma del ácido desoxirribonucleico (ADN), para definir los principales tipos de gliomas, conservando algunos parámetros como la clasificación en cuatro grados de malignidad, donde el grado 1 son tumores de crecimiento lento y menos malignos, mientras que los gliomas de grado 4 son los tumores de crecimiento rápido y de gran malignidad (Jin et al., 2021; Louis et al., 2021), según el tipo celular del que se originan pueden dividirse en astrocitomas (derivados de astrocitos), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrocitos) o ependimomas (derivados de células ependimales) (Reifenberger, 2017).

Sin embargo, la OMS ha adoptado un nuevo enfoque para clasificar los gliomas, tumores glioneuronales y tumores neuronales dividiéndolos en 6 familias diferentes (Louis et al., 2021):

1. Gliomas difusos de tipo adulto (tumores cerebrales primarios de los adultos en la práctica neuro oncológica, los cuales corresponden casi exclusivamente al GB).
2. Gliomas difusos de bajo grado de tipo pediátrico (generalmente presentan buen pronóstico).
3. Gliomas difusos de alto grado de tipo pediátrico (se comportan de forma agresiva).
4. Gliomas astrocíticos circunscritos ("circunscritos" se refiere a su patrón de crecimiento, el cual es más sólido al presentar tumores con bordes definidos, a diferencia de los tumores intrínsecamente difusos de los grupos 1, 2 y 3).
5. Tumores glioneuronales y neuronales (un grupo diverso de grupo de tumores, con diferenciación neuronal).
6. Ependimomas (ahora clasificados por su localización, así como por sus características histológicas y moleculares).

Cabe mencionar, que el uso de las diversas tecnologías a lo largo del tiempo, ha permitido determinar biomarcadores genéticos, que han sido ampliamente aplicados en el diagnóstico y clasificación de los gliomas como se mencionó anteriormente (Louis et al., 2016; Reifenberger, 2017), siendo los principales biomarcadores:

- Mutaciones de la IDH 1/2 (isocitrato deshidrogenasa 1 y 2). Comunes en gliomas de grado 2-3.
- Metilación del promotor MGMT (6-oxo-metilguanina-DNA metiltransferasa). Sugiere un mejor pronóstico en los gliomas y predice la respuesta a la quimioterapia con temozolomida (TMZ) y radioterapia.
- Codelección 1p/19q. Marcador a nivel cromosómico comúnmente encontrado en tumores oligodendrogiales, asociado a un mejor pronóstico.
- Amplificación del gen EGFR (receptor a factor de crecimiento epidérmico). Frecuentemente alterado en GB.
- PTEN (gen homólogo de la fosfatasa y la tensina). Marcador a nivel de gen, cuya

pérdida de heterocigosidad se asocia con malos resultados de supervivencia tanto para los astrocitomas anaplásicos como para los GBs.

- Pérdida de la expresión nuclear de ATRX (regulador transcripcional de la helicasa dependiente de ATP ligada a X).
- TP53 (Codifica a la proteína p53). Las mutaciones en ATRX, TP53 y la metilación de MGMT suelen producirse después de la mutación de IDH en los astrocitomas.
- H3-K27M (histona H3-sustitución de lisina 27 por metionina). Un marcador epigenético que confiere una peor supervivencia global en el glioma difuso de línea media.

Es preciso señalar que, para los gliomas de grado IV o GB, los biomarcadores característicos son la presencia de la IDH-silvestre (sin mutación), mutación del promotor TERT (Transcriptasa reversa a la telomerasa), pérdida o ganancia de los cromosomas 7 y 10, así como la sobre expresión del EGFR, además de evaluarse si presentan metilación del promotor de la MGMT (Louis et al., 2021).

### **2.1.1. Glioblastoma (GB)**

El GB se presenta en el 58.4% de los casos correspondientes a gliomas, por tanto es el tumor del SNC indiferenciado más frecuente, invasivo y agresivo, que surge de la malignización de las células gliales, las células progenitoras gliales o las células troncales neurales transformadas, estos tumores se caracterizan por su rápido crecimiento debido a su alta capacidad proliferativa e invasiva (Ostrom et al., 2021; Sengupta et al., 2021).

La mayoría de los casos, se diagnostican en un rango promedio de edad de 50-75 años, con una incidencia de 3.23 casos por 100,000 habitantes, además, se ha determinado que se presentan en una proporción de 3:2 hombres con respecto a las mujeres (Ostrom et al., 2021). Otro aspecto a considerar sobre esta neoplasia, es el complicado tratamiento, debido a que son los tumores más resistentes a la quimio y/o radioterapia, aunado a que no se logra una resección quirúrgica completa, la principal razón a esto es que, la mayoría de los GBs se localiza en la materia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales, y su distribución en los lóbulos cerebrales es diferencial con una incidencia

de 31% en el lóbulo temporal, 24% lóbulo parietal, 23% frontal, 16% occipital y una combinación fronto-temporal de 6%, en consecuencia estos tumores son letales en un lapso de 14-17 meses, con una supervivencia menor al 10% en los siguientes 5 años posterior al diagnóstico (Louis et al., 2016; Ostrom et al., 2021).

Los GBs presentan diferenciación astrocítica predominante, atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica elevada, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis. Son tumores heterogéneos, que en su conjunto se componen de diversas células, entre ellas se encuentran principalmente astrocitos, células del sistema inmune y células estromales (pericitos, células endoteliales, entre otras), siendo así que, las células individuales que pertenecen al tumor, tienen repercusiones funcionales en la heterogeneidad celular, molecular, genética, epigenética y metabólica (Jones & Holland, 2012; Louis, David N, Ohgaki H., Wiestler O.D., 2007; Louis et al., 2016; Sengupta et al., 2021).

Asimismo, con base en su caracterización molecular, se han determinado tres subtipos moleculares de GB:

- I. **Proneural:** Este subtipo molecular se caracteriza, por presentar rasgos histológicos semejantes a los de un oligodendrocito y por una activación de la vía de PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas). Además, presenta mutaciones en la enzima IDH1 y en el gen TP53. Afecta a pacientes jóvenes, los cuales presentan una mayor supervivencia (Brennan et al., 2013; Jovčevska, 2018; Q. Wang et al., 2017).
- II. **Clásico:** Este subtipo histológicamente se asemejan a los astrocitos, está caracterizado por la amplificación y mutación activadora de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Además, presenta alteraciones típicas de los GBs como ganancia del cromosoma 7, pérdida del cromosoma 10, delección del inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina (CDKN2A), alteraciones en la vía del retinoblastoma (RB), así como, una expresión elevada de las vías Notch y Sonic Hedgehog, las cuales están involucradas principalmente en la embriogénesis (Castañeda, 2015; Jovčevska, 2018; Verhaak et al., 2010; Q. Wang et al., 2017).

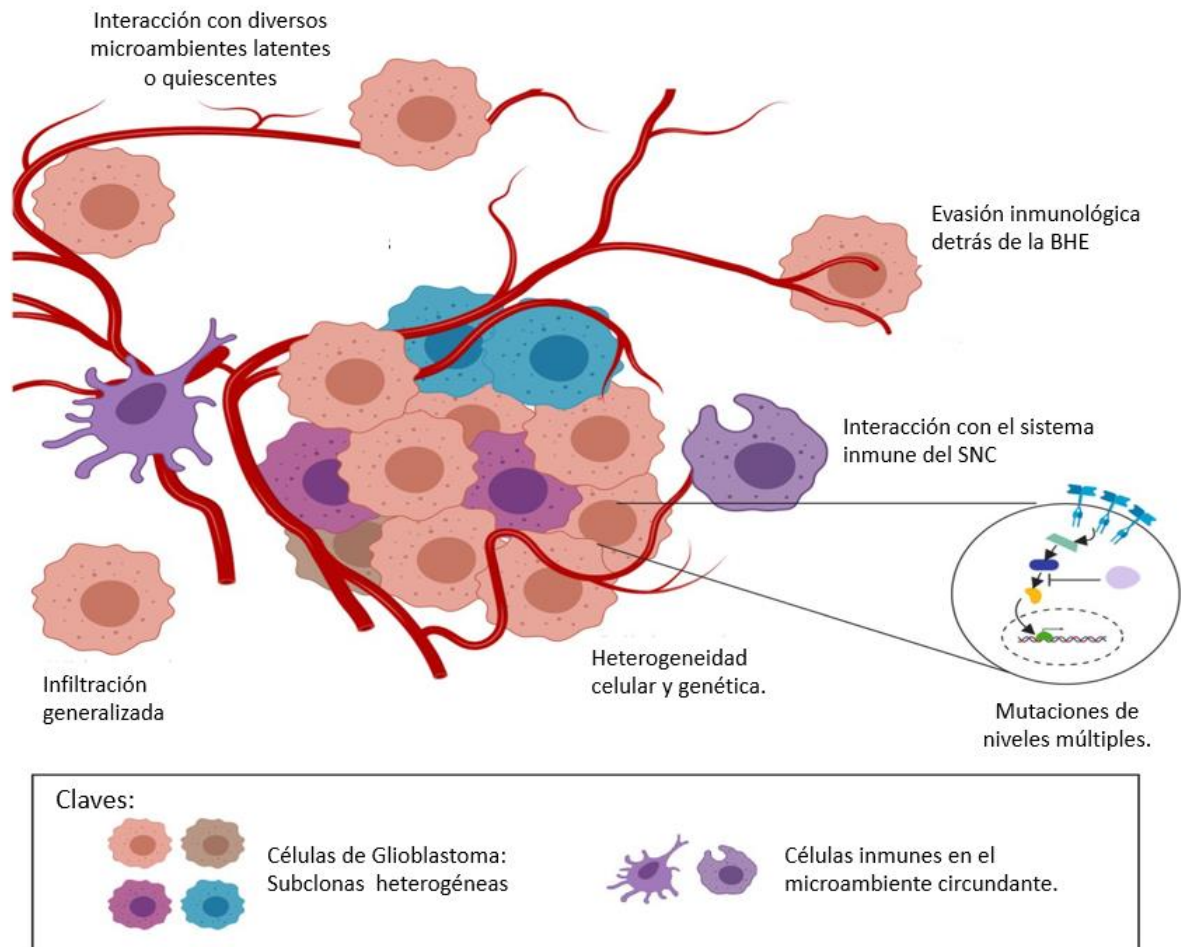
- III. **Mesenquimal:** La histología de este subtipo se asemeja a un astrocito, presenta sobreexpresión de marcadores de células mesenquimales como CHI3L1, además de otros marcadores de la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM), aunado a la pérdida del gen NF1, el cual está asociado al desarrollo de neurofibromatosis tipo 1. Este subtipo molecular, se relaciona con un peor pronóstico para la sobrevivencia (Castañeda, 2015; Verhaak et al., 2010; Vollmann-Zwerenz, 2020; Q. Wang et al., 2017).

Los GBs fueron de los primeros tipos de cáncer, en ser sistemáticamente estudiados por *The Cancer Genome Atlas Research* (TCGA) que, en su publicación inicial del 2008, presentaron el resultado del análisis genómico y del transcriptoma de 206 GBs. Asimismo, en dicho reporte se incluyeron las secuencias de 600 mutaciones encontradas en 91 muestras, proporcionando un análisis sistemático con el que, se logró definir las rutas biológicas centrales en el desarrollo y progresión de los GBs, las cuales se centran en tres vías principales: (i) la inactivación de la vía p53 la cual representa el 87% de los GBs, (ii) la inactivación del supresor tumoral de la vía de RB, la cual constituye el 77% de los tumores de este tipo y (iii) la amplificación y mutación de los genes de los Receptores Tirosina Cinasas (RTK)/Ras/fosfatilinositol 3 cinasa (PI3K) correspondientes al 88% de los glioblastomas (Brennan et al., 2013; Jin et al., 2021).

De igual forma, el *Ivy-Glioblastoma Atlas Project* (Ivy-GAP) ha generado un atlas transcripcional de los GBs, con base en la información y características anatómicas conocidas de los tumores pertenecientes a esta entidad, empleando herramientas computacionales, de secuenciación del genoma y del transcriptoma, determinaron que los GBs siguen una dinámica de evolución divergente, con diferencias genómicas entre cada uno de los tumores, dicha información confiere una comprensión más amplia de la heterogeneidad de los GBs (Puchalski & Al, 2018; Vollmann-Zwerenz, 2020).

En este sentido, el GB está conformado por un grupo heterogéneo de clonas celulares que se comunican entre sí y con el microambiente tumoral (**Figura 1**). Siendo así que, el GB da forma a un microambiente único en su proximidad que favorece el desarrollo del tumor, involucrando en este proceso a células vecinas sanas como astrocitos y células endoteliales (Buruiană et al., 2020). Las células del GB migran de manera altamente coordinada, se adhieren principalmente a células adyacentes como neuronas, astrocitos y células endoteliales, así como a la matriz extracelular (MEC) y de esta forma las células tumorales, interactúan con microambientes cerebrales diversos que pueden existir en estado latente o quiescente (el cual provee resistencia a la terapias citotóxicas empleadas como la temozolomida), aumentando la complejidad en el desarrollo del GB y su terapia (Buruiană et al., 2020; Chen et al., 2012; Robertson et al., 2019). Además, dicha adherencia es modulada por una variedad de diferentes proteínas, por ejemplo, integrinas o cadherinas. Las integrinas son sensores sensibles al microambiente, que permiten que las células tumorales modifiquen su comportamiento de fijación, así las células pueden cruzar barreras de tejido mediante la remodelación de su propio citoesqueleto y la MEC, otro factor importante a considerar, es el papel que tiene la barrera hematoencefálica (BHE) en el desarrollo del GB, ya que la mayoría de los fármacos no logran cruzar a través de ella, limitando la biodisponibilidad de estos y facilita la evasión inmunológica por parte del tumor (Buruiană et al., 2020; Robertson et al., 2019; Vollmann-Zwerenz, 2020).

Siendo así que, la expansión del GB combinada con la formación de nuevos vasos sanguíneos patológicos, generan el tumor cerebral más vascularizado en los seres humanos. Por tanto, la proliferación endotelial de este tumor es una medida directa de su malignidad (Buruiană et al., 2020; Vollmann-Zwerenz, 2020).



**Figura 1. Modelo de la heterogeneidad del GB.** Representación esquemática de la heterogeneidad en las células que conforman al GB, y su interacción con diversos microambientes que influyen en su desarrollo, también se observa como la BHE actúa facilitando la evasión inmunológica del tumor, de igual forma las mutaciones a nivel de gen o proteína involucrados en los procesos de proliferación y supervivencia celular contribuyen a la progresión del GB.

BHE: Barrera Hematoencefálica, SNC: Sistema Nervioso Central. Modificado de (Robertson et al., 2019).

Aunado a esto, se ha demostrado que los estrógenos en especial el estradiol (E2), están involucrados en la regulación del crecimiento de los tumores cerebrales al inducir la expresión de genes involucrados en la proliferación celular y malignidad, por lo que se ha sugerido que el E2 participa en el crecimiento de estos tumores (González-Arenas et al., 2012; Sareddy et al., 2012).



En el 2000 McKlinley y colaboradores, analizaron los registros tumorales de Nueva York del periodo entre 1976 a 1995, y describieron un efecto del sexo en la tasa de incidencia de GB mediante cálculos de riesgo relativo (RR). En general los miembros del grupo masculino tienen aproximadamente, entre 1.5 y 2.0 veces más probabilidades de desarrollar GB, que sus contrapartes femeninas. Sin embargo, el examen del RR específico por edad en la población femenina, revela que la protección asociada a dicho género no surge hasta el estrato de edad de 10 a 14 años, ya que la tasa de incidencia en mujeres, en comparación con los hombres disminuyó de 1.0 en el intervalo de edad 5-9 años a 0.8 en el intervalo de edad 10-14 años. Este período de tiempo coincide, aproximadamente con el inicio de la menstruación y la producción cíclica de estrógenos ováricos, este efecto se mantuvo ya que la tasa de incidencia continuó disminuyendo durante los años premenopáusicos, alcanzando un mínimo de 0.51 en el intervalo de edad 50-54 años, momento en que generalmente cesa la producción de estrógenos ováricos.

No obstante, se observó que las mujeres en los estratos de edad posteriores experimentan un aumento en el RR, aunque nunca llega a 1. El RR para GB en mujeres de 55 a 79 años, varía de 0.64 hasta 0.71 y en este rango de edad, hay una sutil erosión del efecto protector asociado al sexo, el cual coincide aproximadamente con los años posmenopáusicos (Kabat et al., 2010; McKinley et al, 2000).

Todo lo anterior, es una evidencia de que los estrógenos en las mujeres, tienen un papel protector en la incidencia de los GB, dicho efecto se presenta durante los años en los que ocurre la menstruación y la premenopausia, con un rango de producción de E2 de 70-500 pg/mL en ambos periodos, sin embargo, esta protección se ve disminuida en las edades posmenopáusicas, en las que las concentraciones de estrógenos ováricos circulantes disminuyen hasta <35 pg/mL (Gruber, 2002; Stricker et al., 2006), llegando a ser similares a la producción normal de estrógenos en hombres que va de 14-55 pg/mL (Hess, 2003), lo que sugiere fuertemente que las bajas concentraciones de estrógenos promueven la incidencia y desarrollo de los GBs.

## 2.2. Estrógenos

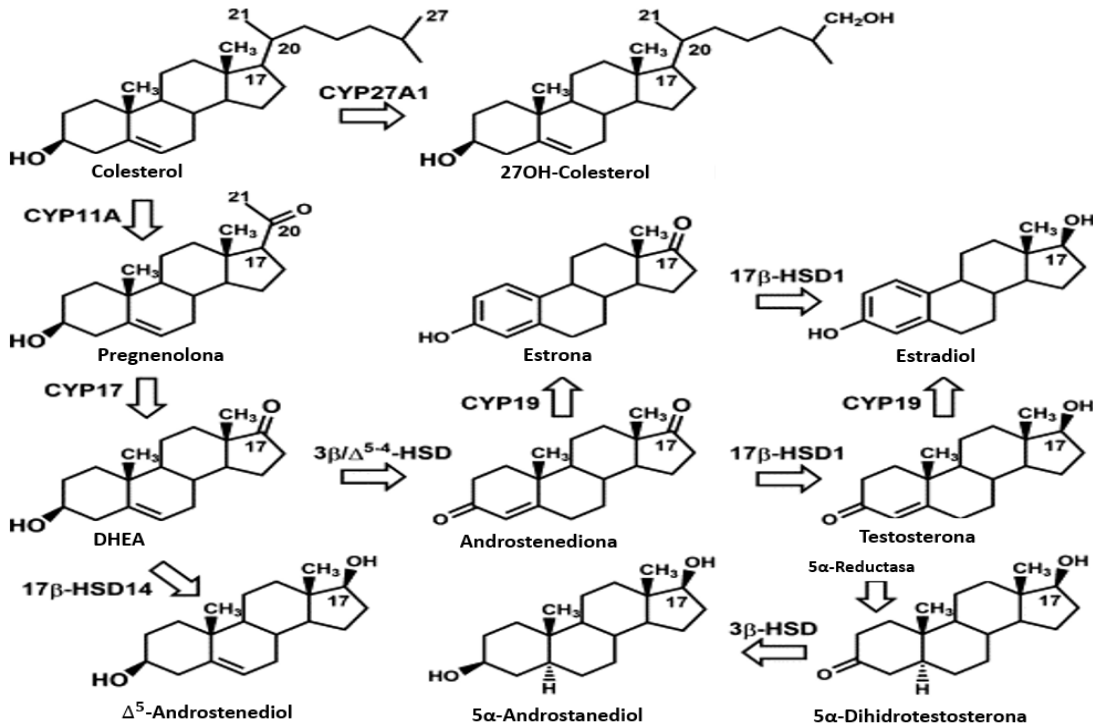
Los estrógenos promueven principalmente el desarrollo, la maduración y función del aparato reproductor femenino, así como las características sexuales secundarias (Delhez, 2019). Consisten en un grupo de cuatro compuestos que incluyen la estrona (E1), el E2, el estriol (E3) y el estetrol (E4), abreviados de esa forma con base al número de grupos hidroxilo en su estructura (Gruber, 2002). El E2 es el más potente y abundante estrógeno endógeno, E1 es el estrógeno circulante predominante después de la menopausia mientras que E3 y E4 se detectan a niveles altos solo durante el embarazo, este último producido exclusivamente por el feto (Delhez, 2019). Los estrógenos endógenos protegen en múltiples enfermedades, como las afecciones cardiovasculares y la arterosclerosis, participan también en el control de la presión sanguínea, además, a nivel del metabolismo regulan el colesterol, tienen efectos en la vasodilatación, la proliferación y supervivencia celular, inhiben la inflamación y tienen efectos antioxidantes (Prossnitz & Barton, 2014).

### 2.2.1 Síntesis de los estrógenos

Los estrógenos son producidos principalmente por los ovarios, pero también provienen de sitios extra gonadales como el tejido adiposo, hueso, corazón, piel y el cerebro. Después de unirse a los receptores de lipoproteínas, las células esteroideogénicas absorben el colesterol, a través del movimiento intracelular facilitado por el citoesqueleto, mediante las proteínas transportadoras de esteroides, lo almacenan y lo trasladan a los sitios de síntesis de esteroides (Gruber, 2002).

Los diferentes esteroides se forman por la reducción del número de átomos de carbono, de 27 a 18 y el paso limitante en la producción de esteroides, es la transferencia de colesterol desde el citoplasma hasta la membrana interna de la mitocondria, donde se encuentran las enzimas del citocromo P450 (*CYP450* derivado de su nombre en inglés, *cytochrome P*), que catalizan la escisión de la cadena lateral de colesterol, la aromatización es el último paso en la formación de estrógenos, esta reacción es catalizada por el complejo enzimático *CYP450* aromatasa monooxigenasa presente en

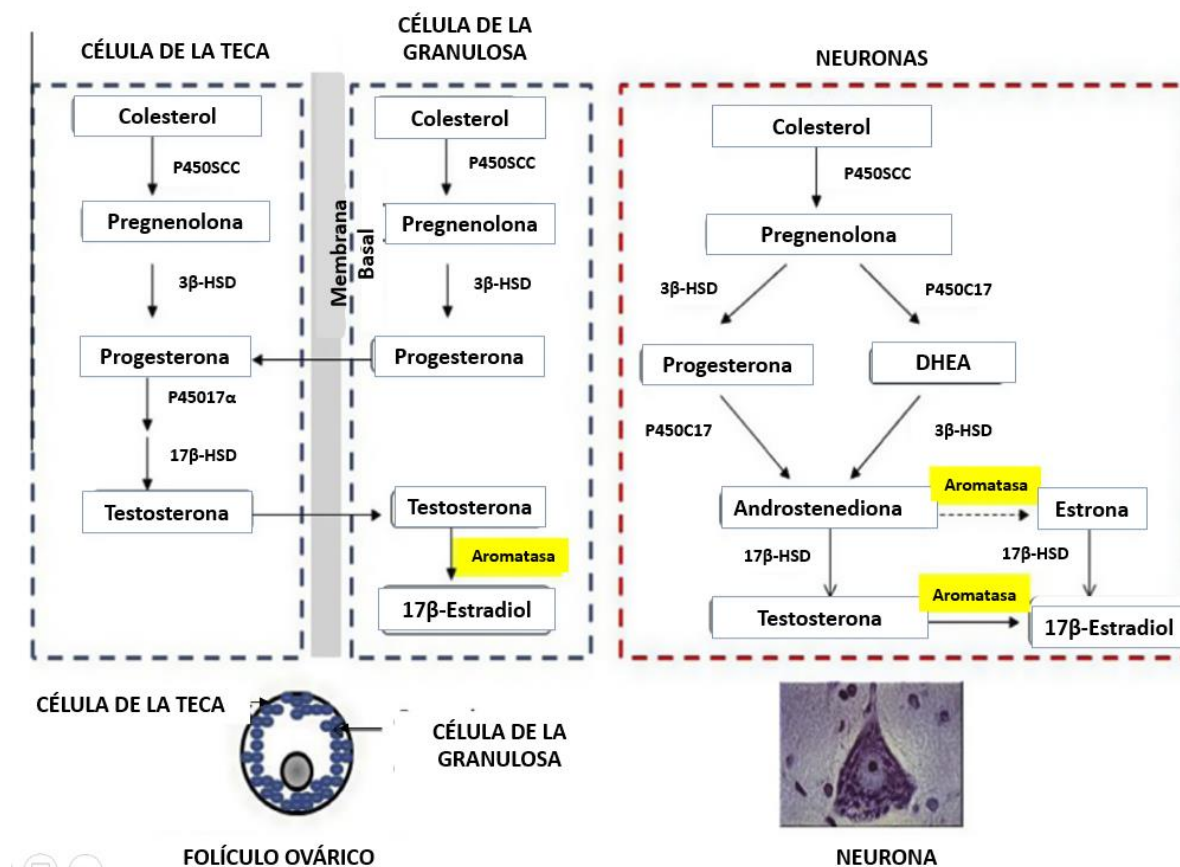
el retículo endoplásmico liso. En tres reacciones constitutivas de hidroxilación, se forman E1 y E2 a partir de sus precursores obligatorios, androstenediona y testosterona respectivamente, como se muestra en la **Figura 2** (Gruber, 2002).



**Figura 2. Síntesis de esteroides.** Se muestran en la parte superior izquierda, la estructura química del colesterol, y las enzimas más importantes involucradas en la formación de los estrógenos, progestágenos y andrógenos. Cabe destacar que, las enzimas involucradas en la formación directa de los estrógenos son: la aromatasa *CYP19* (estrógeno sintetasa), que actúa en la conversión de androstenediona a estrona y de testosterona (T) a E2, la otra enzima involucrada en este proceso es la 17β-HSD1 (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa), que participa en la conversión de E1 a E2, así como de androstenediona a T. Modificada de (Baker et al., 2015; Rena Li et al., 2014).

Además, los estrógenos pueden ser sintetizados localmente en el cerebro, lo que les proporciona una importancia única en este órgano, ejerciendo un conjunto de acciones al unirse a sus receptores nucleares (ER) o de membrana (mER). Diversos estudios han mostrado que las neuronas y los astrocitos, son capaces de sintetizar estrógenos de *novo* a partir de colesterol, ya que contienen todas las enzimas necesarias para su síntesis y

metabolismo (**Figura 3**). Además, la aromatasa *CYP19* es una enzima clave que se expresa ampliamente en el cerebro en zonas como, el lóbulo temporal, occipital, el hipocampo y los ganglios basales; es por esto que las neuronas y astrocitos pueden formar E2 a partir de la testosterona (T) circulante o *de novo* (Rena Li et al., 2014).



**Figura 3. Síntesis de estrógenos en el ovario y el cerebro.** La producción de estrógenos comienza con la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol, posteriormente la pregnenolona se convierte en progesterona por acción de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) en células de la teca y de la granulosa. La progesterona se convierte en andrógenos, a través del citocromo P450-17α-hidroxilasa (P45017α) y 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), en células de la teca durante la fase folicular, mientras que la conversión de T a E2, es catalizada por la aromatasa *CYP19* (marcada en amarillo) en las células de la granulosa. Por su parte, las neuronas expresan todas enzimas requeridas para la síntesis de estrógenos (Rena Li et al., 2014).

### 2.2.2. E2 y su mecanismo de acción.

El E2 es la forma más potente y de mayor concentración de los estrógenos, es sintetizado a partir de colesterol y es el producto final luego de 6 o 7 conversiones enzimáticas por la aromatasa o estrógeno sintetasa *CYP19*, las cuales constituyen un paso limitante y un punto crítico de regulación de la síntesis a partir de sus precursores. Esta síntesis local contribuye a diversas acciones específicas sobre diversos tejidos, tales como efectos benéficos sobre la homeostasis ósea y la función cardiovascular, la neuroprotección ante lesiones cerebrales y enfermedades degenerativas (Delhez, 2019). En sangre, el E2 se encuentra unido reversiblemente a la  $\beta$ -globulina, formando el complejo hormona sexual-globulina, también se une a la albúmina aunque con menos afinidad, solo el 2-3% del E2 se encuentra de manera libre, se metaboliza como cualquiera de los estrógenos por sulfatación o glucoronidación y los conjugados son excretados por bilis u orina (Gruber, 2002).

Asimismo, el E2 juega un papel importante en la regulación de una enorme variedad de procesos biológicos, que incluyen la reproducción, diferenciación, proliferación celular, apoptosis e inflamación. En términos del metabolismo, promueve la homeostasis de glucosa y lípidos en el cerebro, el tejido adiposo, los islotes pancreáticos, el músculo esquelético y el hígado, además, modula la sensibilidad a la insulina al actuar sobre el páncreas, a nivel del hipotálamo regula el metabolismo, la homeostasis energética, la ingesta de alimentos y la distribución de grasa corporal (Roque C, 2019; Zhang & Trudeau, 2006).

El E2, se encuentra en una concentración seis veces mayor en el hipocampo que en el plasma, siendo las neuronas, las principales células en las que se ha detectado la expresión de la aromatasa, cuya expresión se correlaciona positivamente con la de los receptores a estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ). Por lo que, se ha sugerido un efecto proliferativo del E2 sobre las neuronas, ya que induce la activación de las vías de señalización ERK/MAPK, y en hipocampo especialmente se promueven los efectos no genómicos del E2, mediante la estimulación de los receptores *N-metil-D-aspartato* (NMDA), los cuales reconocen al glutamato y tras su unión activan a la proteína cinasa A

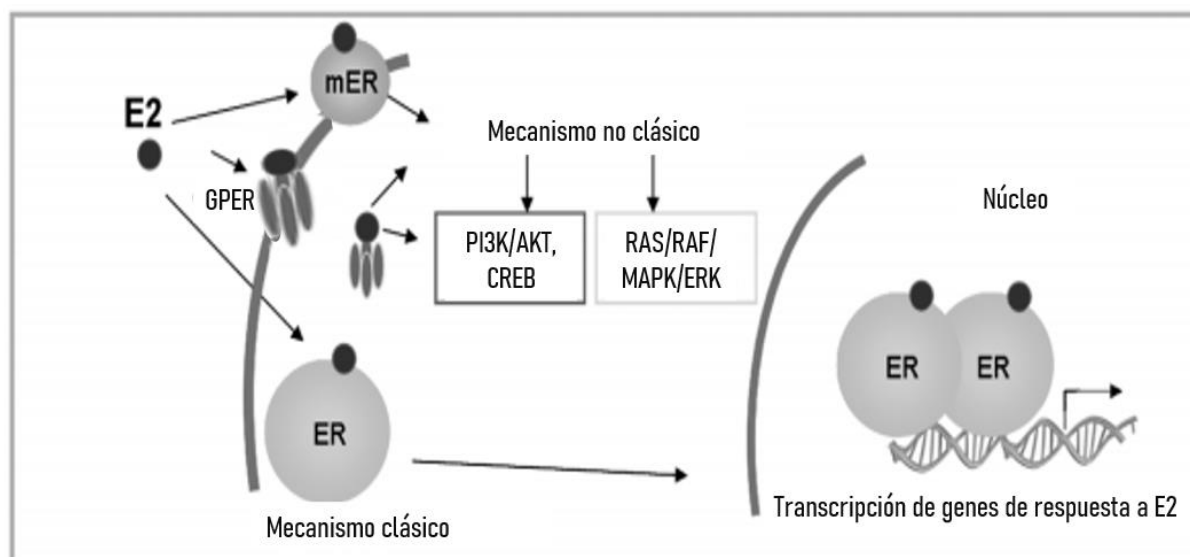
(PKA), lo que induce la fosforilación de ERK, que finalmente resulta en la modulación de las espinas dendríticas y las funciones sinápticas. El E2 también participa en la regulación de la memoria, el aprendizaje, la cognición, el neurodesarrollo y la neurodegeneración (Camacho-Arroyo et al., 2020; Coyoy, A; Guerra-Araiza, C; Camacho-Arroyo, 2016; Roque C, 2019; Zhang & Trudeau, 2006).

Por otra parte, las diversas funciones de estrógenos son mediadas por receptores intracelulares que son factores de transcripción regulados por ligando, que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Existen dos tipos principales de ER como se mencionó anteriormente ER $\alpha$  y ER $\beta$ , además, se ha identificado que el E2 se une a otro receptor que se encuentra en la membrana plasmática y que está acoplado a proteínas G (GPR30 o GPER) (Coyoy, A; Guerra-Araiza, C; Camacho-Arroyo, 2016; Delhez, 2019).

Estos receptores participan en dos vías: la vía genómica o clásica y la no genómica o no clásica. El mecanismo de acción genómico o clásico de los estrógenos, ocurre típicamente en cuestión de horas, lo que lleva a la activación o represión de genes blanco (**Figura 4**), siendo así que, la actividad genómica mediada por los ER ocurre después de la unión del ligando, lo que provoca cambios conformacionales en los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ , que se ubican principalmente en el citoplasma como monómeros, al ser activados se separan de las proteínas de choque térmico (HSP) y se dimerizan (Coyoy, A; Guerra-Araiza, C; Camacho-Arroyo, 2016; Levin & Hammes, 2016b).

Los complejos ER-ER, se translocan al núcleo y actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes, a través, de la unión a secuencias específicas en el promotor, denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE), donde reclutan corre reguladores (coactivadores o correpresores) y modifican la transcripción. Los ER también pueden modular la expresión génica sin unión directa al ADN, en este caso, se unen a otros factores de transcripción, como AP1 o SP1 (factor de transcripción humano), para reprimir o activar la transcripción. Es necesario señalar que, las respuestas a los estrógenos dependen del contexto celular, los subtipos de ER, ligandos, coactivadores y proteínas correpresoras (Coyoy et al, 2016; Delhez et al., 2019; Levin & Hammes, 2016).

También se ha demostrado que los ER participan en señales no genómicas, la vía no genómica, también conocida como la señalización de esteroides iniciada en la membrana (MISS por sus siglas en inglés) puede involucrar a los mER (ER $\alpha$ / $\beta$  acoplados en la membrana mediante su unión a las caveolinas o  $\beta$ -arrestinas) y/o a GPER, promoviendo la activación rápida de cinasas citoplasmáticas y canales iónicos en segundos o minutos (**Figura 4**), lo que puede impactar secundariamente a programas transcripcionales después de unas pocas horas o días (Coyoy et al, 2016; Delhez et al., 2019; Levin & Hammes, 2016).



**Figura 4. Mecanismos de acción del E2.** Se propone que el E2 activa tres tipos de receptores: (i) Los receptores intracelulares (ER), junto con el coactivador-1 (SRC-1) desencadenan respuestas transcripcionales (mecanismo clásico), (ii) los receptores de membrana (mER, ya sea ER $\alpha$ / $\beta$  unido a la membrana), y su activación resulta en la activación de la tirosina cinasa Src, que conducen a la activación de vías como PI3K/AKT y MAPK/ERK (mecanismo no clásico), y (iii) el receptor GPER, que al unirse con E2, desencadena vías como la de PI3K/AKT y MAPK/ERK, así como la activación de las proteínas G pequeñas RAS/RAF (mecanismo no clásico) (Coyoy et al, 2016).

### 2.2.3. E2 y su mecanismo de acción en diferentes tipos de cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, los efectos de los estrógenos en las células son múltiples y diversos, durante estos procesos fisiológicos, la expresión y los mecanismos de señalización de los receptores de estrógeno, son complejos y pueden presentar acciones independientes, sinérgicas y/o acciones antagónicas (Tang et al., 2019). Se ha observado durante más de un siglo, que los estrógenos desempeñan un papel en el desarrollo de múltiples tipos de cánceres, no obstante, el papel de estos sólo se ha dilucidado en los últimos años, con lo que se ha descrito, que las neoplasias inducidas por los estrógenos en las mujeres incluyen el cáncer de mama, ovario y endometrio, en los hombres se ha visto su relación en el desarrollo de cáncer de próstata (CaP) (Cavaliere & Rogan, 2021). Siendo así que, en las mujeres posmenopáusicas con niveles más altos de estrógenos circulantes, con respecto a las mujeres con niveles más bajos, se ha observado un riesgo dos veces mayor de cáncer de mama, ovario y endometrio, no obstante, se han recopilado pocos datos sobre esta relación en mujeres premenopáusicas (Brown & Hankinson, 2015; Cavaliere & Rogan, 2021).

Diversas investigaciones han establecido que existe un mecanismo independiente de los ER (**Figura 5**), ya que, los estrógenos pueden ser metabolizados a catecoles, seguidos de una oxidación a semi-quinonas y quinonas, a través de un proceso de ciclo redox que produce especies reactivas de oxígeno (ROS), y la formación de metabolitos reactivos de estrógenos llamados estrógenos-3,4-quinonas (Bhardwaj et al., 2019; Cavaliere & Rogan, 2021). Si el metabolismo de los estrógenos se desequilibra, surgen cantidades significativas de estas quinonas y se forman aductos estrógeno-ADN, que conducen al daño oxidativo del ADN dejando sitiosapurínicos, mientras que los aductos estables permanecen en el ADN, a menos que sean eliminados por las enzimas de reparación provocando mutaciones cancerígenas (Bhardwaj et al., 2019; Bronowicka-Kłys et al., 2016; Cavaliere & Rogan, 2021), aunado a esto, Savage y colaboradores descubrieron que el estrógeno y los metabolitos del estrógeno causaban rupturas de doble cadena (DSB) en el ADN, tanto en células epiteliales de mama normales como en células de cáncer de mama ER negativas (Savage et al., 2014).



Asimismo, varios estudios han demostrado el papel mutagénico de estos metabolitos de estrógenos-3,4-quinonas, en la promoción de algunos cánceres de mama ER negativos, cáncer de ovario, cervical, entre otros (Bhardwaj et al., 2019; Bronowicka-Kłys et al., 2016; Mungenast & Thalhammer, 2014; Samavat & Kurzer, 2014).

Por otra parte, diferentes estudios en los que se ha analizado el papel oncogénico de los estrógenos, han demostrado que el E2 activa la vía de MAPK en las células de cáncer de mama, próstata y colon, esta activación depende de la estimulación de la cascada Src/Ras la cual tiene un papel proliferativo (Castoria et al., 2008). De igual manera, se ha establecido que la unión de E2 con sus ER de membrana (**Figura 5**), a través de AKT aumenta la captación de glucosa y la glucólisis, contribuyendo a la proliferación de las células cancerosas (Levin & Hammes, 2016a).

Sin embargo, en los tumores in vivo la disponibilidad de glucosa es inadecuada, en las células epiteliales del cáncer de mama se ha revelado que el E2, actuando a través del ER $\alpha$  y el Er $\beta$  promueven la activación de la AMPK, lo que suprime la actividad de AKT y la glucólisis, conduce a la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que aumenta su capacidad para producir acetyl-CoA, la cual es empleada en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa, resultando en un uso más eficiente de la glucosa para producir ATP y citrato, importante para la síntesis de fosfolípidos necesarios para construir nuevas membranas para la proliferación celular (Levin & Hammes, 2016a).

De igual manera, se ha visto que la activación del mER conduce a la interacción con muchas proteínas, incluidas las proteínas G, Src, receptores de factores de crecimiento (EGFR, IGFR1, HER2), cinasas citoplasmáticas (MAPK, PI3K, AKT), así como enzimas de señalización (adenilato ciclasa), desencadenando una gran variedad de vías de señalización que repercuten directamente en la supervivencia de las células cancerosas (Bhardwaj et al., 2019).

Por otro lado, en cáncer de ovario se ha observado que la unión del E2 al ER $\alpha$ , conduce a la activación transcripcional de los genes sensibles a los estrógenos, que proporcionan sistemas de señalización de división y diferenciación de la célula. Entre



**Figura 5. Mecanismo de acción de los estrógenos en la progresión del cáncer.** En el panel A) Mecanismos independientes de los ER, se pueden observar las acciones desencadenadas por los estrógenos una vez que entran a la célula y son metabolizados a catecoles formando una semi-quinonas y quinonas, a través de un proceso de ciclo redox que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y metabolitos reactivos de estrógenos llamados estrógenos-3,4-quinonas, este proceso ocurre en la mitocondria, posteriormente estos metabolitos reactivos se trasladan al núcleo, donde se forman principalmente aductos estrógeno-ADN causando rupturas de doble cadena (DSB) en el ADN, lo que inhibe los mecanismos de reparación del ADN y por consiguiente un aumento en la tumorigénesis. En el panel B) Mecanismos dependientes de ER, se pueden observar los procesos moleculares que se desencadenan por acción de los estrógenos, al unirse sus receptores específicos de membrana, tanto en condiciones altas y bajas en glucosa, la unión de E2 con sus mER a través de AKT aumenta la captación de glucosa, la glucólisis, así como la producción de ATP, contribuyendo a la proliferación y viabilidad celular. Mientras que en condiciones de glucoprivación el E2, actuando a través del ER $\alpha/\beta$  promueven la activación de la AMPK, suprimiendo a AKT y una consiguiente disminución en la glucólisis, que conduce a la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa (PDH-P), aumentando la acetyl-CoA, que activa el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa (FosOx), que es un uso más eficiente de la glucosa para producir ATP, citrato, nucleótidos cíclicos, NADPH y fosfolípidos, que también promueve la proliferación y viabilidad celular. Por otro lado, los mER/GPER pueden actuar en vías de señalización diversas, activando a adenilato ciclasa (AC) que promueve la vía de la PI3K/AKT, pueden activar a Src que repercute en la transactivación de EGFR, o bien, los mER pueden activar la vía de las MAPK cinasas, la cual repercute a nivel de núcleo promoviendo la transcripción de genes. De igual forma, los ER $\alpha/\beta$  pueden actuar como oncogenes al translocarse al núcleo promoviendo la transcripción de genes implicados en la proliferación y supervivencia celular (Imagen de autoría propia).

#### 2.2.4. E2 y su mecanismo de acción en la progresión del GB.

Se ha especulado que el ER $\alpha$  y el ER $\beta$  pueden tener diferentes papeles en la regulación génica y sus niveles relativos dentro de los tejidos pueden influir en las respuestas celulares a estrógenos, se cree que estas diferencias son la base de la acción agonista/antagonista tejido específica mediante los SERMS (moduladores selectivos de los receptores a estrógenos). En general, se cree que el ER $\alpha$  puede tener funciones de oncogén y que promueve la proliferación celular, mientras que el ER $\beta$  es anti proliferativo y actúa como un supuesto supresor tumoral (Batistatou et al., 2004; Cao et al., 2016).

En este sentido, se ha observado que compuestos naturales como la Liquiritigenina (flavonona que se aisló de *Glycyrrhiz auralensis* y se encuentra en una variedad de plantas) actúan como agonistas del ER $\beta$  e inhiben el crecimiento de los tumores gliales (Sareddy et al., 2012), mientras que el tamoxifeno que pertenece al grupo de los SERM inhibe la proliferación de los gliomas e inducen la muerte de las células tumorales (Patel et al., 2012).

Por otra parte, se demostró que el E2 induce el crecimiento celular, al aumentar el número de células en cultivo de las líneas celulares U373 y D54 derivadas de astrocitomas humanos a través del ER $\alpha$  y su interacción con SRC-1 y SRC-3 (coactivadores de receptores de esteroides) (González-Arenas et al., 2019). Aunado a esto, el E2 induce la proliferación, migración e invasión en líneas celulares derivadas de glioblastoma, lo que sugiere un papel pro-oncogénicos de esta hormona en el desarrollo de los GBs (Del Moral-Morales et al., 2022; Wan et al., 2018).

Asimismo, se ha observado la participación del E2 en la inducción de la TEM en células humanas derivadas de GB que expresan ambos subtipos de ER, el tratamiento con E2 (10 nM) promueve cambios en la morfología celular y en la estructura del citoesqueleto de actina aumentando la capacidad migratoria e invasiva de las células de GB, así como un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina (Hernández-Vega et al., 2020). De igual manera, en otro estudio se confirmaron los hallazgos en el aumento de la expresión del RNAm y proteínas de dichos

marcadores mesenquimales provocados por el tratamiento con E2 y se observó el mismo efecto tras el tratamiento con el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 10 nM, así como la formación de largas proyecciones de filamentos de actina promoviendo una morfología mesenquimal, sin embargo, el tratamiento conjunto de E2 y TGF-  $\beta$  bloquea la activación de la EMT disminuyendo la expresión de los marcadores mesenquimales y los cambios morfológicos (Hernández-Vega & Camacho-arroyo, 2021).

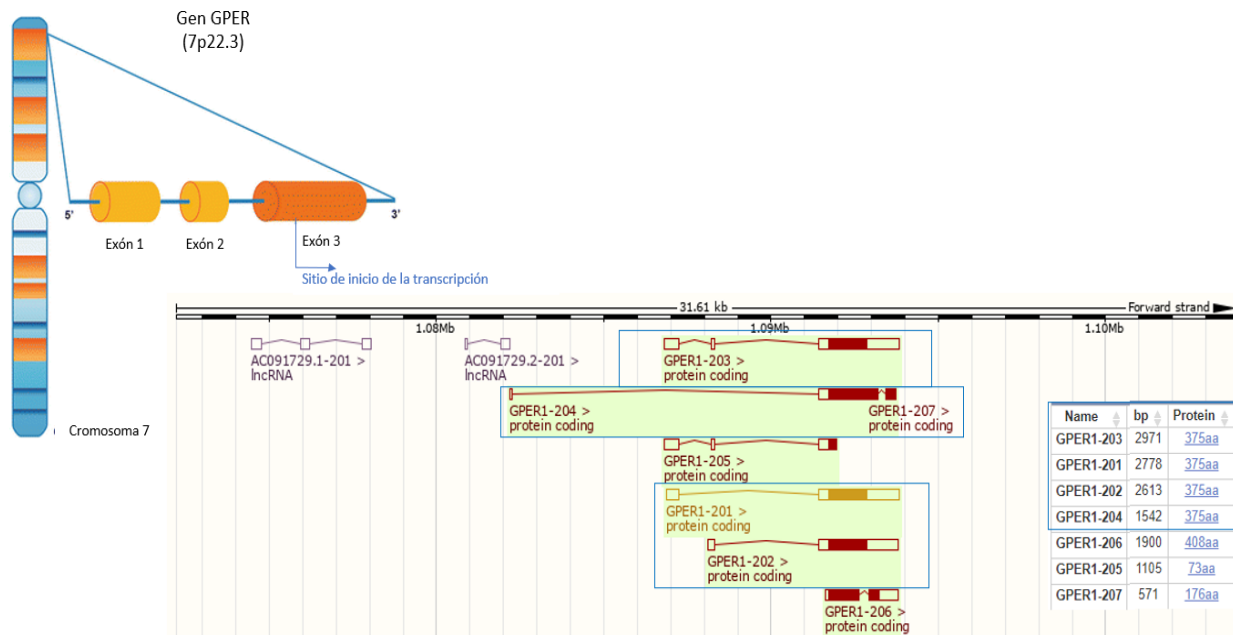
Estos hallazgos sugieren que los estrógenos pueden modular y promover la presencia de diferentes neoplasias de manera independiente y dependiente de los ER mediante diversos mecanismos como el daño al ADN o la activación de vías de señalización respectivamente, aunado a esto se ha observado que los ER $\alpha$  y ER $\beta$  pueden tener acciones antagónicas, siendo el ER $\alpha$  el que se asocia a un papel oncogénico en cáncer de ovario, cervical, próstata y el cual ha sido ampliamente descrito en la proliferación, crecimiento, invasión, migración, así como cambios morfológicos en los GBs.

### **2.3. Receptor a estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30/GPER/GPER1)**

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), se expresan en diferentes tejidos y están involucrados en numerosos procesos fisiológicos (Gigoux & Fourmy, 2013), entre estos receptores se encuentra el GPER, que fue originalmente identificado a finales de la década de 1990 como un receptor huérfano (sin ligando conocido), llamado GPR30 (basado en la numeración secuencial para receptores huérfanos), el cual se identificó mediante una evaluación del cDNA de múltiples fuentes, incluyendo linfocitos B, células de cáncer de mama que expresan ER y células endoteliales expuestas a estrés (Prossnitz & Barton, 2014).

Posteriormente, se encontró que GPR30 se une específicamente a los estrógenos y que activa las cascadas de señalización intracelular, comúnmente asociadas a los GPCRs, lo que llevó a su designación como receptor a estrógenos acoplado a proteínas G (GPER1, sin embargo en su mayoría los autores lo reportan como GPER) (Prossnitz & Arterburn, 2015).

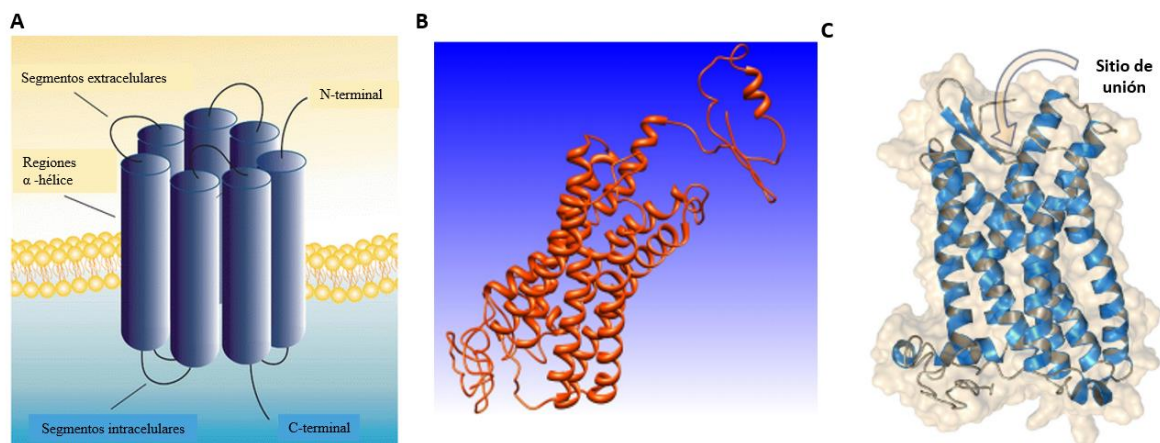
El gen del GPER (**Figura 6**), se encuentra en el cromosoma 7 (7p22.3) en el ser humano, contiene tres exones, su marco de lectura abierta se encuentra codificado en 1126 pares de bases (pb), para un único exón codificante, el exón 3 para el que tiene 6 transcritos (splicing alternativo). Además, presenta 180 genes ortólogos en diferentes especies y un gen parálogo (Figueira et al., 2018; PDB, n.d.).



**Figura 6. Representación del gen GPER.** El exón 3 es el único que transcribe para 2 transcritos antisentido y 6 transcritos, de los cuales únicamente 4 (enmarcados en azul) se traducen a los 375 aminoácidos que componen al receptor. Modificado de (Figueira et al., 2018).

La proteína del GPER, está conformada por 375 aminoácidos con un peso teórico de 42 KDa, y adquiere una estructura tridimensional propia de los receptores de la familia de la Rhodopsina1 o GPCRs clase A (**Figura 7**). Su estructura abarca siete regiones transmembranales  $\alpha$ -helicoidales, tiene cuatro segmentos extracelulares y cuatro segmentos citoplasmáticos, su extremo N-terminal es extracelular y tiene tres residuos de asparagina (asn25, 32 y 44) que son blanco de glucosilación, la unión del ligando y la activación del receptor se producen por interacción con esta región (Figueira et al., 2018; González et al., 2019).

Por el contrario, el extremo C-terminal es citoplasmático y se ha demostrado que el complejo de proteína G heterotrimérica se une al tercer segmento citoplasmático, el dominio PDZ (también denominado dominio GLGF, -glicina-lisina-glicina-fenilalanina) ubicado en la región C-terminal, parece ser importante para la ubicación del receptor en la membrana plasmática. Este dominio participa en el anclaje de GPER, ya que interacciona con la actina del citoesqueleto, a través de mediadores como el factor regulador del intercambiador  $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$  (NHERF); este dominio también interactúa con otras proteínas asociadas a la membrana y la proteína cinasa A, además, la región C-terminal también participa en la desensibilización e internalización del receptor, este proceso depende de la fosforilación a la que sea sometida esta región por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (Figueira et al., 2018).



**Figura 7. Proteína de GPER.** En el panel A) En la representación esquemática, se muestran los siete pasos transmembranales  $\alpha$ -helicoidales, los tres segmentos extracelulares y los tres segmentos citoplasmáticos; extremo N-terminal es extracelular y el extremo C-terminal es citoplasmático. B) Representación 3D de GPER obtenida por modelado por homología. C) Modelo 3D de GPER obtenido mediante GPCR-I-TAS-SER (algoritmo en línea para modelar GPCRs), en la que se indica el sitio de unión del receptor (Figueira et al., 2018; Grande et al., 2020; Rosano et al., 2012).

Ha sido difícil cristalizar a los GPCRs para obtener su estructura y coordenadas atómicas, la cristalografía de rayos X es una de las técnicas de medición más precisas, sin embargo, no siempre es posible cristalizar a todas las moléculas. Aunque se conocen más de 900 genes GPCRs, solo se han cristalizado y resuelto 40 de estas proteínas. En este contexto, el modelado molecular (MM) se ha convertido en una técnica esencial para emplearse cuando no hay coordenadas atómicas (obtenidas experimentalmente) de la proteína blanco (S. U. Khan et al., 2020). La posibilidad de investigar, de forma sencilla y precisa la ubicación de la unión y la afinidad de las moléculas por GPER está íntimamente ligada a la disponibilidad de una descripción molecular correcta de su estructura (Grande et al., 2020); siendo hasta hace poco la estructura cristalina de la rodopsina, la única estructura de GPCR utilizada ampliamente para la generación de modelos por homología de GPER.

El primer modelo crudo de GPER, se construyó para predecir la unión del ligando, mediante enfoques computacionales (Grande et al., 2020; S. U. Khan et al., 2020). La estructura 3D del GPER se construyó mediante modelado de homología utilizando la estructura cristalina de la rodopsina bovina como plantilla (Grande et al., 2020; S. U. Khan et al., 2020). Los errores de alineación (cerca de una tercera parte del alineamiento), y la baja similitud de secuencia entre GPER y la rodopsina bovina, permitieron un modelo confiable exclusivamente de las siete hélices de la región transmembranal del GPER, las porciones restantes de la proteína, incluidos los bucles citosólicos, se han modelado “Ab-initio” utilizando los programas Robetta y Modeller. El modelo final de GPER incluye 375 aminoácidos y un enlace disulfuro entre los residuos Cys130 y Cys207 (Rosano et al., 2012).

Además, se han empleado servidores web para el modelado de la estructura de GPER, como GPCR-I-TAS-SER, que es un algoritmo diseñado específicamente para modelar receptores acoplados a proteínas G. La conformación resultante, fue una estructura de siete hélices que concuerda con las predicciones anteriores, con la excepción de los primeros 50 residuos de aminoácidos en las regiones N-terminales que no formaban parte del núcleo del haz de la hélice (Cirillo, 2019; Grande, 2020).

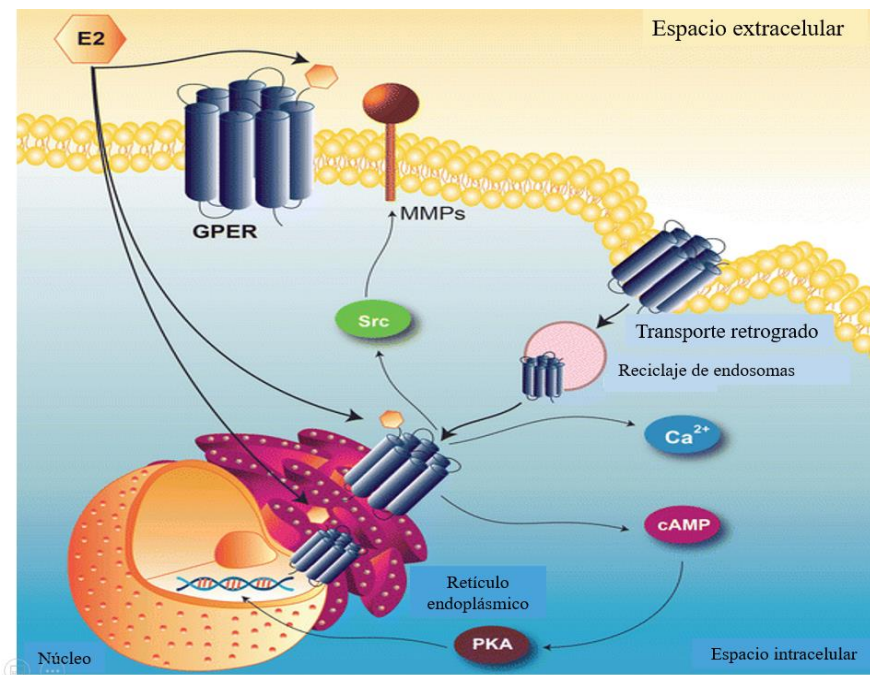


Se ha descrito que GPER, induce la señalización a través de la activación de proteínas G $\alpha$ s (estimuladora) o G $\alpha$ i (inhibidora), sugiriendo que este receptor está asociado a la membrana celular, sin embargo, varios estudios proporcionan evidencia de que una fracción mayor de GPER está localizada en compartimientos intracelulares. Revankar y cols., usando E2 fluorescente (E2-Alexa 633) mostraron que, GPER se encuentra predominantemente en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi y en la envoltura nuclear (Revankar et al., 2019).

Por otra parte, se ha reportado una expresión intracelular de GPER en neuronas, lo que indica una distribución celular de GPER que aparentemente varía según la especie, el tejido y el tipo celular. En adición, varios estudios muestran que GPER, es activado intracelularmente y luego se difunde a través de las membranas celulares e inicia la señalización celular. Todo esto indica que GPER, es un GPCR atípico y que su ubicación intracelular puede cambiar dinámicamente, en respuesta a señales específicas; por tanto un papel para GPER, como un ER localizado únicamente en la membrana plasmática (MP) sigue siendo controvertido, y el mecanismo exacto por el cual GPER actúa en respuesta a E2, sigue siendo difícil de definir (Luo & Liu, 2020; Prossnitz & Arterburn, 2015).

Se ha determinado que GPER, se une con alta afinidad al E2 ( $K_d = \sim 3-6$  nM), lo que conduce a una activación rápida y transitoria de numerosas vías de señalización intracelular (**Figura 8**), que promueven la producción de AMPc, la movilización intracelular de calcio y la activación de la tirosina cinasa Src. Además, induce la liberación del factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF), y la subsecuente transactivación de EGFR, que activa vías de señalización como PI3K/AKT (Filardo et al., 2000; Prossnitz & Barton, 2014; Revankar et al., 2005). Cabe destacar que GPER, sufre un transporte retrógrado constitutivo, desde la membrana plasmática hacia los endosomas. Siendo la endocitosis una característica común de los GPCRs, después de la unión y activación del ligando para evitar un exceso en la señalización, sin embargo, la endocitosis de GPER tiene algunas particularidades, en contraste con otros GPCRs que generalmente se degradan en los lisosomas, el GPER endocitado regresa al aparato de Golgi y posteriormente, sufre degradación proteosómica mediada por ubiquitina,

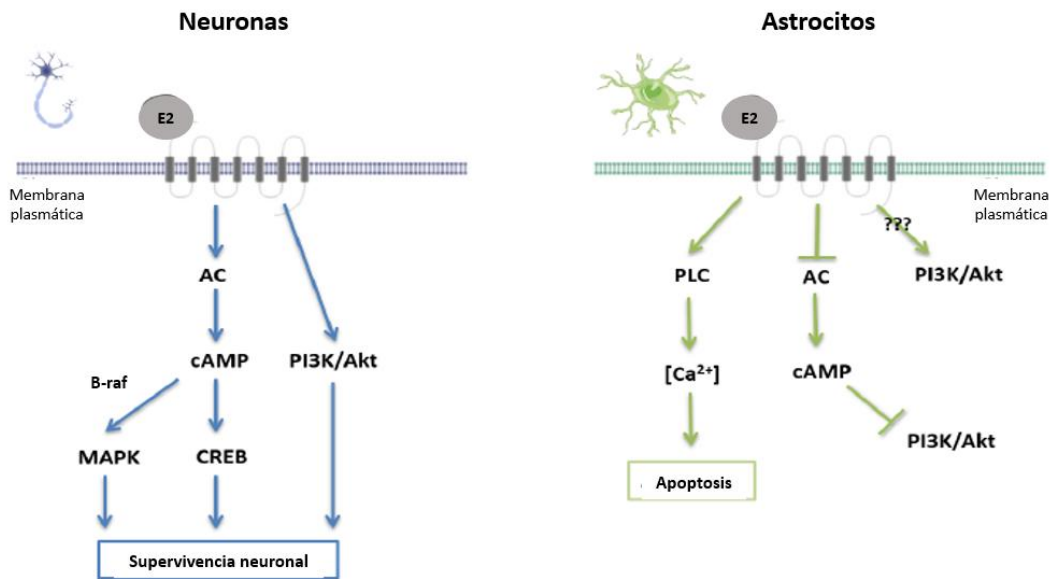
además, se ha demostrado que el NHERF1 al unirse con GPER puede mejorar su estabilidad inhibiendo su degradación (Figueira et al., 2018).



**Figura 8. Mecanismo de acción del GPER al activarse con E2.** GPER puede encontrarse en la membrana citoplasmática, en el retículo endoplasmático e incluso en la envoltura nuclear. Al unirse E2 a GPER se inician vías de señalización que activan a Src, que actúa sobre proteínas liberadoras de metaloproteinasas (MMPs), se induce la liberación de  $Ca^{2+}$ , y el incremento en el AMPc, el cual activa a PKA. Esta cinasa fosforila a CREB y este se transloca al núcleo. La interacción del E2 con GPER promueve el transporte retrógrado del receptor, internalizándolo en endosomas para su reciclaje y modulación (Figueira et al., 2018).

Los mecanismos de señalización, activados por GPER en neuronas y astrocitos aún no se comprenden completamente, los datos disponibles se centran en los efectos desencadenados en las neuronas (**Figura 9**), los cuales, promueve la actividad de cinasas como PI3K/AKT, ERK y atenúa la vía pro-apoptótica JNK. El agonista del GPER llamado G1 ( $K_d=10$  nM), también induce la activación de AC y el consiguiente aumento dosis dependiente de los niveles de AMPc en las neuronas (Roque C, 2019).

La activación de GPER con G1 en astrocitos, induce la activación de la fosfolipasa C (PLC) y un aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  que desencadena apoptosis (**Figura 9**), además, GPER podría tener la capacidad de controlar la reactividad microglial, a través de la disminución de la actividad fagocítica, por la expresión inducible de óxido nítrico sintasa y óxido nítrico (NO) (Roque C, 2019). Mientras que, en cultivos primarios derivados de astrocitos (**Tabla 1**), se ha reportado que GPER aumenta la proliferación y viabilidad celular, por otro lado, se ha observado que también puede tener un efecto contrario en este tipo de cultivos, ya que aumenta la glucoprivación y la apoptosis, proporcionando evidencias controversiales, sobre el papel que desempeña GPER en este tipo de células (Ibrahim et al., 2020; Rong Li et al., 2021; X. S. Wang et al., 2020).



**Figura 9. Señalización específica de las vías activadas por GPER en neuronas y astrocitos.** En las neuronas la activación de GPER, se asocia a un aumento de la supervivencia neuronal, a través del incremento en los niveles de AMPc y la activación de las vías de MAPK y CREB mediante la activación de la vía de PI3K. En los astrocitos, la activación de GPER, reduce los niveles de AMPc y promueve la apoptosis, debido a la activación de la vía PLC y al consecuente aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$ . AC: adenilato ciclasa; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc; AMPc: adenosin monofosfato cíclico;  $[Ca^{2+}]$ : calcio intracelular; MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos; PLC: fosfolipasa C; Akt: proteína cinasa B. (Roque C, 2019).

### 2.3.1 GPER y su papel en diferentes tipos de cáncer

Por otra parte, se ha evaluado el papel del receptor en diferentes líneas celulares derivadas de distintos tipos de cáncer (**Tabla 1**), en estos estudios se ha revelado que en cáncer de mama, en la línea celular MDA-MB-231, GPER aumenta la actividad de ERK1/2, contribuyendo a la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas (Molina et al., 2017). En cáncer de mama, modula la expresión de miR-144 estimulando su progresión (Jung, 2019). Por el contrario, en líneas celulares derivadas de TNBC (cáncer de mama triple negativas) con una expresión elevada de GPER, revelan que, las pacientes con este tipo de tumor, presentan un mejor pronóstico con respecto a aquellas con niveles bajos de expresión de este receptor, ya que su activación disminuye la proliferación e invasión celular así como la TEM por medio de la vía Hippo-Yap (Huang et al., 2020).

Por otro lado, diversos estudios han revelado que en cáncer de ovario, GPER se expresa tanto en la envoltura nuclear como en el citoplasma; encontrándose que el GPER nuclear promueve la proliferación, migración e invasión celular, así como metástasis en los ganglios linfáticos, además se determinó como un factor predictivo de baja supervivencia (Jung, 2019).

A su vez, en la línea celular SPEC2 derivada de cáncer de endometrio, se observó que GPER contribuye a la progresión de estas células mediante la interacción con el factor de motilidad autocrina (AMF) (Li et al., 2019), también potencia el crecimiento tumoral a través de la activación de ciclina D, ERK y EGFR, en la línea celular Hec50 caracterizada por ser una línea celular negativa a ER $\alpha$  (Jung, 2019), además se encontró que GPER aumenta el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular (Liu et al., 2014a).

También se ha descrito el papel de GPER en melanoma, determinándose que aumenta la proliferación celular, supervivencia, la resistencia a la apoptosis y promueve la melanogénesis (Wróblewska, M; Biały, L; Młynarczuk-Biały, I, 2017).

Mientras que, la baja expresión de GPER en CaP poco diferenciado, se asocia con una mayor expresión y actividad de Akt, y del factor de transcripción CREB. Asimismo, la pérdida de GPER puede promover la supervivencia celular y la actividad proliferativa del CaP (Figueira, 2018).

En relación al GB, recientemente se ha reportado la expresión de la proteína de GPER en dos líneas celulares derivadas de GB humanos (U251 y LN229), en las cuales el agonista G1 [1  $\mu$ M] indujo el arresto del ciclo celular (G2/M) y alteración en la dinámica de la tubulina, sin embargo dichos efectos fueron independientes a GPER (Hirtz et al., 2021)

Cabe destacar, que Fan y colaboradores describieron un aumento de la expresión del RNA mensajero y el contenido de proteína de GPER en la línea celular ATD5 (derivada de condrocitos) después de ser tratadas con E2 (10 nM y 100 nM), este efecto en el aumento de la expresión de GPER también fue observado en la línea celular MDA-MB-231 tratada con E2 (10 nM), así como, en la línea celular SKBR3 tratada con E2 (100 nM), estas evidencias sugieren que el E2 puede estar involucrado en la regulación de la expresión de GPER (Fan et al., 2018; Huang et al., 2020; Vivacqua et al., 2012)

|                        | Líneas celulares               | Ensayo                             | Aumento/<br>Inhibición | Referencia                                  |
|------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| Astrocitos normales    | Cultivo primario de astrocitos | Viabilidad y proliferación celular | ↑                      | (X. S. Wang et al., 2020)                   |
|                        | Cultivo primario de astrocitos | Glucoprivación                     | ↑                      | (Ibrahim et al., 2020)                      |
|                        | Cultivo primario de astrocitos | Apoptosis                          | ↑                      | (Roque et al., 2019)                        |
|                        | Cultivo primario de astrocitos | Viabilidad celular                 | ↑                      | (Rong Li et al., 2021)                      |
| Cáncer de ovario       | OVCAR5                         | Proliferación                      | ↑                      | (Liu et al., 2014b)                         |
|                        | OVCAR5                         | Migración<br>Invasión              | ↑                      | (Yan et al., 2013)                          |
|                        | Human BG-1                     | Proliferación                      | ↑                      | (Albanito et al., 2007)                     |
| Cáncer de mama         | MDA-MB-468<br>MDA-MB-436       | Migración<br>Invasión              | ↑                      | (Yu et al., 2014)                           |
|                        | SKBR3                          | Expresión                          | ↑                      | (Y. Li et al., 2010; Vivacqua et al., 2012) |
|                        | MDA-MB-231                     | Migración<br>Invasión              | ↓                      | (Huang et al., 2020)                        |
|                        | MCF-7<br>T-47D<br>BT-474       | Migración<br>Invasión              | ↑                      | (Ruan et al., 2012)                         |
|                        | MCF7<br>MDA-MB-231<br>SKBR3    | Proliferación                      | ↑                      | (Albanito et al., 2007)                     |
| Cáncer colorrectal     | HCT116<br>HT-29                | Proliferación                      | ↑                      | (Gilligan et al., 2017)                     |
| Células de condrocitos | ATDC5                          | Expresión<br>Contenido de proteína | ↑                      | (Fan et al., 2018)                          |

**Tabla 1.** Principales efectos asociados a la activación de GPER por E2 en diferentes líneas celulares.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El GB es el tumor primario más frecuente y maligno del SNC. Se ha demostrado que, en estos tumores el E2 a través de la interacción con sus receptores intracelulares modula diferentes mecanismos moleculares que promueven la proliferación celular y malignidad. Ahora bien, se sabe que el GPER participa en la progresión de diferentes tipos de neoplasias tales como cáncer de mama, ovario, endometrio, próstata entre otros. Recientemente se ha reportado la expresión de la proteína de GPER en dos líneas celulares derivadas de GB humanos (U251 y LN229), sin embargo, no se han estudiado ampliamente los diferentes niveles de expresión de GPER y su posible regulación por E2 en un mayor número de líneas celulares de GBs humanos, teniendo en cuenta la alta heterogeneidad que presenta esta neoplasia.

### **4. HIPÓTESIS**

Considerando que el E2 promueve la progresión de los GBs y que los niveles de expresión de GPER son diversos en el desarrollo de otros tipos de cáncer, es probable que las células derivadas de GBs humanos expresen GPER (GPR30) en diferentes niveles de expresión debido a la heterogeneidad propia del GB, y que además el E2 regule la expresión del receptor como se ha observado en diferentes tumores.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. Objetivo general**

Caracterizar la expresión del GPER y su regulación por E2 en líneas celulares derivadas de GBs humanos.

## 5.2. Objetivos particulares

- Determinar la expresión del GPER a nivel de RNA mensajero en líneas celulares de GBs humanos.
- Evaluar el contenido de las proteínas del GPER en líneas celulares de GBs humanos.
- Conocer la localización subcelular del GPER en células de GBs humanos.
- Establecer el papel del E2 en la regulación de la expresión del GPER en líneas celulares derivadas de GBs.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1. Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares U251 o U251-MG proveniente de una biopsia de un hombre caucásico de 61 años, la línea U87 o U87-MG (ATCC: HTB-14) proveniente de la biopsia de un hombre caucásico de 44 años, la línea LN229 obtenida de una biopsia de una mujer caucásica de 60 años y la línea T98G originaria de una biopsia de un hombre caucásico de 61 años, todas las líneas celulares son derivadas de un GB humano y sus características moleculares se muestran en la **Tabla suplementaria 1**. Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM con rojo de fenol (Biowest, S.A., México) suplementado con suero fetal bovino con hormonas (SFB) al 10%, 1 mM de piruvato de sodio (Biowest, S.A., México), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen, USA) y 1 mM de antibiótico (Estreptomicina 10 g/L; Penicilina G 6.028 s/L; Anfotericina B 0.025 s/L, L0010). Las células se incubaron bajo condiciones estandarizadas de 37°C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### 6.1.1. Tratamientos con E2

Las células se cultivaron en cajas de 6 pozos y una vez alcanzada la confluencia celular de 70-80% se realizó un cambio de medio a DMEM sin rojo de fenol (Invitrogen, USA) suplementado con suero fetal bovino sin hormonas (SFB) al 10%, 0.1 mM de aminoácidos



no esenciales (Invitrogen, USA), 1 mM de antibiótico (estreptomina 10 g/L; penicilina G 6.028 s/L; and anfotericina B 0.025 s/L, L0010) y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se adicionó E2 en concentraciones de: 1nM, 10 nM, 100 nM, y 1µM, así como el vehículo (ciclodextrina) durante 24 h y se realizó la extracción de RNA o proteínas totales.

## **6.2. Extracción de RNA**

Para determinar el perfil de expresión basal del GPER, se extrajo el RNA total de las células U251, U87, LN229 y T98G, que fueron cultivadas en las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar una confluencia del 80-100%. Después, se llevaron a cabo dos lavados con PBS, se adicionaron 500 µL de trizol (Invitrogen) a 4°C se mantuvieron 5 min en hielo se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se homogenizaron en vórtex por 20 segundos. A continuación, se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitaron en vórtex, se incubaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 15 min. Se obtuvieron dos fases: una inferior de color rojo compuesta por fenol-cloroformo, en la cual se encuentran las proteínas y una fase acuosa incolora en la parte superior donde quedó el RNA, mientras que el DNA se mantuvo en la interfase.

Posteriormente, se precipitó el RNA para lo cual se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregó isopropanol en un volumen equivalente y las muestras se mantuvieron a 4°C durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min, el RNA se concentra en una pastilla de color blanco amarillento. Después se decantó el sobrenadante, se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 75% y agitación en vórtex durante 30 segundos se centrifugaron a 12,500 rpm, 8 min a 4°C y el sobrenadante se decantó. En seguida se realizó otro lavado con 1 mL de etanol al 80%, se centrifugaron a 12,500 rpm 8 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla formada de cada muestra. Finalmente, el RNA se resuspendió en 25 µL de agua grado biología molecular (H<sub>2</sub>O GBM).

La cantidad de RNA extraído se determinó mediante espectrofotometría (Nanodrop-2000 ThermoScientific), se realizaron los cálculos correspondientes para tener una

concentración final de 2 µg de RNA por muestra que se utilizaron para la RT-PCR, asimismo, se verificó la integridad de RNA obtenido por electroforesis con un gel de agarosa al 1%.

### 6.3. Transcripción Reversa (RT)

Se realizó una reacción de transcripción reversa, para obtener el cDNA a partir de 2µg de RNA proveniente de las cuatro líneas celulares evaluadas, además de un control de astrocitos humanos (cat:1805, ScienCell, CA, USA), agregando los siguientes componentes en un tubo eppendorf (volúmenes para una reacción): 1 µL de oligo dT (500 µg/mL; Invitrogen), 1 µL de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 2 µg de RNA total y H<sub>2</sub>O GBM (el volumen necesario para tener un total de 10 µL). La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y después se mantuvo en hielo, posteriormente, se añadieron 4 µL de amortiguador de reacción 5X (ThermoScientific), 2µL de DTT 1M (ThermoScientific) y 1 µL de H<sub>2</sub>O GBM, llevando a incubar por 2 min a 37°C, y se agregó 1µL de la enzima M-MVL Reverse Transcriptase™ (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, ThermoScientific). El contenido se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 50 min, para inactivar la reacción se calentó a 70°C durante 5 min. En caso de no utilizarse inmediatamente se almacenó a 4°C.

### 6.4. RT-qPCR

Para la estandarización de los oligonucleótidos se agregaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf: el mix para la reacción (Buffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O GBM) según las cantidades especificadas en el protocolo de la enzima Taq polimerasa (Platinum, invitrogen), enseguida se agregaron 2 µL de cDNA y 1µL de los primers del gen 18S usado como control de expresión constitutiva. Para la determinación de la expresión de GPER en las muestras se usó 1 µL de primers específicos para GPER, las características de cada par de primers se especifica en la Tabla 2. Se incluyó un control negativo, al cual se le agregó 1 µL de agua en lugar de cDNA. Se obtuvo un volumen total de reacción de 25 µL, los tiempos y temperaturas de reacción se colocaron siguiendo el inserto específico para la enzima Taq polimerasa: desnaturalización 94°C, 2 min;

desnaturalización: 94°C, 30 seg; alineamiento: 60-64°C, 30 seg; extensión: 72°C, 30 seg; 35 ciclos, extensión final: 72°C, 7 min.

Los productos de la RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer 0.5X TB (Tris base, ácido bórico), se emplearon 3 µL de GreenSafe DNA Gel Stain (Invitrogen™) por cada 100 mL de agar preparados para poder observar los amplificadores de la PCR.

Para realizar la PCR en tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction* -qPCR) se utilizó el kit FastStart DNA SYBR Green Master I (Cat N°12239264001) para realizar la amplificación en el equipo LightCycler 2.0 (N°03531414001) [Roche, Grenzacherstrasse, Basile, Suiza]. Las condiciones de reacción programadas fueron las siguientes: un ciclo de pre-incubación (95°C/10 min), 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C/10 min, alineación a 62°C/10s, 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/0s, fusión a 95°C/0s) y un ciclo de enfriamiento (42°C/1min). La expresión relativa se cuantificó por el método comparativo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008)

| Gen                         | Secuencia                                 | Tamaño del amplificado | TM Experimental | % CG |
|-----------------------------|---|------------------------|-----------------|------|
| GPER<br>(Deng et al., 2019) | Fw: <b>5'-TCACGGGCCACATTGTCAACCTC-3'</b>  | 206 pb                 | 62°C            | 56   |
|                             | Rv: <b>5'-GCTGAACCTCACATCCGACTGCTC-3'</b> |                        |                 | 54   |
| 18S                         | Fw: <b>5'-AGTGAAACTGCAATGGCTC-3'</b>      | 167 pb                 |                 | 54   |
|                             | Rv: <b>5'-CTGACCGGGTTGGTTTTGAT-3'</b>     |                        |                 | 60   |

**Tabla 2.** Características de los primers para amplificar GPER y 18S.

## 6.5. Extracción de proteínas y *Western blot*

Después de los tratamientos, las células fueron lisadas con buffer RIPA [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Tritón y 0.01% SDS]. Los lisados se cuantificaron por el método de Bradford, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y empleando una curva patrón de albumina de suero bovino, también se empleó un lisado de proteínas de astrocitos humanos (cat:1806, ScienCell, CA, USA). Enseguida, se procedió a realizar una electroforesis utilizando un gel SDS-PAGE al 12% con un voltaje constante de 80 V, se cargaron 15 µg de proteína de cada muestra mezclada con buffer de Laemmli 2X (Tris-base (pH 6.8) 100 mM, azul de bromofenol al 0.1%, glicerol al 20%, SDS al 4% y β-mercaptoetanol al 10%), en una proporción 5:1 (v/v) de proteína-buffer a 4°C.

Posteriormente, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), a 25 V durante 45 min en una cámara semi húmeda. Después, se bloquearon las membranas con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBS-Tween 0.1% (TBS-T 0.1%) durante 2 h a 37°C en agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal GPER (ab39742, Abcam, Cambridge, MA), en una dilución 1:400 durante 48 h a 4°C. Enseguida, se llevaron a cabo 5 lavados de 5 min con TBS-T 0.1%, y se incubaron a temperatura ambiente (T.A) durante 45 min con un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de conejo, acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, sc-2004) en una dilución de 1:10000. La señal inmunorreactiva se detectó mediante quimioluminiscencia empleando el kit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoScientific Inc., IL, USA).

Como control de carga se usó la proteína α-tubulina, para lo cual, a la membrana se le realizaron 5 lavados, 5 min c/u con TBS-T 0.1%; luego se lavó con glicina (pH 2.5) 15 min a 50°C y 10 min a T.A en movimiento. Se realizaron nuevamente 5 lavados, 5 min c/u con TBS-T 0.1%, y se bloqueó con una solución de BSA al 5% en TBS-T 0.1% durante 2 h a 37°C, después se incubó con un anticuerpo primario monoclonal contra α-tubulina (Santa Cruz, sc-398103) en una dilución 1:1000. El procedimiento de incubación y detección de proteínas fue similar al descrito anteriormente, en este caso se empleó el

anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón, acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, sc-516102).

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los blots se realizaron con el software ImageJ® (Schneider et al., 2012), los resultados se muestran como el cociente entre la densidad de la banda correspondiente a GPER y la densidad de la banda de  $\alpha$ -tubulina.

## **6.6. Inmunofluorescencia**

Con el fin de determinar la localización celular de GPER en células derivadas de GB, se sembraron las líneas celulares U87 y U251 en cajas de 24 pozos, en las condiciones basales anteriormente descritas. Posteriormente, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 2% durante 20 min a T.A, una vez pasado el tiempo se llevaron a cabo 3 lavados por 5 min con PBS, luego se incubaron las células por 20 min a T.A en 500  $\mu$ l de una solución de bloqueo (PBS al 1% de glicina y 1% de BSA) o bien, se incubaron con 500  $\mu$ l de una solución de PBS al 1% de glicina, 1 % de BSA y 0.2 % de Tritón X100, para bloquear y permeabilizar a las células. Después de este tiempo, se retiró la solución y se colocó el anticuerpo primario policlonal GPER (ab39742, Abcam, Cambridge, MA), en una dilución 1:350 durante toda la noche a 4°C. Luego de este tiempo, se retiró el anticuerpo primario y se llevaron a cabo 3 lavados por 5 min con PBS, enseguida se incubó con el anticuerpo secundario Alexa 568 (Thermo fisher, IL, USA), en una dilución 1:400 durante 60 min a T.A, protegiéndolo de la luz y una vez pasado el tiempo se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. Posteriormente, se contra tiñeron los núcleos con 1  $\mu$ g/ml de Hoechst 33,342 (Thermo fisher, IL, USA) durante 5 min, seguido de 3 lavados de 5 min con PBS. Finalmente, las preparaciones se montaron debidamente con medio de montaje para fluorescencia (Polysciences, PA, USA) y se observaron en el microscopio confocal Nikon A1R. Para todas las condiciones experimentales se capturaron cuatro campos arbitrarios diferentes, se realizó una reconstrucción en Z, con un aumento total de 600X y los parámetros de ancho x alto x profundidad (106.07  $\mu$ m x 106.07  $\mu$ m x 10  $\mu$ m, respectivamente).

El análisis de la intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas se realizaron con el software ImageJ® (Schneider et al., 2012), se analizaron al menos 3 células por campo, se determinó el porcentaje del área positiva a GPER, mediante la localización de las ROIs (*Regions of interest*, en inglés) de cada célula, en la que se tomó la región correspondiente al núcleo y las regiones en las que se observó fluorescencia del receptor, para el análisis de la intensidad de fluorescencia, se empleó la fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF), para determinar la localización del receptor, se analizó mediante la obtención de imágenes en Stack Z (conjunto de imágenes bidimensionales apiladas para generar profundidad), con las que se obtuvo una proyección ortogonal y 3D. También se realizaron controles negativos para el GPER en ambas condiciones (Campa, 2018; Image J, 2011).

$$\text{CTCF} = \text{Densidad integrada} - (\text{área de la célula seleccionada} \times \text{fluorescencia media del fondo})$$

### **6.7. Predicción de elementos de respuesta a estrógenos (ERE)**

La secuencia del gen GPER fue obtenida de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se obtuvieron las matrices de probabilidad para ERE de las plataformas JASPAR (A. Khan et al., 2018), HOMER (Heinz et al., 2010) y HOCOMOCO (Kulakovskiy et al., 2018). Los datos se analizaron con el paquete TFBSTools (Tan & Lenhard, 2016) para R v4.0.2., los sitios con score igual o mayor a 0.9 y predichos al menos por dos matrices se consideraron como posibles EREs. Los archivos .bed generados fueron visualizados con el software Integrative Genomics Viewer v2.8.7 (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

### **6.8. Análisis estadístico**

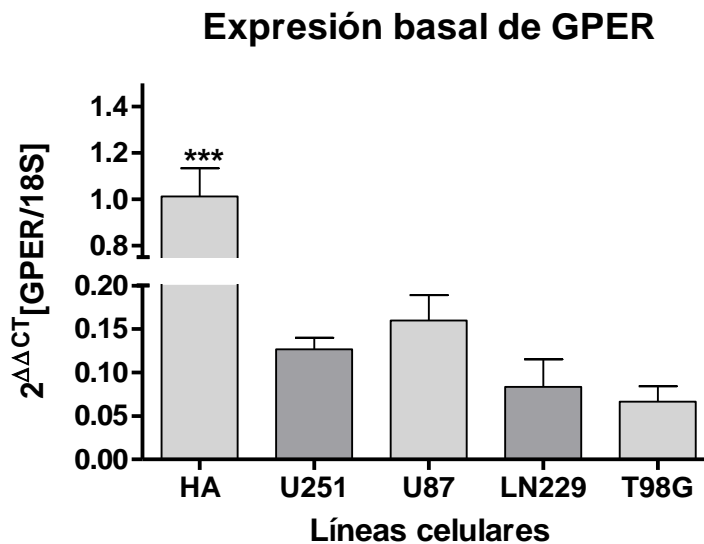
Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se utilizó el software GraphPadPrism 5.0 para hacer los análisis estadísticos. En todas las pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza del 95%, por lo que se consideró como estadísticamente significativos aquellos datos que tengan un valor de  $p < 0.05$ . Con relación a esto los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M (error estándar de la media, por sus siglas en inglés) (n=5).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Expresión basal del RNAm de GPER en líneas celulares derivadas de GBs humanos

Con el propósito de evaluar la expresión de GPER a nivel de RNAm en las líneas celulares derivadas de GB humanos de interés, se llevó a cabo la técnica de RT-qPCR para los genes GPER y el gen 18S (control de expresión constitutiva).

Se observó que el RNAm del GPER se expresa de forma basal (**Figura 10**), en las líneas celulares U251 U87, LN229, T98G, y como control se utilizó el RNAm de astrocitos humanos normales (*human astrocytes*, HA). El análisis de los datos mostró diferencias significativas en la expresión de GPER entre el RNA proveniente de astrocitos humanos y las diferentes líneas celulares evaluadas.

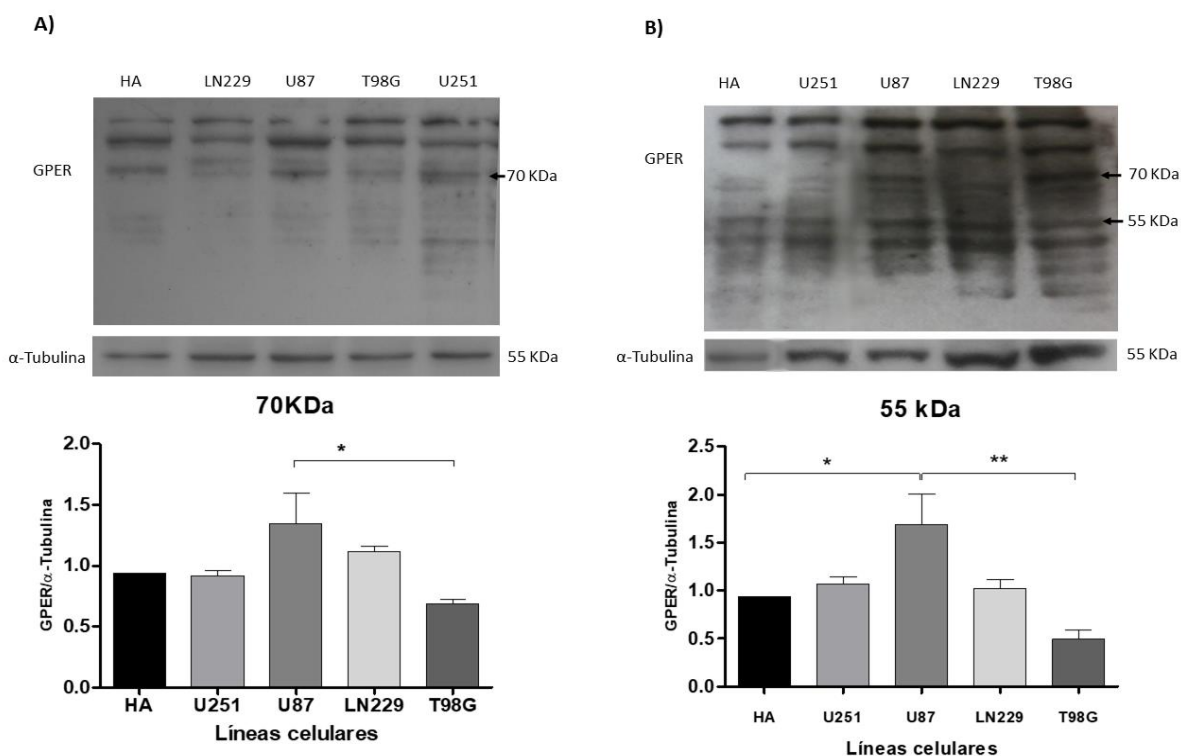


**Figura 10. Expresión basal de GPER en astrocitos humanos normales y en las líneas celulares U251, U87, LN229, T98G derivadas de GBs humanos.** Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos para la expresión del receptor en cada línea celular mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey **\*\*\***,  $p < 0.001$ , HA vs U251, U87, LN229 Y T98G. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n=3).

## 7.2. Expresión basal de la proteína de GPER en líneas celulares derivadas de GBs humanos

Para analizar la expresión basal del contenido de proteína de GPER mediante la técnica de *Western blot*, se empleó un lisado de proteínas de astrocitos normales humanos (*human astrocytes*, HA) y de cuatro líneas celulares derivadas de GB humanos: U251, U87, LN229 y T98G.

Se observó que tanto los astrocitos normales, como las cuatro líneas celulares expresan a la proteína de GPER (**Figura 11**). El peso teórico del receptor es de 42 KDa, sin embargo, debido a las glicosilaciones en las asparaginas 25, 32, 44 el peso molecular del receptor se ve afectado, así como su separación en la electroforesis, siendo así que el anticuerpo contra GPER reconoció dos bandas, una de peso molecular de 70 KDa y la otra de 55 KDa, las cuales han sido reportadas previamente en otros estudios y por lo que ambas fueron consideradas para el análisis densitométrico (Azizian, 2018; González, 2019; Yin et al, 2017, Zhang, 2012).



**Figura 11. Contenido basal de la proteína GPER en astrocitos humanos y células derivadas de GB humano.** En el panel A) En la parte superior se observa el WB

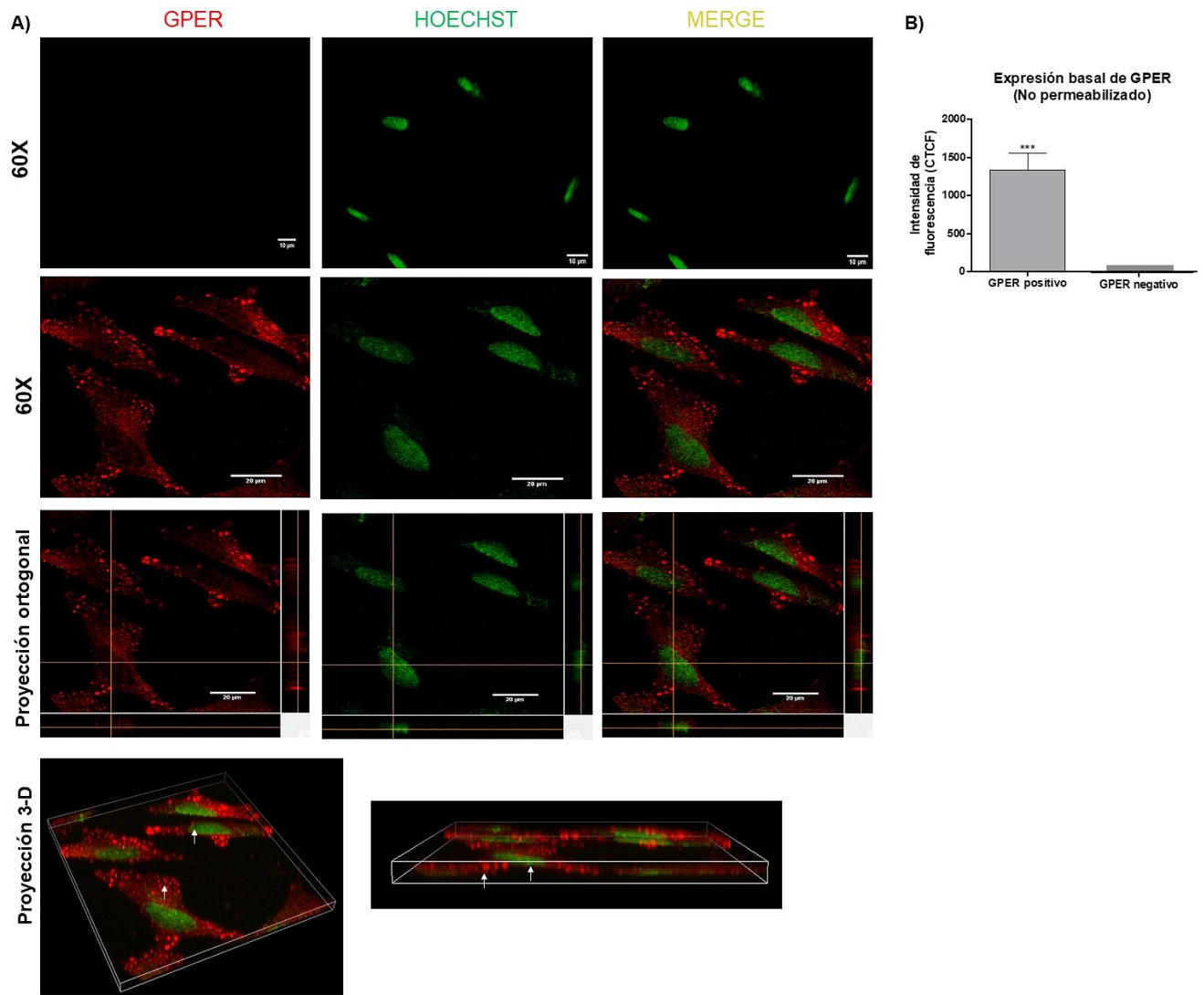


representativo, en el cual se marca con una flecha negra la banda de GPER a un peso molecular de 70 kDa, en la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de dicha banda, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa \*,  $p < 0.05$ , U87 vs T98G. En el panel B) En la parte superior se observa el WB representativo, en el cual se marca con una flecha negra la banda de GPER a un peso molecular de 70 y 55 kDa, en la parte inferior se observa el análisis densitométrico de GPER correspondiente a la banda de 55 kDa, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa \*,  $p < 0.05$ , U87 vs HA y \*\*,  $p < 0.005$ , U87 vs T98G. Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey, los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n=5).

### 7.3. Localización subcelular de GPER en líneas celulares derivadas de GBs humanos

Con la finalidad de determinar la localización basal de GPER, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en la línea celular U87, ya que el análisis del contenido de proteína indicó una mayor expresión de GPER en esta línea celular. La evaluación de la localización celular del receptor se llevó a cabo en dos tipos de preparaciones, permeabilizadas y sin permeabilizar. De acuerdo con algunos estudios, GPER se localiza principalmente en compartimientos intracelulares como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y en la envoltura nuclear (Revankar et al., 2005, 2019). Aunado a esto, la presencia intracelular de GPER se ve afectada por el transporte retrogrado que sufre el receptor desde la membrana plasmática hacia los endosomas, lo que sugiere que es un GPCR atípico y que su localización es variable entre los compartimientos intracelulares (Figueira et al., 2018; Luo & Liu, 2020; Prossnitz & Arterburn, 2015).

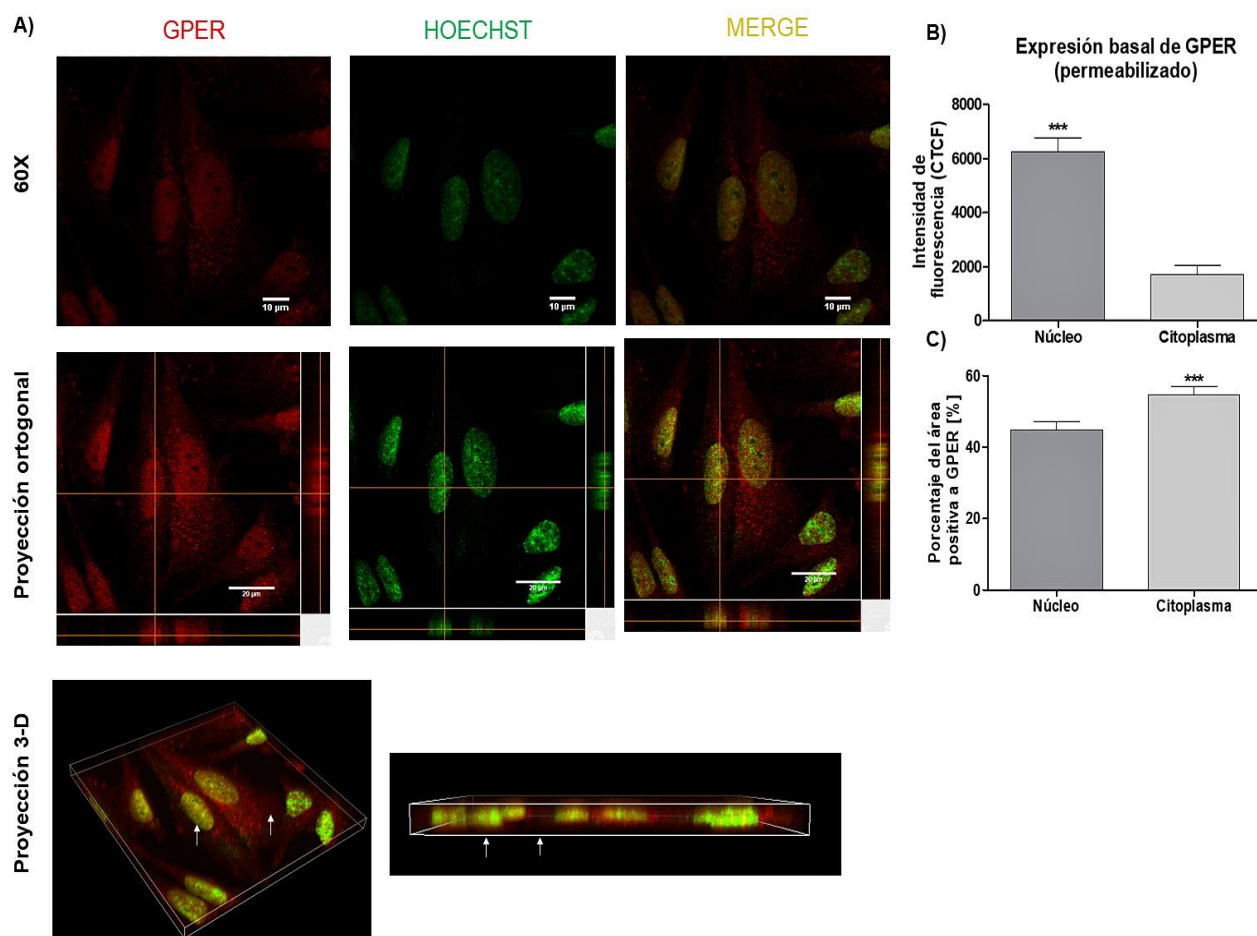
Para las células no permeabilizadas (**Figura 12.A**), se observa en la primera fila el control negativo de GPER, preparación que fue tratada únicamente con el anticuerpo secundario. Cabe mencionar, que las imágenes de esta preparación solo se obtuvieron utilizando el microscopio de epifluorescencia y posterior a verificar que la señal del anticuerpo es específica, las preparaciones de interés se evaluaron mediante microscopía confocal, como se observa en la segunda fila donde se muestra la localización del receptor en la membrana plasmática, sitio al cual ha sido asociada su localización, también se determinó la fluorescencia celular total corregida (CTCF) total positiva y negativa de GPER en la célula (**Figura 12.B**). El análisis estadístico muestra una diferencia significativa de la intensidad de fluorescencia positiva a GPER, con respecto al CTCF negativo del receptor en la célula.



**Figura 12. Localización celular de GPER en células U87 no permeabilizadas.** Se observa la expresión de GPER en color rojo y de Hoechst en color verde, así como el empalme de las imágenes en ambos paneles. En el panel A) se muestra con un aumento total de 600X, en la primera fila el control negativo para GPER, en la segunda fila se encuentra la imagen representativa de la detección del receptor, en la que se pueden ver agregados de GPER en los extremos celulares, que correspondería a la membrana plasmática, así como en el resto de la superficie celular. En la columna correspondiente al empalme, no se observa un traslape de la localización de GPER en el núcleo; así mismo en la proyección ortogonal, en las que las intersecciones de las líneas amarillas corresponden al punto en el plano XZ, YZ, se confirma que en la posición del núcleo no hay presencia de GPER. En la proyección 3D con flechas blancas señalan al receptor en

la membrana y el núcleo. B) CTCF total de GPER positivo y negativo <sup>\*\*\*</sup>,  $p < 0.001$ . Se realizó una prueba estadística de t de student de dos colas con un IC de 95%. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n=3).

En las células permeabilizadas (**Figura 13.A**), se observa la localización del receptor tanto en el núcleo como el citoplasma, mientras que los agregados de la señal de GPER observados en la condición no permeabilizada (**Figura 12.A**), disminuyen considerablemente. El análisis de CTCF muestra una mayor intensidad de fluorescencia en el núcleo con respecto a la del citoplasma. Por otro lado, el análisis de la distribución subcelular del área positiva a GPER indica un menor porcentaje de localización en el núcleo con respecto al citoplasma (**Figura 13.B**).

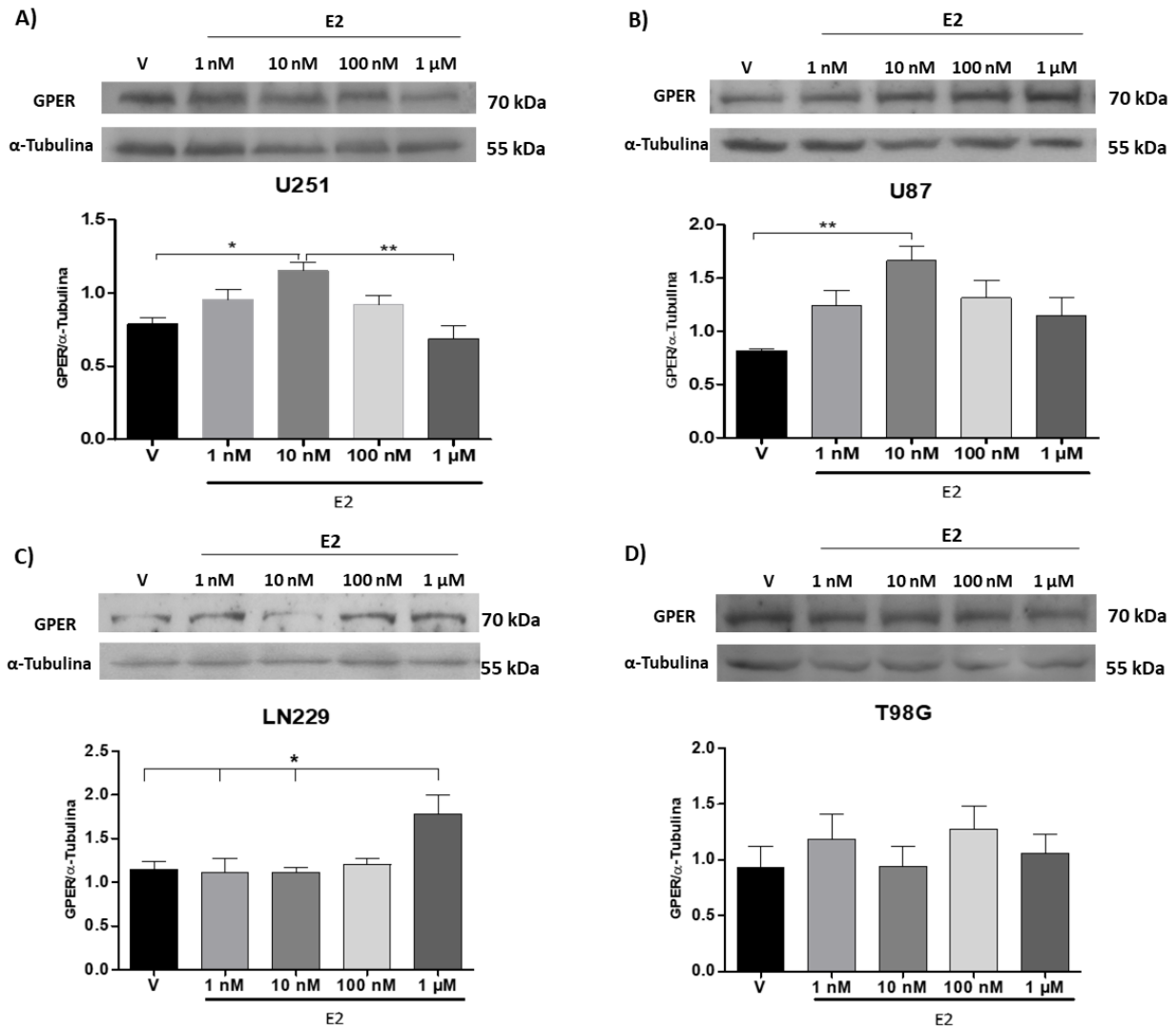


**Figura 13. Localización celular de GPER en células U87 permeabilizadas.** En el panel A) se muestra con un aumento total de 600X a GPER (rojo) en toda la célula, observándose una intensa señal en el núcleo, también se muestra la tinción del núcleo

(verde); seguida del empalme de las dos señales. En este caso, las señales tanto del núcleo como de GPER se traslapan, dicho hallazgo se confirma con la proyección ortogonal en la que las intersecciones de los planos muestran en color amarillo la señal que se traslapa, mientras que la señal de GPER que no se encuentra en el núcleo se ve en color rojo únicamente. Finalmente, en la proyección 3D se señala con flechas blancas la posición de GPER en el núcleo y en el citoplasma., B) CTCF de GPER, \*\*\*,  $p < 0.001$ , núcleo vs citoplasma. C) Porcentaje del área positiva a GPER, \*\*\*,  $p < 0.001$ , núcleo vs citoplasma. Se realizó una prueba estadística de t de student de dos colas con un IC de 95%. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n=3).

#### **7.4. El E2 incrementa la expresión de la proteína de GPER en líneas celulares derivadas de GBs humanos**

Con el objetivo de analizar el papel del E2, en la expresión del contenido de la proteína de GPER, en las cuatro líneas celulares de interés y dado que la evaluación de la expresión basal del receptor, mostró diferencias significativas entre las líneas celulares, se evaluó el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de E2 por 24 h. Nuestros resultados mostraron, que la concentración de E2 10 nM incrementa la expresión del GPER en las células U251 y U87, pero no en las células LN229 y T98G (**Figura 14**), además se observa que E2 1  $\mu$ M, en la línea celular U251 disminuye la expresión del receptor. Cabe mencionar, que la banda correspondiente al peso molecular de 70 KDa, fue la que se expresó de forma más consistente tras los tratamientos con E2.



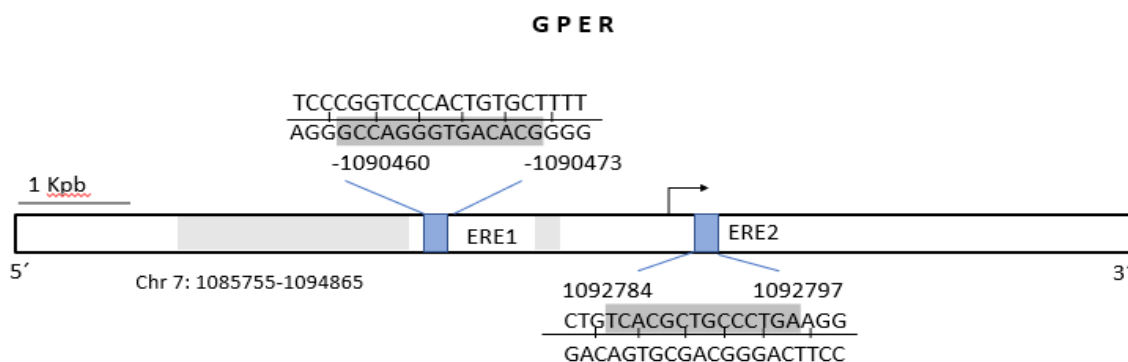
**Figura 14. Efecto de E2 en la expresión de la proteína de GPER en diferentes líneas celulares derivadas de glioblastoma humano.** En la parte superior de cada panel se presenta un WB representativo de cada línea celular, así como el análisis densitométrico correspondiente en la parte inferior, para cada una de las líneas celulares en el panel A) U251, \*,  $p < 0.05$ , 10 nM vs V y \*\*,  $p < 0.01$ , 10 nM vs 1 μM. B) U87, \*\* $p < 0.01$ , 10 nM vs V. C) LN229, \* $p < 0.05$ , 1 μM vs V, 1 μM vs 1 nM y 1 μM vs 10 nM. D) En la línea celular T98G, no se encontraron cambios estadísticos significativos tras los tratamientos con E2. Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc comparación múltiple de Tukey, los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n=5).

## 7.5. Presencia de ERE en el promotor de GPER

Teniendo en cuenta, que se presentó una regulación en la expresión del contenido de proteína posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de E2 (1, 10, 100 nM y 1  $\mu$ M), y con el fin de predecir si el promotor del gen del GPER presenta ERE, se llevó a cabo un análisis *in silico* con el paquete TFBSTools para R v4.0.2 en Windows. Se encontraron dos sitios predictivos de ERE con score igual o mayor a 0.9 y predichos al menos por dos de las tres matrices empleadas (tabla 3), por lo que se consideraron como posibles EREs (**Figura 15**).

|             | Secuencia      | Posición            | Base de datos      |
|-------------|----------------|---------------------|--------------------|
| <b>ERE1</b> | GCCAGGGTGACACG | -1090460 a -1090473 | JASPAR<br>HOCOMOCO |
| <b>ERE2</b> | TCACGCTGCCCTGA | +1092784 a +1092797 | JASPAR<br>HOMER    |

**Tabla 3.** Elementos de respuesta a estrógenos en la secuencia promotora del gen GPER.



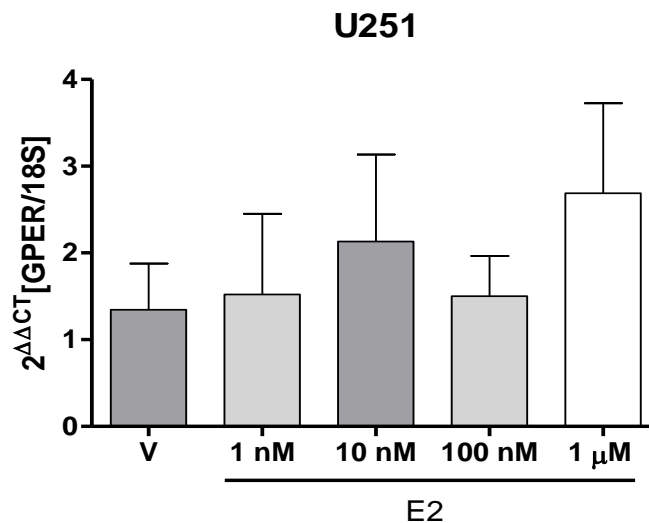
**Figura 15.** Análisis *in silico* de la presencia de EREs en el promotor del gen GPER.

Representación visual del gen del GPER, los ERES predichos por el análisis *in silico* están marcados en azul y en gris oscuro se marcan sus secuencias correspondientes, el ERE1: -1090460 a -1090473 está antes del inicio del sitio de transcripción (marcado con una flecha), mientras que el ERE2: +1092784 a +1092797, se encuentra después del inicio de transcripción y en color gris claro se marcan las regiones promotoras (1086600-1089001pb y 1090400-1090601pb). El análisis se realizó en tres plataformas diferentes

(JASPAR, HOMER Y HOCOMOCO), se consideró como un posible sitio de unión aquellos predichos por dos o más bases de datos con un valor de score de 0.9 o más con  $p < 0.05$ .

### 7.6. Efecto de E2 en la expresión del RNAm de GPER

Una vez que se determinó que el E2 modula la expresión de GPER, a nivel de proteína y que el promotor presenta dos posibles EREs, con el objetivo de analizar el papel de esta hormona en la expresión del RNAm de GPER se utilizó la línea celular U251, dado que el E2 en esta línea celular mostro efectos contrarios tanto de aumento/disminución del receptor a concentraciones diferentes. Las células U251 fueron tratadas con diferentes concentraciones de E2 por 24 h y posteriormente se analizó la expresión de GPER mediante RT-qPCR. En la **Figura 16** se muestra que el E2 no modificó la expresión de GPER con respecto al vehículo.



**Figura 16. Expresión del RNAm de GPER tras en tratamiento con E2 en la línea celular U251.** Se realizó un análisis por el método de  $2^{(\Delta\Delta ct)}$  para medir la expresión relativa del GPER con respecto al gen 18Ss, seguido de una evaluación estadística de los datos obtenidos mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Tukey. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n=3).



## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo proporciona evidencia de la expresión del GPER en líneas celulares derivadas de GB humano. Desde que el receptor fue descrito por primera vez, como un receptor huérfano basado en su homología estructural con los receptores de quimiocinas (Barton et al., 2018; Gonzalez et al., 2019), hasta su posterior determinación como un receptor con ligando específico de estrógenos se ha reportado su expresión en múltiples tejidos y tipos celulares, tanto fisiológicos como patológicos (Huang et al., 2020; Rong Li et al., 2021; Roque et al., 2019).

Recientemente Hirtz y cols, reportaron la expresión de la proteína de GPER en dos líneas celulares derivadas de GB humanos (U251 y LN229), en las cuales el agonista G1 indujo el arresto del ciclo celular (G2/M) y alteración en la dinámica de la tubulina, los autores determinaron que este efecto por parte de G1 fue independiente de GPER (Hirtz et al., 2021), siendo así que, el papel de este receptor en células derivadas de GB humano aun es desconocido. Además, cabe destacar que el GB se caracteriza por su alta heterogeneidad (Robertson et al., 2019; Sengupta et al., 2021), por tanto es necesario evaluar los diferentes niveles de expresión de GPER en otras líneas celulares derivadas de GB humano y las diferencias que puedan existir entre líneas celulares de forma basal. Por lo que, en este trabajo se realizó la caracterización de la expresión del receptor a diferentes niveles, determinando su presencia a nivel de transcrito a partir de muestras de RNA, a nivel de contenido de proteína, así como su localización celular mediante inmunofluorescencia.

Como se puede observar en los resultados (Figura 10), se demostró la expresión del receptor a nivel de transcrito, empleando RNA de astrocitos humanos normales y de las cuatro líneas celulares de interés, tras el análisis estadístico de los datos se encontró que los astrocitos tienen una expresión mayor del receptor con respecto a las líneas U251, U87, LN229 Y T98G., este resultado es similar a lo que describe Krakstad y colaboradores donde se evaluó la expresión génica de GPER en muestras de cáncer de endometrio y muestras normales, encontrando una baja expresión de ARNm de GPER en las muestras tumorales (Krakstad et al., 2012), en otro estudio en este mismo tipo de

cáncer determinaron que los niveles del transcrito de GPER, son aproximadamente 6 veces menores en las muestras de cáncer que en el tejido normal, de igual forma describieron que la expresión de GPER era menor en los grados más altos de malignidad (Skrzypczak et al., 2013), en cáncer de mamá también se determinó que los niveles de ARNm de GPER de muestras de tejido tumoral era menores respecto al tejido mamario normal, además de describir que una baja expresión de ARNm de GPER predecía la metástasis en los ganglios linfáticos (Poola et al., 2008), por lo que, estos hallazgos sugieren que el transcrito de GPER se encuentra menos expresado en los fenotipos más agresivos de cáncer, por otro lado este resultado es similar a lo encontrado en líneas celulares derivadas de GB, en las cuales los ER tienen una menor expresión en los grados más altos de malignidad en los gliomas (Batistatou et al., 2004; Hernández-Vega et al., 2020; Sareddy et al., 2012; Tavares et al., 2018), siendo así que nuestros resultados refuerza la hipótesis planteada en diversos estudios, la cual sugiere que la expresión de los receptores a estrógenos es inversamente proporcional al grado de malignidad del tumor.

En este trabajo, también se llevó a cabo la determinación de los contenidos de proteína en estado basal, en un lisado proteico de astrocitos normales y en las cuatro líneas de interés (Figura 11), se sabe que muchos GPCRs de clase A migran en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE de 50 a 70 kDa en su estado glicosilado y de 30 a 40 kDa, después de la desglicosilación. Esta disminución en el peso molecular se debe principalmente a cambios en la unión del SDS con la proteína, más que a una pérdida absoluta de masa proteica (Gonzalez et al., 2019; Pupo et al., 2017), mientras que González y cols, describieron en la línea celular HEK293 (provenientes de células de riñón humano embrionario), que el GPER alcanza una masa molecular de 70 kDa debido a la glicosilación del residuo de asn 44, así mismo, se identificaron algunas especies importantes del receptor a una masa molecular de 40 kDa y 110 kDa como resultado de la desglicosilación. De igual manera, otros autores también han identificado al receptor en un peso molecular de 55 kDa, además, se ha sugerido que la presencia de diferentes especies de GPER están relacionadas a la maduración del receptor a través de la N-glicosilación (Azizian et al., 2018; Pupo et al., 2017).

En este caso, el anticuerpo contra GPER reconoció dos bandas, una de peso molecular de 70 kDa y la otra de 55 kDa, las cuales han sido reportadas previamente en otros estudios y por lo que ambas fueron consideradas para el análisis densitométrico (Azizian, 2018; González, 2019; Yin et al, 2017, Zhang, 2012), este análisis mostró resultados concluyentes sobre la expresión basal del receptor a nivel de la proteína. Se encontró una mayor expresión de GPER en la línea celular U87 tanto a 70 kDa y 55 kDa con respecto al lisado de astrocitos normales y las otras líneas celulares en las que la expresión fue similar; estas diferencias en la expresión basal del receptor puede ser debido a que las líneas celulares empleadas tienen diferentes perfiles de expresión génica, los cuales afectan la expresión de diferentes moléculas como se muestra en la Tabla suplementaria 1 (Ishii et al., 1999; H. Li et al., 2017; Verhaak et al., 2010).

Los resultados anteriores Figura 10 y 11, muestran que la expresión del transcrito de GPER es menor con respecto a los astrocitos normales, mientras que el contenido de proteína de GPER es mayor con respecto al control de astrocitos, un comportamiento similar de la expresión de GPER fue observado en un estudio realizado por Jala y colaboradores en el que evaluaron el transcrito y proteína de GPER en células derivadas de pulmón sano y tumorales, en el que determinaron que la expresión del ARNm y la proteína de GPER no son concordantes (Jala et al., 2012), en este caso los autores sugieren que los niveles de transcripción y de proteína pueden ser el resultado de un empalme alterado o mutaciones en el C-terminal de GPER, sin embargo esta idea requiere una investigación y abordaje experimental más profundo.

Por su parte, la localización subcelular de GPER ha sido amplio objeto de estudio, ya que es un receptor que se encuentran en la membrana plasmática, en las membranas del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, así como en la envoltura nuclear. También se ha determinado que el GPER sufre un transporte retrógrado constitutivo, desde la membrana plasmática hacia los endosomas, lo cuales transportan al GPER de regreso al aparato de Golgi y posteriormente sufre degradación proteosómica mediada por ubiquitina (Figueira et al., 2018; Rouhimoghadam et al., 2020).

Para estudiar la localización de GPER se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia (IF) en condiciones de permeabilización y sin permeabilización, puesto que la membrana celular es una bicapa fosfolipídica semipermeable con proteínas incrustadas, los pasos de fijación y permeabilización de las células podrían alterar la permeabilidad de la membrana celular y son procedimientos cruciales que podrían afectar los resultados de los ensayos inmunofluorescentes (R. Cheng et al., 2019). Se decidió hacer estos análisis de localización en la línea celular U87, debido a que, de las cuatro líneas utilizadas en este trabajo fue la que expresó el mayor contenido de la proteína en estado basal.

Se encontró que en las células no permeabilizadas (Figura 12), el GPER se detecta sólo en la membrana plasmática, ya que, al no utilizar un detergente para aumentar la permeabilidad de la membrana, el anticuerpo contra GPER no puede ingresar al interior de las células. La detección de GPER en la membrana plasmática se comprobó mediante las proyecciones ortogonales y las reconstrucciones 3-D, además de observarse agregados del receptor en las proyecciones morfológicas de las células, la detección del receptor en la membrana plasmática podría sugerir el que el receptor tiene un papel activo en el GB, esto debido a que se ha determinado que GPER contiene un motivo PDZ en el extremo C-terminal que regula su asociación con la membrana plasmática, así como una N-glicosilación la cual es crítica para su maduración y activación (Gonzalez et al., 2019; Sjo & Nordenskjö, 2014).

Por otro lado, en las preparaciones basales que fueron permeabilizadas (Figura 13) encontramos una presencia significativa en el citoplasma (55%), así como una localización de GPER nuclear (45%), otros grupos de trabajo también han reportado la presencia de GPER en el núcleo y citoplasma, Samartzis y cols en 2014 describieron la expresión de GPER en el compartimento citoplasmático (19,3%) y el compartimento nuclear (53,9%) en carcinomas derivados de endometrio. De igual manera, se ha descrito que GPER se invagina desde la membrana plasmática a través de vesículas recubiertas de clatrina y entra en los endosomas tempranos, acumulándose en un compartimento

perinuclear, esto mismo ocurre de manera constitutiva en aproximadamente un tercio de los receptores de 7 pasos transmembranales (7TMRs), sin embargo, la ruta de tráfico intracelular de GPER es altamente inusual, ya que este tipo de receptores típicamente se reciclan a la membrana plasmática o se degradan en los lisosomas, mientras que GPER al ser endocitado regresa al aparato de Golgi, y posteriormente sufre degradación proteosómica mediada por ubiquitina, además se ha demostrado que el NHERF1 al unirse con GPER, puede mejorar su estabilidad inhibiendo su degradación (S. Cheng, Quinn, et al., 2011; Figueira et al., 2018; Gonzalez De Valdivia et al., 2017; Samartzis et al., 2014).

Así mismo, observamos que la mayor intensidad de fluorescencia de GPER se presenta en el núcleo, esto puede ser debido al tráfico y acumulación del receptor en el compartimiento nuclear o perinuclear (Samartzis et al., 2014), se ha reportado que la acumulación perinuclear de los 7TMRs es inusual pero no única para el GPER, ya que el receptor de vasopresina 2A (V1aR) muestra un patrón perinuclear similar tras la endocitosis, no obstante, a diferencia del V1aR que se somete a endocitosis dependiente de agonistas, la internalización del GPER puede ser en ausencia de ligando, lo que indica que el GPER experimenta una endocitosis constitutiva, un hallazgo que fue comúnmente reportado entre el 40% de los 7TMRs (S. Cheng, Graeber, et al., 2011; Innamorati et al., 2001), de igual manera se ha reportado que se produce un transporte retrógrado de GPER desde la membrana plasmática hacia el núcleo, con una acumulación consecutiva de GPER en el espacio perinuclear seguida de una posterior dispersión en el citoplasma (S. Cheng, Graeber, et al., 2011).

Además, en otro estudio en fibroblastos asociados al cáncer de mama se ha demostrado que la localización nuclear de GPER y EGFR, es necesaria para su reclutamiento a la secuencia promotora de ciclina D1, lo cual pone en manifiesto el papel funcional que desempeña la interacción nuclear entre GPER y EGFR inducida por E2 (Madeo & Maggiolini, 2010), siendo así que en nuestro modelo de estudio, la detección de nuclear del GPER puede ser parte del proceso de endocitosis constitutiva propia del receptor como se mencionó anteriormente, o bien podría sugerir que la localización de nuclear de GPER es necesaria para promover procesos génicos tras la activación con sus agonistas específicos, no obstante es necesario realizar un abordaje experimental profundo para

evaluar esta posible actividad de GPER en el GB.

Por otra parte, diferentes grupos de investigación han determinado que el E2 a las concentraciones de 10 y 100 nM aumenta la expresión del RNAm de GPER y también promueve una mayor expresión del contenido de proteína (Fan et al., 2018; Gilligan et al., 2017; Huang et al., 2020; Yang et al., 2021). De este modo, nuestros resultados (Figura 14) mostraron que a la concentración de 10 nM de E2 promueve el aumento en la expresión del GPER en las células U251 y U87, mientras que en la línea celular LN229 el aumento se observó a una concentración de 1  $\mu$ M, finalmente la línea T98G no presentó cambio en la expresión del receptor bajo ningún tratamiento. Teniendo en cuenta el efecto observado en nuestro modelo de estudio y que GPER se une con alta afinidad al E2 con una  $k_d = \sim 3-6$  nM (Filardo et al., 2000; Prossnitz & Barton, 2014; Revankar et al., 2005), se sugiere que el E2 puede estar involucrado en la regulación de la expresión de GPER a diferentes concentraciones en las distintas líneas celulares reflejando la heterogeneidad celular de los GBs (Buruiană et al., 2020; Robertson et al., 2019). No obstante, también se observa que a la concentración de E2 1  $\mu$ M en la línea celular U251 la expresión del receptor se ve disminuida significativamente con respecto a la concentración de 10 nM y se expresa de forma muy similar a lo observado en el vehículo, por lo que es posible que a esta concentración de E2 en la línea celular U251, GPER sufre un transporte retrógrado constitutivo desde la membrana plasmática hacia los endosomas, ya que, la endocitosis es una característica común de los GPCR después de la unión y activación del ligando, esto para evitar un exceso en la señalización (Figueira et al., 2018).

Con respecto a la determinación de la expresión del receptor tras los tratamientos, la evaluación de la densitometría y la estadística mostrada en la Figura 14 se realizó únicamente para la banda de 70 kDa, que fue la que se expresó de forma más consistente, ya que la banda de 55 kDa evaluada en condiciones basales solo se encontraba en el carril correspondiente al vehículo como se puede observar en la Figura suplementaria 1 C, aunado a lo anterior, las condiciones en las cuales se obtienen las muestras pueden afectar la presencia o ausencia de las especies de GPER, debido a que se ha reportado que el rojo de fenol en el medio DMEM actúa como un ligando de ER,

así como el SFB con hormonas que pueden unirse a los ER, lo que sugeriría que las condiciones en el medio afectan también la expresión de GPER (Berthois et al., 1986; Milo et al., 1976). Para corroborar que las condiciones de crecimiento de las células influyen en la expresión del receptor, se llevó a cabo la determinación de GPER en una muestra control obtenida a partir de medio DMEM con rojo de fenol y SFB con hormonas (figura suplementaria 1); siendo así que nuestros resultados apoyan la evidencia acerca del efecto del rojo de fenol y el SFB en los receptores a estrógenos (Milo et al., 1976).

Como se ha mencionado anteriormente, nuestros datos de *Western blot* muestran que GPER parece tener diferentes pesos moleculares, probablemente a la glicosilación que sufre, la interacción con otras proteínas de membrana como clatrina o arrestinas (Jala et al., 2012), o bien a la posible dimerización del receptor, esto debido a que se ha descrito que la dimerización también puede desempeñar un papel en la progresión de los GPCR naciendo a través de la "línea de ensamblaje", desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi y la superficie celular (Gurevich & Gurevich, 2009), lo que podría explicar las bandas encontradas a un peso molecular entre 110 kDa y 140 kDa que correspondería al doble del peso molecular de las bandas inmunorreactivas evaluadas en este trabajo (Figura suplementaria 1), de igual forma la dimerización podría servir como mecanismo de desensibilización, suprimiendo rápidamente la señalización mediada por la proteína G cuando hay demasiados receptores activos por su ligando (Gurevich & Gurevich, 2009; Milligan et al., 2007), explicando la notable disminución de la banda de 55 kDa de GPER después de los tratamientos con E2, denotando que las especies de GPER pueden tener diferentes respuestas a los tratamientos, según sea su nivel de glicosilación y maduración como se observa para la especie de 70 kDa, también se ha propuesto que la dimerización del GPCR participara en la desensibilización mediada por la arrestina; basándose en el tamaño de la punta citoplasmática de la rodopsina y en la presencia de dos dominios en forma de copa en las arrestinas (Gurevich & Gurevich, 2009), que puede ser una posible explicación en nuestro contexto, teniendo en cuenta que el GPER es un miembro de la familia de la rodopsina, no obstante todas estas posibles explicaciones requieren un abordaje experimental profundo que abarque la presencia de las glicosilaciones de GPER, la asociación con otras proteínas y su posible dimerización, ya que como se ha descrito en distintas ocasiones

GPER es un GCPR atípico, donde su expresión y papel funcional varía según el tejido y contexto celular.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis *in silico* para determinar si el promotor del gen de GPER tiene elementos de respuesta a estrógenos, esto debido a los resultados obtenidos en la figura 14, encontrándose 2 posibles EREs (Figura 15, Tabla 3) este resultado aporta información importante, ya que la identificación de los genes blanco de los estrógenos, lo que permite comprender la dinámica de los genes regulados por la unión de ER $\alpha$ / $\beta$  (Eyster, 2016), que al ser activados con E2 actúan como factores de transcripción (Coyoy, A; Guerra-Araiza, C; Camacho-Arroyo, 2016; Delhez, 2019; Levin & Hammes, 2016c), el hallazgo de estos EREs nos sugiere que tiene como blanco de transcripción al gen del GPER.

En añadidura, en un análisis realizado por Plante y cols, se determinó que en biopsias de endometrio la mayor expresión del RNAm de GPER se presentó durante la fase proliferativa, lo que sugiere que la expresión del RNAm de GPER está regulada por estrógenos a través de uno de sus receptores nucleares. Para comprobar esta hipótesis en la línea celular Ishikawa (derivada de adenocarcinoma endometrial) realizaron tratamientos con E2 10 nM durante un periodo de 2 a 48 h, encontrando un aumento significativo del RNAm de GPER persistente durante todo tratamiento, de igual forma, emplearon al agonista del ER $\alpha$  (PPT) observando la misma respuesta que con el E2, y no así con el agonista del específico del ER $\beta$  (DPN) y el agonista G1 de GPER (Plante et al., 2012), lo que sugiere que la regulación de la expresión de GPER por E2 depende del ER $\alpha$ .

Es por esto que, en esta tesis también se evaluó el papel del E2 en la regulación de la expresión del RNAm del GPER, se realizaron tratamientos a diferentes concentraciones con dicha hormona 1 nM-1  $\mu$ M en la línea celular U251 (figura 16) durante 24 h, tiempo que tardan en duplicarse estas células (Cowley et al., 2014). Sin embargo, no se encontró un aumento estadísticamente significativo en la expresión de GPER tras los tratamientos con E2, como se ha reportado en otros tipos celulares (Deng et al., 2019; Fan et al., 2018; Huang et al., 2020; Plante et al., 2012). Es posible que el aumento de la expresión del



RNAm del receptor se pueda observar a otros tiempos de tratamiento, o bien que los efectos de E2 en la expresión de GPER se deben a modificaciones post-transcripcionales (Salgado et al., 2013) y no directamente a procesos transcripcionales de GPER, no obstante, es necesario evaluar este efecto en todas las líneas celulares de interés, ya que con este resultado se comprueba la necesidad de evaluar distintas líneas celulares para obtener un panorama más amplio de los procesos moleculares evaluados.

## **9. CONCLUSIONES**

En conclusión, GPER se expresa en las líneas celulares U251, U87, LN229 y T98 derivadas de GBs humanos tanto a nivel del RNAm como de la proteína, tiene una localización celular tanto en la membrana citoplasmática como en regiones intracelulares (núcleo y citoplasma). Así mismo, el E2 aumenta la expresión de este receptor a nivel de la proteína, por lo que estos resultados sugieren que GPER podría tener un papel funcional en la biología de los GBs.

## **10. PERSPECTIVAS**

En el presente trabajo fue posible determinar y caracterizar la expresión del GPER en líneas celulares derivadas de GB humano, dicho receptor es específico a estrógenos y ha sido ampliamente estudiado en diferentes neoplasias, principalmente cáncer de mama y ovario, sin embargo, hasta el momento se desconocía su presencia en GB. Por tanto, este trabajo brinda las pautas para seguir estudiando el papel del receptor en el desarrollo de la progresión, invasión y migración de estas líneas celulares mediante el uso de E2, agonistas (G1) y antagonistas (G15) específicos del receptor. De igual forma se podría evaluar si la expresión de GPER está regulada a través de uno de los receptores nucleares, como se ha visto que ocurre en otros tipos de cáncer. Finalmente, la evaluación del efecto de E2 sobre la activación de las acciones rápidas mediadas por GPER, permitirá ampliar el conocimiento en los diversos procesos moleculares implicados en la biología del GB humano.

## 11. REFERENCIAS

- Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Musti, A. M., Andò, S., & Maggiolini, M. (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 $\beta$ -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 67(4), 1859–1866. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2909>
- Azizian, H., Khaksari, M., Asadi karam, G., Esmailidehaj, M., & Farhadi, Z. (2018). Cardioprotective and anti-inflammatory effects of G-protein coupled receptor 30 (GPR30) on postmenopausal type 2 diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.028>
- Baker, M. E., Nelson, D. R., & Studer, R. A. (2015). Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology Origin of the response to adrenal and sex steroids: Roles of promiscuity and co-evolution of enzymes and steroid receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 151, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.020>
- Barton, M., Filardo, E. J., Lolait, S. J., Thomas, P., Maggiolini, M., & Prossnitz, E. R. (2018). Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.021>
- Batistatou, A., Stefanou, D., Goussia, A., & Agnantis, Niki J; Arkoumani, Evdokia; Papavassiliou, A. G. (2004). Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130(7), 405–410. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0548-9>
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 2496–2500. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2496>
- Bhardwaj, P., Au, C. C., Benito-martin, A., & Ladumor, H. (2019). Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development , growth and

- progression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 189, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.002>
- Bonkhoff, H., & Berges, R. (2009). The Evolving Role of Oestrogens and Their Receptors in the Development and Progression of Prostate Cancer. *European Urology*, 55(3), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.10.035>
- Bosland, M. C., Ford, H., & Horton, L. (1995). Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in nbl/cr and sprague-dawley hsd:sD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 $\beta$  or diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*, 16(6), 1311–1317. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.6.1311>
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., Mckenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhir, R., Bernard, B., Wu, C., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., ... Chin, L. (2013). Resource The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, 155, 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Bronowicka-Kłys, D. E., Lianeri, M., & Jagodziński, P. P. (2016). The role and impact of estrogens and xenoestrogen on the development of cervical cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1945–1953. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.007>
- Brown, S. B., & Hankinson, S. E. (2015). Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids*, 8–10. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.013>
- Buruiană, A., Florian, Ștefan I., Florian, A. I., Timiș, T. L., Mișu, C. M., Miclăuș, M., Oșan, S., Hrapșa, I., Cataniciu, R. C., Farcaș, M., & Șușman, S. (2020). The roles of miRNA in glioblastoma tumor cell communication: Diplomatic and aggressive negotiations. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms21061950>
- Camacho-Arroyo, I., Piña-Medina, A. G., Bello-Alvarez, C., & Zamora-Sánchez, C. J. (2020). Sex hormones and proteins involved in brain plasticity. In *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 114, pp. 145–165). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.04.002>
- Campa, V. (2018). *Análisis de Imágenes de Microscopía con ImageJ* (Campa, Vic, Issue March 2017).

[https://www.researchgate.net/publication/313768335\\_Analisis\\_de\\_Imagenes\\_de\\_Microscopia\\_con\\_ImageJ](https://www.researchgate.net/publication/313768335_Analisis_de_Imagenes_de_Microscopia_con_ImageJ)

- Cao, L., Qu, D., Wang, H., Zhang, S., Jia, C., & Shi, Z. (2016). Toosendanin Exerts an Anti-Cancer Effect in Glioblastoma by Inducing Estrogen Receptor  $\beta$  - and p53-Mediated Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms17111928>
- Castañeda, A. et al. (2015). Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Rev. Perú. Med.*, 32(2). [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342015000200017#fig01](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000200017#fig01)
- Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., & Domenico, M. Di. (2008). Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 13, 1318–1327. <https://doi.org/10.2741/2764>
- Cavaliere, E., & Rogan, E. (2021). The 3,4-Quinones of Estrone and Estradiol Are the Initiators of Cancer whereas Resveratrol and N -acetylcysteine Are the Preventers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms22158238>
- Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522–526. <https://doi.org/10.1038/nature11287>
- Cheng, R., Zhang, F., Li, M., Wo, X., Su, Y. W., & Wang, W. (2019). Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Frontiers in Chemistry*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00588>
- Cheng, S., Graeber, C. T., Quinn, J. A., & Filardo, E. J. (2011). Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor , G-protein-coupled-receptor-30 ( GPR30 / GPER ) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids*, 76(9), 892–896. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.018>
- Cheng, S., Quinn, J. A., Graeber, C. T., & Filardo, E. J. (2011). Down-modulation of the G-protein-coupled Estrogen Receptor , GPER , from the Cell Surface Occurs via a trans -Golgi-Proteasome Pathway \* □. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22441–22455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224071>

- Cowley, G. S., Weir, B. A., Vazquez, F., Tamayo, P., Scott, J. A., Rusin, S., East-Seletsky, A., Ali, L. D., Gerath, W. F. J., Pantel, S. E., Lizotte, P. H., Jiang, G., Hsiao, J., Tsherniak, A., Dwinell, E., Aoyama, S., Okamoto, M., Harrington, W., Gelfand, E., ... Hahn, W. C. (2014). Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Scientific Data*, 1, 1–12. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.35>
- Coyoy, A; Guerra-Araiza, C; Camacho-Arroyo, I. (2016). Metabolism Regulation by Estrogens and Their Receptors in the Central Nervous System Before and After Menopause. *Horm Metab Res*, 48, 489–496. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110320>
- Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S., & Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 455–465. <https://doi.org/10.1038/nrn3765>
- Del Moral-Morales, A., González-Orozco, J. C., Hernández-Vega, A. M., Hernández-Ortega, K., Peña-Gutiérrez, K. M., & Camacho-Arroyo, I. (2022). EZH2 Mediates Proliferation, Migration, and Invasion Promoted by Estradiol in Human Glioblastoma Cells. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.703733>
- Delhez, A. et al. (2019). Auditory function and dysfunction : estrogen makes a difference. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(4), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03295-y>
- Deng, J., Wang, W., Yu, G., & Ma, X. (2019). MicroRNA-195 inhibits epithelial-mesenchymal transition by targeting G protein-coupled estrogen receptor 1 in endometrial carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 20(5), 4023–4032. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10652>
- Eyster, K. M. (2016). Estrogen Receptors. In *Methods in Molecular Biology* (Eyster, Ka, pp. 1–576). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3127-9>
- Fan, D.-X., Yang, X.-H., Li, Y.-N., & Guo, L. (2018). 17 $\beta$ -Estradiol on the Expression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) Mitophagy, and the PI3K/Akt Signaling Pathway in ATDC5 Chondrocytes In Vitro. *Medical Science Monitor*, 24, 1936–1947. <https://doi.org/10.12659/msm.909365>
- Figueira, M. I., Cardoso, H. J., & Socorro, S. (2018). The Role of GPER Signaling in Carcinogenesis: A Focus on Prostate Cancer. In *Recent Trends in Cancer Biology:*

*Spotlight on Signaling Cascades and microRNAs* (pp. 59–117). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71553-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71553-7_5)

- Filardo, E., Quinn, J. A., Bland, K. I., & Frackelton, A. R. (2000). Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, *14*(10), 1649–1660. <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532>
- George, J. T., & Levine, H. (2020). Sustained Coevolution in a Stochastic Model of Cancer-Immune Interaction. *CANCER RESEARCH | TUMOR BIOLOGY AND IMMUNOLOGY*, *80*(4), 811–819. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2732>
- Gigoux, V., & Fourmy, D. (2013). Acting on hormone receptors with minimal side effect on cell proliferation: A timely challenge illustrated with GLP-1R and GPER. *Frontiers in Endocrinology*, *4*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00050>
- Gilligan, L. C., Rahman, H. P., Hewitt, A. M., Sitch, A. J., Gondal, A., Arvaniti, A., Taylor, A. E., Read, M. L., Morton, D. G., & Foster, P. A. (2017). Estrogen activation by steroid sulfatase increases colorectal cancer proliferation via GPER. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *102*(12), 4435–4447. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3716>
- González-Arenas, A., De la Fuente-Granada, M., Camacho-Arroyo, I., Zamora-Sánchez, C. J., Piña-Medina, A. G., Segura-Uribe, J., & Guerra-Araiza, C. (2019). Tibolone Effects on Human Glioblastoma Cell Lines. *Archives of Medical Research*, *50*(4), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.08.001>
- 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. (2012). Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER  $\alpha$  activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *BBA - Molecular Cell Research*, *1823*(2), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.004>
- Gonzalez De Valdivia, E., Broselid, S., Kahn, R., & Leeb-lundberg, L. M. F. (2017). G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1)/ GPR30 increases ERK1/2 activity through PDZ motif-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem*, *1*, 9932–9943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765875>

- Gonzalez, E., Sandén, C., Kahn, R., Olde, B., & Fredrik Leeb-Lundberg, L. M. (2019). Human G protein-coupled receptor 30 is N-glycosylated and N-terminal domain asparagine 44 is required for receptor structure and activity. *Bioscience Reports*, 39(2), 1–11. <https://doi.org/10.1042/BSR20182436>
- Grande, F., Occhuzzi, M. A., Lappano, R., Cirillo, F., Guzzi, R., Garofalo, A., Jacquot, Y., Maggiolini, M., & Rizzuti, B. (2020). Computational approaches for the discovery of gper targeting compounds. *Frontiers in Endocrinology*, 11(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00517>
- Gruber, C. et al. (2002). PRODUCTION AND ACTIONS OF ESTROGENS. *N Engl J Med*, 346(5), 340–352.
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2009). How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci*, 29(5), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.02.004>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., & Glass, C. K. (2010). Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Molecular Cell*, 38(4), 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>
- Hernández-Vega, A. M., & Camacho-arroyo, I. (2021). Crosstalk between 17 $\beta$ -Estradiol and TGF- $\beta$  Signaling Modulates Glioblastoma Progression. *Brain Sciences*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3390>
- Hernández-Vega, A. M., Del Moral-Morales, A., Zamora-Sánchez, C. J., Piña-Medina, A. G., González-Arenas, A., & Camacho-Arroyo, I. (2020). Estradiol Induces Epithelial to Mesenchymal Transition of Human Glioblastoma Cells. *Cells*, 9(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cells9091930>
- Hess, R. A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-52>
- Hirtz, A., Lebourdais, N., Rech, F., & Bailly, Y. et al. (2021). GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell

- Proliferation. *Cells*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells10123438>
- Huang, R., Li, J., Pan, F., Zhang, B., & Yao, Y. (2020). The activation of GPER inhibits cells proliferation, invasion and EMT of triple-negative breast cancer via CD151/miR-199a-3p bio-axis. *American Journal of Translational Research*, 12(1), 32–44.
- Ibrahim, M. M. H., Bheemanapally, K., Sylvester, P. W., & Briski, K. P. (2020). Sex differences in glucoprivic regulation of glycogen metabolism in hypothalamic primary astrocyte cultures: Role of estrogen receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111000>
- Image J. (2011). *Measuring Cell Fluorescence using ImageJ | Science Tech Blog on WordPress.com* (p. 2). <https://doi.org/https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>
- Innamorati, G., Gouill, C. Le, Balamotis, M., & Birnbaumer, M. (2001). The Long and the Short Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 13096–13103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009780200>
- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Sawamura, Y., Diserens, A., & Meir, E. G. Van. (1999). Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathology*, 479, 469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00536.x>
- Jala, V. R., Radde, B. N., Haribabu, B., & Klinge, C. (2012). Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC Cancer*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-624>
- Jin, F., Jin-Lee, H. J., & Johnson, A. J. (2021). Mouse Models of Experimental Glioblastoma. In D. W. (Ed.), *Gliomas* (p. 32). Exon Publications. <https://doi.org/https://doi.org/10.36255/exonpublications.gliomas.2021.chapter2>
- Jones, T. S., & Holland, E. C. (2012). Standard of care therapy for malignant glioma and its effect on tumor and stromal cells. *Oncogene*, 31(16), 1995–2006. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.398>
- Jovčevska, I. (2018). Sequencing the next generation of glioblastomas. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(4), 264–282. <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1462759>
- Jung, J. (2019). Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Cancer. *Toxicol. Res.*,



35(3), 209–214. <https://doi.org/doi.org/10.5487/TR.2019.35.3.209>

Kabat, G. C., Etgen, A. M., & Rohan, T. E. (2010). Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *19*, 2421–2428. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0658>

Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., Van Der Lee, R., Bessy, A., Chèneby, J., Kulkarni, S. R., Tan, G., Baranasic, D., Arenillas, D. J., Sandelin, A., Vandepoele, K., Lenhard, B., Ballester, B., Wasserman, W. W., Parcy, F., & Mathelier, A. (2018). JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D260–D266. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1126>

Khan, S. U., Ahemad, N., Chuah, L. H., Naidu, R., & Htar, T. T. (2020). G protein-coupled estrogen receptor-1: homology modeling approaches and application in screening new GPER-1 modulators. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *0*(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1844059>

Krakstad, C., Trovik, J., Wik, E., Engelsen, I. B., Werner, H. M. J., Birkeland, E., Raeder, M. B., Øyan, A. M., Stefansson, I., Kalland, K., Akslen, L., & Salvesen, H. (2012). Loss of GPER identifies new targets for therapy among a subgroup of ER a -positive endometrial cancer patients with poor outcome. *British Journal of Cancer*, *106*, 1682–1688. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.91>

Kulakovskiy, I. V., Vorontsov, I. E., Yevshin, I. S., Sharipov, R. N., Fedorova, A. D., Rumynskiy, E. I., Medvedeva, Y. A., Magana-Mora, A., Bajic, V. B., Papatsenko, D. A., Kolpakov, F. A., & Makeev, V. J. (2018). HOCOMOCO: Towards a complete collection of transcription factor binding models for human and mouse via large-scale ChIP-Seq analysis. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D252–D259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1106>

Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016a). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*, 783–797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>

Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016b). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 12, pp. 783–797). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>

- Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016c). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(12), 783–797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>
- Li, H., Lei, B., Xiang, W., Wang, H., Feng, W., Liu, Y., & Qi, S. (2017). Differences in protein expression between the U251 and U87 cell lines. *Turkish Neurosurgery*, 27(6), 894–903. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1>
- Li, Jia, Y., Bian, Y., Tong, H., Qu, J., Wang, K., & Wan, X. P. (2019). Autocrine motility factor promotes endometrial cancer progression by targeting GPER-1. *Cell Communication and Signaling*, 17(22), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0336-4>
- Li, Rena, Cui, J., & Shen, Y. (2014). Brain Sex Matters: Estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.018>
- Li, Rong, Wang, Y., Chen, P., Meng, J., & Zhang, H. (2021). Inhibiting endoplasmic reticulum stress by activation of G-protein-coupled estrogen receptor to protect retinal astrocytes under hyperoxia. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/jbt.22641>
- Li, Y., Birnbaumer, L., & Teng, C. T. (2010). Regulation of ERR $\alpha$  gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: Differential molecular mechanisms mediated by G protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. *Molecular Endocrinology*, 24(5), 969–980. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0148>
- Liu, H., Yan, Y., Wen, H., Jiang, X., Cao, X., Zhang, G., & Liu, G. (2014a). A novel estrogen receptor GPER mediates proliferation induced by 17 $\beta$ -estradiol and selective GPER agonist G-1 in estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-negative ovarian cancer cells. *Cell Biology International*. <https://doi.org/10.1002/cbin.10243>
- Liu, H., Yan, Y., Wen, H., Jiang, X., Cao, X., Zhang, G., & Liu, G. (2014b). A novel estrogen receptor GPER mediates proliferation induced by 17 $\beta$ -estradiol and selective GPER agonist G-1 in estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-negative ovarian cancer cells. *Cell Biology International*, 38(5), 631–638. <https://doi.org/10.1002/cbin.10243>
- Louis, David N, Ohgaki H., Wiestler O.D., C. W. . (2007). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System* (4th ed.). IARC.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. Von, Figarella, D., Webster, B.,

- Hiroko, K. C., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, *23*(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Luo, J., & Liu, D. (2020). Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00148>
- Madeo, A., & Maggiolini, M. (2010). Nuclear Alternate Estrogen Receptor GPR30 Mediates 17  $\beta$  -Estradiol – Induced Gene Expression and Migration in Breast Cancer – Associated Fibroblasts. *Cancer Research*, *70*(10), 6036–6046. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0408>
- Matteoni, S., Abbruzzese, C., Matarrese, P., Paggi, M. G., Villani, V., Malorni, W., & Pace, A. (2020). The influence of patient sex on clinical approaches to malignant glioma. *Cancer Letters*, *468*(October 2019), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.012>
- McKinley et al. (2000). The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg*, *93*, 932–939. <https://doi.org/https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.6.0932>
- Milligan, G., Canals, M., & Padiani, J. D. (2007). The Role of GPCR Dimerisation/Oligomerisation. *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, *2*, 145–161. <https://doi.org/10.1007/2789>
- Milo, G. E., Malarkey, W. B., Powell, J. E., Blakeslee, J. R., & Yohn, D. S. (1976). Effects of steroid hormones in fetal bovine serum on plating and cloning of human cells in vitro. *In Vitro*, *12*(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/BF02832789>
- Molina, L., Figueroa, C. D., Bhoola, K. D., & Ehrenfeld, P. (2017). GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *00*(00), 1–12.

<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1350264>

- Mungenast, F., & Thalhammer, T. (2014). Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *5*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00192>
- Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-sloan, J. S. (2021). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the. *Neuro-Oncology*, *23*, 1–105. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab200>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncology*, *19*(5), v1–v88. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>
- Patel, S., DiBiase, S., Meisenberg, B., Flannery, T., Patel, A., Dhople, A., Cheston, S., & Amin, P. (2012). Phase I clinical trial assessing temozolomide and tamoxifen with concomitant radiotherapy for treatment of high-grade glioma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *82*(2), 739–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.053>
- PDB, R. (n.d.). *RCSB PDB - Vista de características de proteína - Receptor de estrógeno acoplado a proteína G 1 - Q99527 (GPER1\_HUMAN)*. Retrieved November 14, 2019, from [http://www.rcsb.org/pdb/protein/Q99527?evtc=Suggest&evta=ProteinFeatureView&evtl=autosearch\\_SearchBar\\_querySuggest](http://www.rcsb.org/pdb/protein/Q99527?evtc=Suggest&evta=ProteinFeatureView&evtl=autosearch_SearchBar_querySuggest)
- Persano, L., Rampazzo, E., Basso, G., & Viola, G. (2013). Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochemical Pharmacology*, *85*(5), 612–622. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.001>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *9*(9), 2069–2082. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x>
- Plante, B. J., Lessey, B. A., Taylor, R. N., Wang, W., Bagchi, M. K., Yuan, L., Scotchie, J., Fritz, M. A., & Young, S. L. (2012). G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Expression in Normal and Abnormal Endometrium. *Reproductive Sciences*, *19*(7), 684–693. <https://doi.org/10.1177/1933719111431000>
- Poola, I., Abraham, J., Liu, A., Marshalleck, J. J., & Dewitty, R. L. (2008). The Cell Surface

- Estrogen Receptor , G Protein- Coupled Receptor 30 ( GPR30 ), is Markedly Down Regulated During Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 30, 65–78. <https://doi.org/10.4137/bcbcr.s557>
- Prossnitz, E. R., & Arterburn, J. B. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology . XCVII . G Protein – Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacological Reviews*, 127731, 505–540. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009712>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1–2), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002>
- Puchalski, R. B., & Al, E. (2018). An anatomic transcriptional atlas of human glioblastoma A. *Science*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Pupo, M., Bodmer, A., Berto, M., Maggiolini, M., Dietrich, P. Y., & Picard, D. (2017). A genetic polymorphism repurposes the G-protein coupled and membrane-associated estrogen receptor GPER to a transcription factor-like molecule promoting paracrine signaling between stroma and breast carcinoma cells. *Oncotarget*, 8(29), 46728–46744. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18156>
- Reifenberger, et al. (2017). Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nature Publishing Group*, 14(July 2017), 434–452. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.204>
- Revankar, C. M., Bologna, C. G., Pepermans, R. A., Sharma, G., Arterburn, J. B., Oprea, T. I., & Prossnitz, E. R. (2019). Article A Selective Ligand for Estrogen Receptor Proteins Discriminates Rapid and Genomic Signaling Article A Selective Ligand for Estrogen Receptor Proteins Discriminates Rapid and Genomic Signaling. *Cell Chemical Biology*, 26(12), 1692-1702.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.10.009>
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science*, 307(5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.11106943>
- Rich, J. N. (2016). Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*, 95(S1(e4764)), 1–7. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004764>
- Robertson, F. L., Marqués-Torrejón, M. A., Morrison, G. M., & Pollard, S. M. (2019).

- Experimental models and tools to tackle glioblastoma. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(9). <https://doi.org/10.1242/dmm.040386>
- Roque, C., Mendes-Oliveira, J., & Baltazar, G. (2019). G protein-coupled estrogen receptor activates cell type-specific signaling pathways in cortical cultures: relevance to the selective loss of astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 149(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/jnc.14648>
- Roque C, B. G. (2019). G protein-coupled estrogen receptor 1 ( GPER ) activation triggers different signaling pathways on neurons and astrocytes. *Neural Regen Res*, 14(12), 2069–2070. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262577>
- Rosano, C., Lappano, R., Santolla, M. F., Ponassi, M., Donadini, A., & Maggiolini, M. (2012). Recent Advances in the Rationale Design of GPER Ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 6199–6206. <https://doi.org/10.2174/092986712804485755>
- Rouhimoghadam, M., Lu, A. S., Salem, A. K., & Filardo, E. J. (2020). Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.591217>
- Ruan, S. Q., Wang, S. W., Wang, Z. H., & Zhang, S. Z. (2012). Regulation of HRG- $\beta$ 1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression. *Molecular Medicine Reports*, 6(1), 131–138. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.874>
- Salgado, R. M., Covarrubias, A. C., Favaro, R. R., Serrano-Nascimento, C., Nunes, M. T., & T.Zorn, T. M. (2013). Estradiol induces transcriptional and posttranscriptional modifications in versican expression in the mouse uterus. *J Mol Histol*, 44, 221–229. <https://doi.org/10.1007/s10735-012-9476-1>
- Samartzis, E. P., Noske, A., Meisel, A., Varga, Z., Fink, D., & Imesch, P. (2014). The G Protein-Coupled Estrogen Receptor ( GPER ) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer. *PLOS ONE*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083296>
- Samavat, H., & Kurzer, M. S. (2014). Estrogen metabolism and breast cancer. *CANCER LETTERS*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>
- Sareddy, G. R., Nair, B. C., Gonugunta, V. K., Zhang, Q. G., Brenner, A., Brann, D. W., Tekmal, R. R., & Vadlamudi, R. K. (2012). Therapeutic significance of estrogen

- receptor  $\beta$  agonists in gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(5), 1174–1182. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0960>
- Savage, K., Matchett, K. B., & Barros, E. M. (2014). BRCA1 Deficiency Exacerbates Estrogen-Induced DNA Damage and Genomic Instability. *Cancer Res*, 74, 2773–2784. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2611>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biol*, 11, 1–20. <https://doi.org/10.1098/rsob.20.0358>
- Sengupta, S., Pater, L. E., & Pomeranz, D. (2021). *Integration of Molecular Analysis , Cutting-edge Mouse Genetic Models and Proton Therapy to Improve Outcomes for Glioma Patients* (D. W (ed.)). Exon Publications. <https://doi.org/doi.org/10.36255/exonpublications.gliomas.2021>
- Sjo, M., & Nordenskjö, B. (2014). Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 145, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2936-4>
- Skrzypczak, M., Schüler, S., Latrich, C., Ignatov, A., Ortmann, O., & Treeck, O. (2013). G protein-coupled estrogen receptor (GPER) expression in endometrial adenocarcinoma and effect of agonist G-1 on growth of endometrial adenocarcinoma cell lines. *Steroids*, 78(11), 1087–1091. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.07.007>
- Stricker, R., Eberhart, R., Chevaller, M. C., Quinn, F. A., Bischof, P., & Stricker, R. (2006). Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT® analyzer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(7), 883–887. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.160>
- Tan, G., & Lenhard, B. (2016). TFBSTools: An R/bioconductor package for transcription

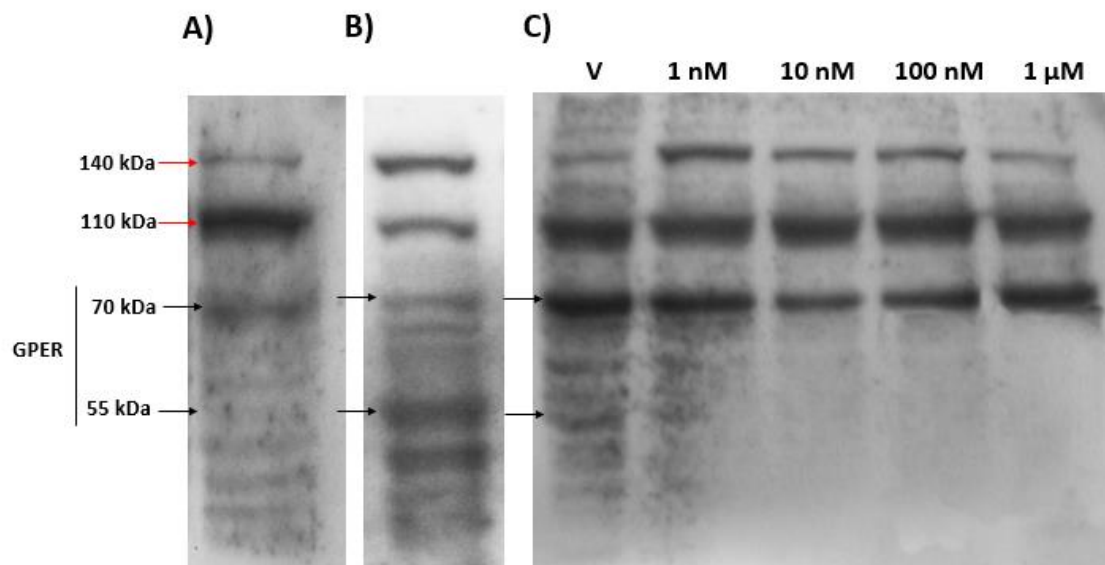
- factor binding site analysis. *Bioinformatics*, 32(10), 1555–1556.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw024>
- Tang, Z., Zhang, R., Lian, Z., Deng, S., & Yu, K. (2019). Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*, 30, 1–15.  
<https://doi.org/10.3390/cells8101123>
- Tavares, C. B., Das Chagas Sheyla Gomes-Braga, F., Sousa, E. B., Borges, U. S., Escórcio-Dourado, C. S., Da Silva-Sampaio, J. P., & Da Silva, B. B. (2018). Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 64(12), 1129–1133.  
<https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.12.1129>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- 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., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Vivacqua, A., Romeo, E., De Marco, P., De Francesco, E. M., Abonante, S., & Maggiolini, M. (2012). GPER mediates the Egr-1 expression induced by 17 $\beta$ -estradiol and 4-hydroxitamoxifen in breast and endometrial cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(3), 1025–1035. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1901-8>
- Vollmann-Zwerenz, et al. (2020). Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1932), 1–21.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21061932>
- Wan, S., Jiang, J., Zheng, C., Wang, N., Zhai, X., Fei, X., Wu, R., & Jiang, X. (2018). Estrogen nuclear receptors affect cell migration by altering sublocalization of AQP2 in glioma cell lines. *Cell Death Discovery*, 4(49), 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41420-018-0113-y>
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., DeCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y. H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E.,



- Zheng, S., Chang, E., Sauv , C. E. G., Olar, A., ... Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- Wang, X. S., Yue, J., Hu, L. N., Tian, Z., Zhang, K., Yang, L., Zhang, H. N., Guo, Y. Y., Feng, B., Liu, H. Y., Wu, Y. M., Zhao, M. G., & Liu, S. B. (2020). Activation of G protein-coupled receptor 30 protects neurons by regulating autophagy in astrocytes. *Glia*, 68(1), 27–43. <https://doi.org/10.1002/glia.23697>
- Yan, Y., Liu, H., Wen, H., Jiang, X., Cao, X., Zhang, G., & Liu, G. (2013). The novel estrogen receptor GPER regulates the migration and invasion of ovarian cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 378(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1579-9>
- Yang, H., Wang, C., Liao, H., & Wang, Q. I. (2021). Activation of GPER by E2 promotes proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by regulating the miR-124/CD151 pathway. *Oncology Letters*, 21, 1–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12693>
- Yu, T., Liu, M., Luo, H., Wu, C., Tang, X., Tang, S., Hu, P., Yan, Y., Wang, Z., & Tu, G. (2014). GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 $\beta$ -estradiol in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.003>
- Zhang, D., & Trudeau, V. L. (2006). Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling ☆. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144, 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.025>

## 12. ANEXO

### 12.1. Figuras suplementarias



**Figura suplementaria 1. Expresión de GPER en diferentes condiciones de cultivo.** Se presentan tres imágenes de WB de muestras obtenidas en diferentes condiciones de cultivo y en las que se determinó la expresión de las bandas inmunorreactivas a GPER. Se señalan bandas inmunorreactivas a un peso de 140 kDa y 110 kDa con flechas rojas, mientras que las bandas de 70 kDa y 55 kDa se señalan con flechas negras en las diferentes condiciones: a) DMEM con rojo de fenol y SFB con hormonas, b) DMEM sin rojo de fenol y SFB sin hormonas, y c) DMEM sin rojo de fenol, SFB sin hormonas y tratamientos con E2.

| <b>Características</b>              | <b>U251</b>                  | <b>U87</b>                | <b>LN229</b>                               | <b>T98G</b>               |
|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| Grado de malignidad                 | IV                           | IV                        | IV   | IV                        |
| Morfología                          | Pleomórfico/<br>astrocitoide | Epitelial                 | Epitelial                                  | Fibroblástica             |
| Localización anatómica de obtención | Lóbulo parietal              | /                         | corteza frontal parieto-occipital derecha. | /                         |
| Paciente (+)                        | Hombre, 75 años              | Hombre, edad desconocida  | Mujer, 60 años                             | Hombre, 61 años           |
| Propiedades de crecimiento          | Adherente                    | Adherente                 | Adherente                                  | Adherente                 |
| Genes mutados                       | TP53, EGFR, PTEN, NF1        | NF1, ATRX, PTEN, DEKN2A   | TP53, p16                                  | TP53, PTEN                |
| Vías alteradas                      | p53, pRb y PTEN              | p53, pRb y PTEN           | p53 y pRB                                  | p53, pRb y PTEN           |
| Subtipo molecular                   | Clásico/Proneural            | Mesenquimal/<br>Proneural | Proneural/<br>Mesenquimal                  | Proneural/<br>Mesenquimal |
| Tiempo de replicación               | 24 h                         | 30.6 h                    | 31 h                                       | 26.6 h                    |
| Tipo de línea celular **            | A1                           | A2                        | C  | A1                        |
| Tumorigénico                        | +                            | +                         | +  | -                         |
| Receptores a hormonas               | PR                           | +                         | +  | +                         |
|                                     | mPRs                         | +                         | +  | -                         |
|                                     | ER $\alpha$                  | +                         | +  | +                         |
|                                     | ER $\beta$                   | +                         | +  | +                         |
|                                     | GPER                         | +                         | +  | +                         |
|                                     | AR                           | +                         | +  | +                         |
|                                     | PRMGC2                       | +                         | +  | +                         |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>NOTAS</b> | (+) Paciente de origen del que se obtuvo el tumor  |
|              | /: No descrito   |
|              | Tumorigénico: Forma tumores en ratones.  |
|              | ** Tipo: Clasificación de las líneas celulares de acuerdo con el análisis del estatus de cuatro genes supresores de tumor:<br>A1: Células con mutaciones de TP53, PTEN y deleciones de p14ARF/p16<br>A2: Células con mutación de PTEN y deleción de p14ARF/p16<br>C: Células con mutación de TP53 y deleción de p14ARF/p16 |

**Tabla suplementaria 1. Características de las líneas celulares derivadas de glioblastoma.**