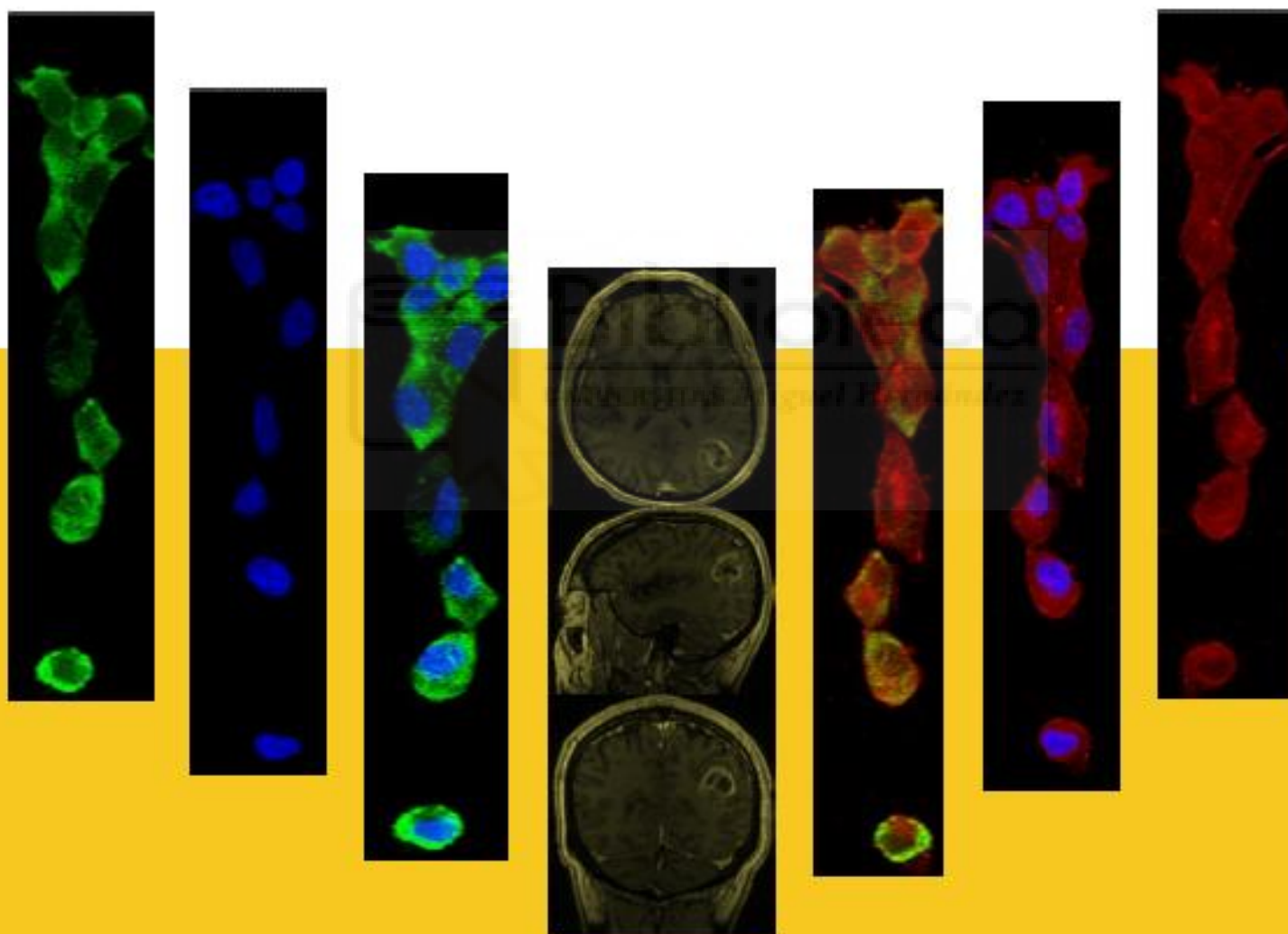


TESIS DOCTORAL

*Evaluación de los genes MGMT, SOCS1, y SOCS3
como marcadores moleculares de quimio y radiorresistencia
en modelos celulares de Glioblastoma humano*



Director
Miguel Saceda

Codirector
V́ctor Manuel Barberá

Maripaz Ventero Mart́n

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología
Sanitaria de Elche (IDiBE)

Evaluación de los genes *MGMT*, *SOCS1* y *SOCS3* como marcadores
moleculares de quimio y radorresistencia en modelos celulares de
glioblastoma humano

Tesis Doctoral

Maripaz Ventero Martín

Elche (Alicante), 2019



El presente trabajo es presentado junto con el artículo:

Ventero MP, Fuentes-Baile M, Quereda C, Perez-Valeciano E, Alenda C, Garcia-Morales P, et al. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. Calvo GF, editor. PLoS One. 2019;14: e0212581. doi:10.1371/journal.pone.0212581

empleado como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y con la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández.



Los doctores **Miguel Saceda Sánchez**, Investigador de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) y profesor asociado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche; y **Víctor Manuel Barberá Juan**, facultativo de la Unidad de Genética Molecular del Hospital General Universitario de Elche, y profesor asociado del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación titulado “Evaluación de los genes *MGMT*, *SOCS1* y *SOCS3* como marcadores moleculares de quimio y radioresistencia en modelos celulares de glioblastoma humano”, cuya autora es **Maripaz Ventero Martín**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Considerando que la presente tesis se halla concluida, **AUTORIZAN** su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que consten los efectos oportunos firman el presente certificado en Elche, a 17 de Abril de 2019.

Dr. Miguel Saceda

Dr. Víctor Manuel Barberá



Dr. Ricardo Mallavia Marín, Catedrático y Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral titulada “Evaluación de los genes *MGMT*, *SOCS1* y *SOCS3* como marcadores moleculares de quimio y radioresistencia en modelos celulares de glioblastoma humano.”, presentada por **Maripaz Ventero Martín** para optar al grado de Doctora.



Para que conste y surta a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 17 de Abril de 2019.

Fdo.: Dr. Ricardo Mallavia Marín

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor de mal pronóstico debido a su resistencia a la quimio y radioterapia. Los genes *SOCS1* y *SOCS3* se han asociado con la progresión tumoral y la respuesta al tratamiento en diferentes tipos de cánceres, entre ellos el GBM. En este trabajo, se han obtenido 6 líneas celulares pertenecientes al grupo de GBM IDH-nativo a partir de cultivos primarios procedentes de aspirados cerebrales de pacientes, sometidos a cirugías de resección en el Hospital General Universitario de Elche. Estas 6 líneas de GBM se caracterizaron según la actual clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los tumores del Sistema Nervioso Central, y se determinaron los valores de expresión de *SOCS1* y *SOCS3* a nivel de ARNm mediante qRT-PCR, y a nivel de proteína mediante inmunocitoquímica.

Ambos genes se encontraron sobreexpresados en las líneas celulares de GBM comparados con un *pool* de ARN de cerebro sano. Su expresión se silenció mediante ensayos de interferencia con ARNsi, y la disminución en la expresión de *SOCS3* produjo una mayor radiorresistencia en las líneas celulares de GBM establecidas, lo que sugiere que este gen juega un papel importante en la resistencia a la radioterapia. Además, la sobreexpresión endógena y a través de un promotor heterólogo (pCMV) del gen *SOCS3* provocó la radiosensibilización de la línea celular más resistente, reforzando la hipótesis de la implicación de *SOCS3* en la adquisición de radiorresistencia en GBM.

Por otro lado, se estudiaron los niveles de expresión de los genes *PTK6*, *MSK1*, y *NRF2*, relacionados con *SOCS3*, en dichas líneas celulares establecidas. Los resultados mostraron que el gen *PTK6* se encuentra sobreexpresado, el gen *MSK1* infraexpresado y el gen *NRF2* mantiene sus valores en las líneas celulares de GBM con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano. Además, la inhibición de la expresión de estos genes produjo un aumento en la radiorresistencia de las líneas celulares de GBM, indicando que es posible que dichos genes estén implicados en la respuesta a la radioterapia en GBM. También se estudiaron las relaciones existentes entre los genes *SOCS3*, *PTK6*, *NRF2* y *MSK1* en las líneas celulares de GBM. En este caso, se comprobó que el silenciamiento de los genes *SOCS3* y *NRF2* traía consigo la inhibición de la expresión de *MSK1*.

Por último, se potenció el efecto de la radioterapia en la línea celular más resistente mediante el pre-tratamiento con tricostatina A. Esta potenciación fue debida al aumento en la expresión de *SOCS3*, lo que pone de manifiesto el posible uso de *SOCS3* y de la vía de transducción de señal JAK/STAT como nueva fuente de dianas terapéuticas contra la resistencia a la radioterapia en GBM. Las interacciones entre *SOCS3*, *NRF2* y *MSK1*, y su relación con la radiorresistencia, sugieren la existencia de un mecanismo de resistencia a la radioterapia en GBM mediado por

MKS1. Esta tesis constituye el punto de partida de futuras investigaciones dirigidas a comprender la naturaleza de las relaciones entre estos genes y su implicación en la respuesta a la radioterapia.



Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is a poor prognosis type of tumour due to its resistance to chemo and radiotherapy. *SOCS1* and *SOCS3* have been associated with tumour progression and response to treatments in different kinds of cancers, including GBM. In this study, cell lines of *IDH*-wildtype GBMs from primary cultures were obtained, and the role of *SOCS1* and *SOCS3* in the response to radiotherapy was analysed. Fifty-two brain aspirates from GBM patients were processed, and six new cell lines of *IDH*-wildtype GBM were established. These were characterised according to the WHO classification of CNS tumours. *SOCS1* and *SOCS3* expression levels were determined, at the mRNA level by qRT-PCR, and at the protein level by immunocytochemistry. The results obtained showed that *SOCS1* and *SOCS3* are overexpressed in GBM, as compared to a non-tumoral brain RNA pool. *SOCS1* and *SOCS3* expression were reduced by siRNA treatment, and it was found that *SOCS3* inhibition increased radioresistance in GBM cell lines, suggesting a key role of *SOCS3* in the response to radiotherapy. Furthermore, overexpression of *SOCS3* under a heterologous promoter (pCMV), in a radiotherapy resistant GBM cell line increased its radiosensitivity, supporting an important implication of *SOCS3* in radiotherapy resistance acquisition.

Additionally, the expression levels of several genes related to *SOCS3* were analysed in these new cell lines. We found that the *PTK6* gene was overexpressed and the *MSK1* gene was repressed in these cell lines as compared to a non-tumoral brain RNA pool, whereas the *NRF2* gene kept their expression levels similar to those found in the non-tumoral brain RNA pool. Moreover, the downregulation of these genes by specific siRNA rendered the new cell lines of GBM more radioresistant, indicating that these genes are probably related to the radiotherapy response. Besides, the relationship between these genes were analysed, and the results showed that inhibition of *SOCS3* and *NRF2* caused a downregulation of *MSK1*.

Finally, the radiotherapy response was potentiated in the most radioresistant cell line by thricostatin A treatment due to an increase of *SOCS3* level expression. Thus, *SOCS3* and its signal transduction pathway (JAK/STAT) could be useful to unmask new putative target in order to improve radiotherapy response in GBM. Also, it would be interesting to address the interactions between *NRF2*, *SOCS3* and *MSK1* in GBM cells, because they could be involved in a new radioresistance mechanism mediated by *MKS1* expression.

*“La vida es una unión simbiótica y cooperativa
que permite triunfar a los que se asocian”*

Lynn Margulis

*“La ventura va guiando nuestras cosas
mejor de lo que acertáramos a desear”*

Don Quijote de la Mancha

Miguel de Cervantes



A mi familia, a los pequeños Neus y Jose, y a Valero.

Agradecimientos

Después de estos cuatro años, me cuesta creer que ya estemos al final de esta aventura, y digo aventura porque ha habido momentos en los que nos ha tocado superar más pruebas que a Indiana Jones en sus entretenidas películas, y uso el plural porque, aunque la tesis la defienda y la firme yo, habéis sido muchos los que habéis contribuido a que llegase este momento.

Normalmente, el inicio de una tesis doctoral suele ser algo meditado, y tanto el grupo de investigación como el doctorando se conocen con anterioridad, e incluso ya han realizado algunos proyectos juntos. En cambio, el inicio de esta tesis fue algo atropellado, imprevisto, y que seguro que no entraba en los planes de ninguno de mis directores de tesis. Aun así, los dos confiasteis en mí sin conocerme, y desde el día en el que decidisteis embarcaros en esto conmigo, no habéis dejado de poner todo vuestro empeño y esfuerzo en que esta tesis fuera para delante. Miguel y Víctor: muchísimas gracias a los dos, pero no sólo por darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis doctoral, sino también por todo lo que he aprendido de vosotros. Me habéis enseñado que todo siempre tiene un lado positivo, y habéis conseguido hacerme sentir capaz de seguir adelante en los momentos en los más me ha costado. Me guardo todas nuestras conversaciones sobre ciencia y sobre todo lo demás, vuestros consejos y vuestras críticas (incluso las que se refieren a lo dura que tengo la cabeza), y espero que aún nos queden muchas más. También, me gustaría extender este agradecimiento a Pilar García, ya que de ella aprendí la mayoría de las técnicas que se realizan en esta tesis doctoral. Gracias por tu paciencia y dedicación, y por dar conmigo los primeros pasos en el laboratorio del hospital.

Esta tesis se ha realizado a caballo entre el Hospital General Universitario de Elche y el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández, y en ambos sitios me he sentido como en casa desde el primer día. En el Hospital, esto ha sido posible gracias a Isa, Adela, José Luis, Chari y Alan que me han ayudado siempre que lo he necesitado. En el IBMC, ha sido gracias a María que me acogió desde el primer momento, y nunca le ha faltado tiempo para enseñarme a utilizar todos los aparatos que he ido necesitando. Gracias por todo lo que hemos compartido. Mencionar también a Eli, hemos coincidido poco tiempo, pero estoy segura de que no podría dejar a los cultivos en mejores manos.

La Unidad de Oncología Radioterápica (ERESA) del Hospital de Elche también ha jugado un papel fundamental en la consecución de esta Tesis. Gracias a la Fundación ERESA por habernos concedido una de sus becas, y gracias a los radiofísicos Pilar Dorado, Danilo y Domingo por haberse prestado a realizar los tratamientos de radioterapia sobre las líneas celulares de GBM. Pilar, cada vez que bajaba por allí conseguías alegrarme la mañana, y lo que es aún más difícil la tarde también. Siempre estabas preparada con una sonrisa para achicharrar un poco a mis celullillas, y recordarme que así empiezan

muchas pelis de miedo. Danilo gracias por el tiempo que has dedicado en inventar nuevas formas de irradiar a las células, siempre en pro del mayor rigor científico.

Durante la última etapa, también he pasado mucho tiempo en el Hospital General Universitario de Alicante. Pasar este año aquí ha sido una experiencia muy enriquecedora, sobre todo por las personas que he conocido en el LAI. Araceli gracias por echarme una mano desde que llegué, tu capacidad de esfuerzo y trabajo me parecen increíbles, y no dudo que llegarás muy lejos en el mundo de la Investigación. Ana y Jessy hay momentos que marcan y creo que nuestro episodio con la centrifuga fue uno de ellos, gracias a las dos por hacérmelo todo más fácil. Mi llegada a este hospital fue posible gracias a Cristina Alenda que me abrió las puertas del LAI y me apoyó en todo momento. Admiro muchísimo tu carácter resolutivo, y tu disposición siempre positiva a ayudarme con cualquier cosa de las que te he pedido. Gracias también, a Juan Carlos Rodríguez por confiar en mi para sus nuevos proyectos, y por darme la oportunidad de seguir creciendo como Investigadora. Ya sabemos que la vida es dura, pero con tu talante se lleva mejor.

Creo que el gusanillo por la investigación siempre lo he tenido escondido por alguna parte, pero he de reconocer que gracias al Doctor José Martín Nieto me planteé seriamente tomar el camino de la Investigación. Pepe, gracias por haber visto en mí una futura Investigadora, y sobre todo por hacer que me lo creyera. Aunque, sería injusto atribuirte todo el mérito de embarcarme en esta profesión (¿forma de vida?), ya que también han puesto su granito de arena las dos ya doctoras Carmen y Mary Luz, y la que está por venir, Cristina Quereda. No puedo pasar sin agradecerlos todos los ratos que hemos compartido en ese laboratorio tan pequeñín, y el volver a recordar cómo se monta en bici.

Aunque en realidad todo esto empezó intentando arreglar el mundo con Irene, otra que dentro de nada será doctora también. Siempre pensamos que no estaríamos tan locas como para hacer una tesis doctoral, y menos mal que si lo hemos estado. Y como no, en la cafetería de la Facultad de Ciencias buscándole la explicación a la cuadratura del círculo (o jugando a las cartas) con Rosa, Olga y Jorge. Gracias por vuestra amistad, y por entender mis ausencias en estos años.

Y llegando al final, siempre toca mirar hacia el principio. El punto de partida a esta tesis lo dio el apoyo incondicional de mi familia. Tengo que agradecerlos el haberme educado en la cultura del esfuerzo, el haber confiado siempre en mis posibilidades y en mi criterio, y el haber dado alas siempre a mis objetivos. Gracias a mi padre, y (copio) “a las mujeres de mi vida”, mi madre, mis tías y mi abuela, todas habéis sido un espejo de valores en el que mirarme, y a mi hermana porque eres el mejor ejemplo de superación y trabajo que he podido tener. Y por último a Valero, has sido el que más de cerca has recorrido este camino conmigo, el que más has aguantado los malos ratos, y con el que más he ido celebrando los pequeños triunfos. Gracias por sentir todo esto como si también fuera tuyo.

Abreviaturas y acrónimos

°C	Grado centígrado	FBS	Suero fetal bovino
μl	Microlitro	FC	<i>Fold change</i>
μm	Micra	GAPDH	Proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
μM	Micromolar	GBM	Glioblastoma multiforme
2-HG	2-Hidroxiglutarato	GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
α-KG	α-cetoglutarato	Gy	Gray
aa	Aminoácido	h	Hora
ADN	Ácido deoxirribonucleico	HDAC	Histona deacetilasa
ADNc	ADN complementario	HGUA	Hospital General Universitario de Alicante
AF	Alexa Flúor	HGUE	Hospital General Universitario de Elche
ARNm	ARN mensajero	IDH1	Isocitrato deshidrogenasa I
ARN	Ácido ribonucleico	IDH2	Isocitrato deshidrogenasa II
ARNdc	ARN de doble cadena	iHDAC	Inhibidores de HDAC
BCL3	Célula B linfoma 3	IL-6	Interleuquina 6
BCNU	Bis-cloroetilnitrosourea	IR	Irradiada
CEIC	Comité Ético de investigación Clínica	ISABIAL	Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante.
CIMP	Fenotipo hipermetilador	JAK	Quinasa Janus.
CISH	Citoquina inducible que contiene un dominio SH2.	kDa	KiloDalton
Ct	<i>Threshold cycle</i>	KEAP1	<i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>
CTR	Control	KIR	Región inhibidora de quinasa
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	MGMT	Proteína O-6 metilguanina ADN metiltransferasa
DMEM/F12	Medio de Eagle modificado por Dulbecco/Mezcla de nutrientes F12	λ	Longitud de onda
DMSO	Dimetilsulfóxido.	ml	Mililitro
DPBS	Tampón fosfato salino.	MSK1	Quinasa activada por mitógenos y estrés 1
EL	Tampón de lisis de eritrocitos	MSK	Quinasa activada por mitógenos y estrés
ROS	Especies reactivas de oxígeno	MS- MLPA	Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples específica de metilación
ESS	Secuencia extendida de SH2.		

Abreviaturas y acrónimos

MS-PCR	PCR específica de metilación	s	Segundo
ng	Nanogramo	SH2	Dominio homólogo de src 2
nm	Nanómetro	ARNsi	ARN pequeño de interferencia
nM	Nanomolar	ARNsi.MSK1	ARNsi específico del gen <i>MSK1</i>
NRF2	Factor nuclear derivado de eritrocito 2	ARNsi.NRF2	ARNsi específico del gen <i>NRF2</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud	ARNsi.NS	ARNsi inespecífico
ORF	<i>Open reading frame</i>	ARNsi.PTK6	ARNsi específico del gen <i>PTK6</i>
pb	Par de bases	ARNsi.SOCS1	ARNsi específico del gen <i>SOCS1</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	ARNsi.SOCS3	ARNsi específico del gen <i>SOCS3</i>
PDK-1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1	SNC	Sistema nervioso central.
PDK-2	Piruvato deshidrogenasa quinasa 2	SOCS	Proteínas supresoras de la señalización por citoquinas
PFA	Paraformaldehído	T_a	Temperatura ambiente
PI3K	Fosfoinositol- 3 quinasa	TAC	Tomografía axial computerizada
PIAS	Proteínas inhibidoras de STAT	TBE	Tris-Borato-EDTA
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato	TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato	TERT	Telomerasa retrotranscriptasa inversa
PTEN	Proteína fosfatasa homóloga a la tensina	TMA	Microarray de tejidos
PTK6	Proteína quinasa 6	TMZ	Temozolomida
PTP	Proteína tirosina-fosfatasa	TRK	Receptores tirosina-quinasa.
q-PCR	PCR cuantitativa	TSA	Tricostatina A
Rb	Retinoblastoma		
RISC	Complejo de inducción de silenciamiento		
RQ	Cuantificación relativa		

Lista de figuras

Figura 1.1: Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en hombres (A) y mujeres (B).

Figura 1.2: Marcas identificativas de las células tumorales.

Figura 1.3: Señales emergentes y características habilitantes necesarias para obtener los rasgos de las células tumorales.

Figura 1.4: Clasificación de los tumores cerebrales y del SNC.

Figura 1.5: Clasificación de los GBMs según Verhaak.

Figura 1.6: Esquema de las reacciones asociadas al TCA, especificando las nuevas funciones las proteínas de IDH1 e IDH2 mutadas.

Figura 1.7: Mecanismo de acción de la proteína MGMT.

Figura 1.8: Mecanismos inducidos por la activación de la proteína p53.

Figura 1.9: Imágenes de un GBM obtenidas mediante resonancia magnética.

Figura 1.10: Secciones histológicas de un GBM con diferentes tinciones.

Figura 1.11: Imágenes de resonancia magnética de la progresión de un GBM.

Figura 1.12: Mecanismo de represión y liberación del factor transcripcional *NRF2*.

Figura 1.13: Papel dual de la proteína *NRF2* en la carcinogénesis.

Figura 1.14: Vía de transducción *PTEN/P3IK/AKT*.

Figura 1.15: Ruta *JAK/STAT*.

Figura 1.16: Estructura y función de las proteínas *SOCS*.

Figura 1.17: Esquematización de la estructura de los genes *SOCS1* (A) y *SOCS3* (B).

Figura 1.18: Inhibición de la ruta *JAK/STAT* por las proteínas *SOCS1* y *SOCS3*.

Figura 3.1: Herramientas para la obtención de cultivos primarios.

Figura 3.2: Sistematización del mantenimiento de los cultivos primarios.

Lista de Figuras

Figura 3.3: Esquema del procedimiento de aislamiento de ADN total.

Figura 3.4: Esquema del procedimiento de aislamiento de ARN total.

Figura 3.5: Esquema del protocolo de PCR para los tres genes estudiados.

Figura 3.6: Reacción de secuencia.

Figura 3.7: Esquema de la técnica MS-MLPA.

Figura 3.8: Extracto de la secuencia del gen *MGMT*.

Figura 3.9: Secuencia del gen *SOCS1*.

Figura 3.10: Esquema de la técnica MS-PCR.

Figura 3.11: Representación de las regiones con posibles Islas CpG (parte superior del gráfico) y extracto de la secuencia de *SOCS1* (parte inferior de gráfico).

Figura 3.12: Representación de las regiones con posibles islas CpG (parte superior del gráfico) y extracto de la secuencia de *SOCS3* (parte inferior de gráfico).

Figura 3.13: Localización de las islas CpG interrogadas mediante las dos técnicas utilizadas: MS-MLPA y MS-PCR en la secuencia del gen *SOCS1*.

Figura 3.14: Protocolo de PCR para los genes *SOCS1* y *SOCS3*.

Figura 3.15: Protocolo de la reacción de q-PCR.

Figura 3.16: Ecuaciones para el análisis de los datos de q-PCR.

Figura 3.17: Proceso de silenciamiento génico mediante ARNsi.

Figura 3.18: Perfil de viabilidad de una de las líneas de GBM obtenido a través de analizador celular Muse® (Merck Millipore).

Figura 3.19: Perfil del ciclo celular de una de las líneas celulares de GBM control obtenida a través del analizador celular Muse® (Merck Millipore).

Figura 4.1: Cultivos primarios de GBM en pases tempranos.

Figura 4.2: Líneas celulares de GBM.

Figura 4.3: Inmunodetección de la proteína GFAP, utilizada como marcador de astrocitos.

Figura 4.4: Electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los genes *IDH1* (a la izquierda de la imagen) e *IDH2* (a la derecha de la imagen).

Figura 4.5: Electroferogramas obtenidos de la secuenciación del promotor del gen *TERT*.

Figura 4.6: Inmunodetección de las proteínas p53 y PTEN mediante la técnica de Estreptavidina-Biotina.

Figura 4.7: Respuesta de las líneas celulares de GBM al BCNU.

Figura 4.8: Estado de metilación del promotor del gen *MGMT* a partir de los valores obtenidos mediante la técnica MS-MLPA en las líneas celulares de GBM establecidas.

Figura 4.9: Gráficas de viabilidad de las líneas celulares de GBM después 72 h de tratamiento radioterápico.

Figura 4.10: Efecto del tratamiento radioterápico sobre las distintas fases del ciclo celular en las líneas de GBM: HGUE GB 16 (A), HGUE GB 37 (B), HGUE GB 39 (C), HGUE GB 40 (D), HGUE GB 42 (E) y HGUE GB 48 (F).

Figura 4.11: Ecuación para el cálculo del efecto de la radioterapia.

Figura 4.12: Efecto neto de la radioterapia sobre las líneas celulares de GBM establecidas.

Figura 4.13: Gráfico que representa los valores de metilación del promotor del gen *SOCS1* obtenidos mediante la técnica MS-MLPA en las líneas celulares de GBM establecidas.

Figura 4.14: Análisis de la metilación de dos islas CpG del gen *SOCS1* mediante MS-PCR seguida de electroforesis en gel de agarosa.

Figura 4.15: Análisis de la metilación de dos islas CpG del gen *SOCS3* mediante MS-PCR seguida de electroforesis en gel de agarosa.

Figura 4.16: Estudio de la expresión del gen *SOCS1* (A) y *SOCS3* (B) a nivel de ARNm en las líneas celulares establecidas de GBM.

Lista de Figuras

Figura 4.17: Inmunolocalización de las proteínas SOCS1 y SOCS3 en las líneas celulares establecidas de GBM.

Figura 4.18: Valores de RQ de los genes *SOCS1* y *SOCS3* 24 h post-irradiación en las líneas celulares de GBM.

Figura 4.19: Valores de RQ de los genes *SOCS1* y *SOCS3* obtenidos a partir de los ciclos temporales post-irradiación (A) y de los estudios de exposición a diferentes dosis de radioterapia (B) en las líneas celulares HGUE GB 39 y HGUE GB 42.

Figura 4.20: Poblaciones clonales obtenidas de la línea celular HGUE GB 39.

Figura 4.21: Efecto de la radioterapia sobre la línea celular HGUE GB 39 y las 5 poblaciones clonales obtenidas a partir de ella.

Figura 4.22: Expresión basal a nivel de ARNm de los genes *SOCS1* (A) y *SOCS3* (B), en la línea celular HGUE GB 39, y en las poblaciones clonales 4,6,7,8 y 10.

Figura 4.23: Efecto de la radioterapia y niveles de expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en la línea celular HGUE GB 42, y la población clonal 4B.

Figura 4.24: Efecto de la radioterapia sobre el ciclo celular (A) y la expresión del gen *SOCS3* (B) en la línea celular HGUE GB 39 y las poblaciones clonales.

Figura 4.25: Efecto de la transfección del ARNsi.*SOCS1* a nivel de ARNm (A), y sobre la distribución del ciclo celular (B y C).

Figura 4.26: Efecto de la transfección del ARNsi.*SOCS3* a nivel de ARNm (A), y sobre la distribución del ciclo celular (B y C).

Figura 4.27: Resultado del estudio de relación entre los genes *SOCS1* y *SOCS3*.

Figura 4.28: Efecto de la transfección con el plásmido sintético (pCMVh) sobre la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm (A) y en el ciclo celular (B) en la línea celular de GBM HGUE 39.

Figura 4.29: Estudio de la expresión del gen *PTK6* a nivel de ARNm en las líneas celulares de GBM establecidas.

Figura 4.30: Estudio de la expresión de los genes *NRF2* (A) y *MSK1* (B) a nivel de ARNm en las líneas celulares de GBM.

Figura 4.31: Efecto de la transfección del ARNsi.*PTK6* a nivel de ARNm, y sobre la distribución del ciclo celular.

Figura 4.32: Efecto de la transfección del ARNsi.*NRF2* a nivel de ARNm, y sobre la distribución del ciclo celular.

Figura 4.33: Efecto de la transfección del ARNsi.*MSK1* a nivel de ARNm, y sobre la distribución del ciclo celular.

Figura 4.34: Relaciones de expresión entre los genes *SOCS3*, *PTK6*, *NRF2* y *MSK1*.

Figura 4.35: Efecto del pretratamiento con TSA sobre la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm (A) y sobre el ciclo celular (B).

Figura 4.36: Modulación en la expresión de *SOCS3* causada por el pretratamiento con TSA y el ARNsi específico de este gen (A). Análisis del ciclo celular de las muestras de la línea celular HGUE GB 39 (B).

Figura 5.1: Interacciones de las ROS con las distintas vías de transacción de señal a través de las cuales promueven la tumorigénesis.

Lista de tablas

Tabla 1.1: Principales características identificativas del GBM de tipo primario y secundario.

Tabla 3.1: Anticuerpos primarios utilizados para el análisis de proteínas mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia.

Tabla 3.2: Anticuerpos secundarios utilizados para el análisis de proteínas mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia.

Tabla 3.3: Cebadores utilizados para la reacción de amplificación de *IDH1*, *IDH2*, y *TERT*, y el tamaño del fragmento amplificado con cada pareja de cebadores.

Tabla 3.4: Criterios para determinar el estado de metilación global del promotor de *MGMT* y *SOCS1*.

Tabla 3.5: Cebadores utilizados en la técnica de MS-PCR para analizar el estado de metilación de cada una de las islas CpG analizadas.

Tabla 3.6: Referencias de los ensayos prediseñados *TaqMan* utilizados para estudiar la expresión de los genes *SOCS1*, *SOCS3*, *NRF2*, *PTK6* y *MKS1*.

Tabla 4.1: Valores de metilación obtenidos para cada línea celular mediante la técnica MS-MLPA.

Tabla 4.2: Clasificación de las líneas celulares de GBM según su sensibilidad a la radioterapia.

Índice

Capítulo 1

Introducción	1
1.1 La patología del cáncer	3
1.1.1 El cáncer como un problema de salud mundial	3
1.1.2 Alteraciones genéticas, metabólicas y fisiológicas asociadas al proceso tumoral	5
1.2 Tumores cerebrales o del SNC	9
1.2.1 Epidemiología y clasificación	9
1.2.2 Factores de riesgo	11
1.3 Tumores neuroepiteliales: GBM	11
1.3.1 Clasificación del GBM	13
1.3.2 Principales marcadores moleculares asociados al diagnóstico y/o pronóstico en GBM	17
1.3.2.1 Mutaciones en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	17
1.3.2.2 Mutaciones en el promotor del gen <i>TERT</i>	18
1.3.2.3 Metilación de promotor del gen <i>MGMT</i>	19
1.3.2.4 Mutaciones en los genes <i>TP53</i> y <i>PTEN</i>	20
1.3.3 Diagnóstico y tratamiento	21
1.3.4 Resistencia al tratamiento quimio y radioterápico en GBM	24
1.4 Rutas de transducción alteradas en GBM	26
1.4.1 Ruta PI3K-AKT	26
1.4.2 Ruta JAK/STAT	27
1.4.2.1 Familia de proteínas SOCS	29
1.4.2.2 Expresión génica y función de las proteínas <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	30
1.4.2.3 Implicación de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> en la carcinogénesis y el proceso tumoral	33
Capítulo 2	
Objetivos	35
2.1 Objetivo general	37
2.2 Objetivos específicos	37
Capítulo 3	
Materiales y métodos	39
3.1 Cultivo celular	41

3.1.1 Establecimiento y mantenimiento de cultivos primarios de GBM	41
3.1.2 Recogida y almacenamiento de muestras de los cultivos primarios de GBM	43
3.1.2.1 Criopreservación	43
3.1.2.2 Muestras de ácidos nucleicos	44
3.1.3 Siembra de las líneas celulares establecidas a partir de los cultivos primarios de GBM para la realización de los ensayos posteriores	44
3.2 Extracción de ácidos nucleicos	45
3.2.1 Extracción de ADN total	45
3.2.2 Extracción de ARN total	46
3.3 Ensayos inmunocitoquímicos	47
3.3.1 Microscopia óptica	47
3.3.2 Microscopía confocal de inmunofluorescencia	48
3.3.2.1 Fijación e inmunotinción de las muestras	48
3.3.2.2 Observación de las muestras mediante microscopía confocal	50
3.4 Ensayos moleculares	50
3.4.1 Secuenciación Sanger	50
3.4.2 Metilación de promotores	53
3.4.2.1 MS-MLPA	53
3.4.2.2 MS-PCR	57
3.4.3 Estudio de expresión génica mediante qRT-PCR	62
3.4.3.1 Reacción de retrotranscripción	62
3.4.3.2 q-PCR	63
3.5 Ensayos celulares	65
3.5.1 Tratamiento quimioterapéutico	65
3.5.2 Tratamiento radioterápico	66
3.5.3 Alteración de la expresión génica	66
3.5.3.1 ARN de interferencia	66
3.5.3.2 Plásmido de sobreexpresión	68
3.5.3.3 Tratamiento con tricostatina A (TSA)	69
3.6 Evaluación del efecto de los tratamientos	69
3.6.1 Estudio de la viabilidad celular	69
3.6.2 Estudio del ciclo celular	70
3.7 Análisis estadístico	71

Capítulo 4

Resultados	73
4.1 Obtención y caracterización del modelo de estudio: líneas de celulares procedentes de cultivos primarios de GBM	75
4.1.1 Caracterización celular y morfológica	75
4.1.2 Caracterización según la clasificación actual de los tumores del SNC de la OMS	78
4.2 Quimioterapia y su relación con el gen <i>MGMT</i>	80
4.2.1 Efecto del BCNU sobre los cultivos primarios de GBM	81
4.2.2 Metilación del promotor del gen <i>MGMT</i>	81
4.2.3 Expresión del gen <i>MGMT</i> a nivel de ARNm, y correlación con el grado de metilación de su promotor	83
4.3 Radioterapia y su relación con los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	83
4.3.1 Efecto de la radioterapia en las líneas celulares de GBM	84
4.3.2 Estudio de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> en las líneas celulares de GBM establecidas y su relación en la radiorresistencia	89
4.3.2.1 Metilación de los promotores de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	89
4.3.2.2 Expresión basal a nivel de mRNA de los genes <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i>	91
4.3.2.3 Expresión basal a nivel de proteína de los genes <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i>	92
4.3.2.4 Correlación de los niveles basales de expresión de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> con el grado de radiorresistencia observado en las líneas celulares de GBM establecidas	94
4.3.3 Efecto de la radioterapia sobre la expresión de <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	95
4.3.3.1 Estudio del efecto de la radioterapia a diferentes tiempos y dosis sobre la expresión de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	95
4.3.3.2 Creación de un modelo de radiorresistencia para estudiar el efecto la radioterapia sobre la expresión de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	96
4.3.4 Efecto de la alteración de la expresión de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> sobre la radiorresistencia de las líneas celulares de GBM	100
4.3.4.1 Reducción de la expresión de <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> mediante ARNsi	101
4.3.4.2 Regulación recíproca de la expresión de <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	103
4.3.4.3 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>SOCS3</i> sobre la radioterapia	103
4.4 Implicación de otros genes relacionados con <i>SOCS3</i> o con la respuesta a la radioterapia en la radiorresistencia de las líneas células de GBM establecidas	104
4.4.1 Expresión basal de los genes <i>PTK6</i> , <i>MSK1</i> y <i>NRF2</i> en las líneas celulares de GBM establecidas	105
4.4.2 Asociación de los genes <i>PTK6</i> , <i>NRF2</i> y <i>MSK1</i> con la resistencia a la radioterapia	106

4.4.3 Efecto de la reducción de la expresión a nivel de ARNm de los genes <i>PTK6</i> , <i>NRF2</i> y <i>MSK1</i> en la resistencia a la radioterapia	107
4.4.4 Asociación entre los niveles de expresión a nivel de ARNm de los genes <i>SOCS3</i> , <i>PTK6</i> , <i>NRF2</i> y <i>MSK1</i>	109
4.5 Uso del TSA como posible potenciador de la radioterapia	111
Capítulo 5	
Discusión	115
5.1 Establecimiento y caracterización de las líneas celulares obtenidas a partir de los cultivos primarios de GBM	117
5.2 Respuesta de las líneas celulares de GBM establecidas a la quimioterapia y su relación con la metilación y expresión del gen <i>MGMT</i>	119
5.3 Genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> y radioterapia	120
5.3.1 Evaluación de la respuesta a la radioterapia en las líneas celulares de GBM establecidas	120
5.3.2 Correlación entre la metilación y expresión de los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> y la radorresistencia en las líneas celulares de GBM	121
5.3.3 Análisis de las alteraciones ejercidas por la exposición al tratamiento radioterápico en los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i>	123
5.3.4 Adquisición de radorresistencia mediada por los genes <i>SOCS1</i> y <i>SOCS3</i> en las líneas celulares de GBM	125
5.4 Relación de otros genes con <i>SOCS3</i> y con la respuesta a la radioterapia	126
5.4.1 Expresión e interferencia del gen <i>PTK6</i> a nivel de ARNm en GBM	127
5.4.2 Expresión e interferencia del gen <i>NRF2</i> a nivel de ARNm en GBM	128
5.4.3 Expresión e interferencia del gen <i>MSK1</i> a nivel de ARNm en GBM	129
5.4.4 Relaciones entre los genes <i>SOCS3</i> , <i>PTK6</i> , <i>MSK1</i> y <i>NRF2</i>	130
5.5 Potenciación de la radioterapia mediante el TSA	131
5.6 Proyecciones futuras	133
Capítulo 6	
Conclusiones	135
Bibliografía	139
Anexo I	161

Capítulo 1

Introducción



1.1 La patología del cáncer

El término “cáncer” fue utilizado por primera vez por Hipócrates para definir unas lesiones que aparecían en la piel o el estómago de algunos pacientes, y que se extendían a lo largo del cuerpo asemejando a las patas de un cangrejo, por ello lo denominó *karkinos* (palabra que en griego significa cangrejo). A partir de la cual, derivó el término que hoy en día utilizamos para dar nombre a esta patología [1] .

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera “Cáncer” como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Además, señala que una característica que define al cáncer es la multiplicación rápida de células anormales, que se extienden más allá de sus límites habituales invadiendo partes adyacentes del cuerpo o propagándose a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis, y que es la principal causa de muerte por cáncer. Profundizando un poco más en la biología del cáncer, se puede considerar como una enfermedad del genoma, puesto que todos los tipos de tumores portan mutaciones en su material genético que provocan profundos efectos en la biología de las células cancerosas, y que conducen al crecimiento tumoral. La mayoría de estas mutaciones suelen conllevar la inactivación de genes supresores de tumores, o la activación de proto-oncogenes [2].

1.1.1 El cáncer como un problema de salud mundial

En la actualidad, el cáncer es la patología con mayores tasas de incidencia (número de casos nuevos), morbilidad (número de afectados) y mortalidad (número de fallecimientos). Se estima que de forma global, se diagnostican 14 millones de nuevos casos, y ocurren 8 millones de muertes relacionadas con esta patología al año. En Europa, el número de casos nuevos de cáncer es aproximadamente de 3,5 millones cada año, y el número de muertes asociadas es superior a 1,5 millones [3–5]. En España, según el Instituto Nacional de Estadística, en el año 2016 fallecieron 113.000 personas por causa de un proceso tumoral siendo la segunda causa de muerte, solo superada por las enfermedades del sistema circulatorio que causaron un total de 120.000 muertes. Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos fueron el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal, seguidos a una gran distancia del cáncer de páncreas,

Introducción

mama y próstata. La supervivencia de los pacientes con cáncer en nuestro país es similar a la del resto de los países de nuestro entorno, situándose en España en un 53% a los 5 años (Red Española de Registros de Cáncer).

En la **Figura 1.1** se muestra la incidencia y mortalidad de los 15 tipos de cánceres más habituales, separados por sexo. En varones, los cánceres más comunes son los de pulmón, próstata y colorrectal. En mujeres, en cambio, los más frecuentes son el de mama, el colorrectal y el de cuello uterino. Los cánceres que presentan una mayor tasa de mortalidad son los cánceres de páncreas e hígado siendo superior al 90% en ambos sexos, y no coincidiendo con los tipos de cáncer que tienen una mayor incidencia (**Figura 1.1**). Los procesos neoplásicos que afectan al sistema nervioso central (SNC) ocupan posiciones muy bajas en cuanto a incidencia. No obstante, poseen tasas de mortalidad muy altas, superiores al 70% en ambos sexos. Por lo tanto, aunque son tumores poco frecuentes, son muy agresivos y suelen conllevar la muerte del paciente [7,8].

Las cifras económicas relativas a esta patología también generan preocupación en los diferentes órganos gubernamentales a nivel global, puesto que el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con cáncer supone un importante gasto sanitario que continuará aumentando. En el año 2010, el impacto económico anual del cáncer se estimó en aproximadamente 90.000 millones de euros [2].

Por último, es necesario señalar que entre el 30% y el 50% de los cánceres actuales se podría evitar limitando la exposición a los principales factores de riesgo, e implementando estrategias de prevención. El consumo de tabaco y alcohol, así como el sobrepeso causado por una mala dieta, la falta de actividad física o la contaminación ambiental son factores que aumentan el riesgo de padecer cáncer. También, es importante tener en cuenta que un 15% de los nuevos casos de cáncer son causados por infecciones víricas. Por ello, un programa de vacunación adecuado contra el Virus del Papiloma Humano y el Virus de la Hepatitis B, podría reducir en 1 millón los nuevos pacientes con cáncer cada año [9].

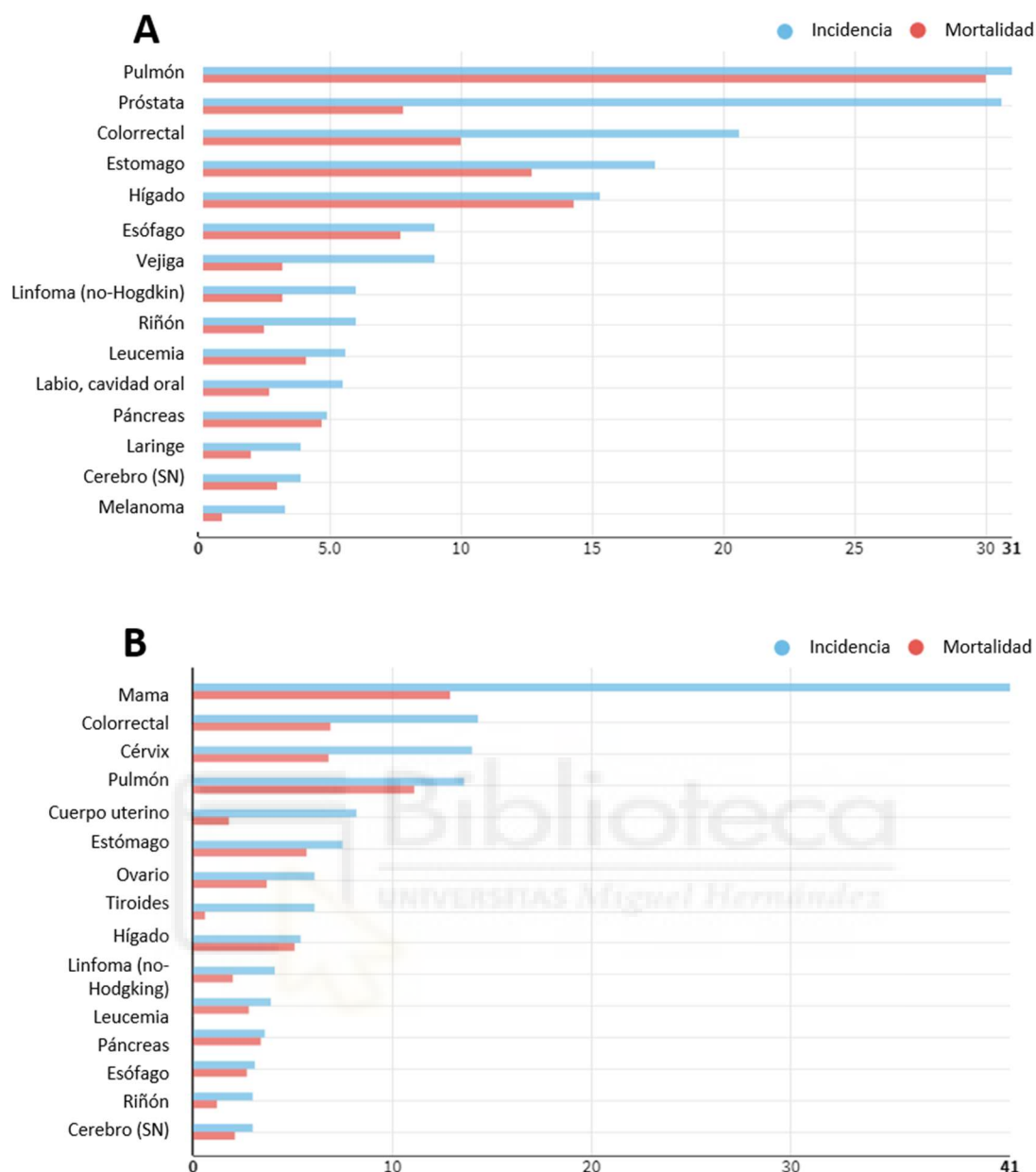


Figura 1.1: Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en hombres (A) y mujeres (B). Se muestran los 15 tipos de neoplasias más frecuentes a nivel mundial [5].

1.1.2 Alteraciones genéticas, metabólicas y fisiológicas asociadas al proceso tumoral

Las células tumorales se desarrollan a partir de células propias de nuestro organismo. Este cambio progresivo implica una serie de alteraciones génicas, fisiológicas y metabólicas que van adquiriendo de forma progresiva las células de origen, y que culminan con la aparición de células tumorales. Es necesario identificar y conocer estas

Introducción

alteraciones para poder entender el mecanismo a partir del cual se desarrollan los procesos tumorales, y poder dirigir los esfuerzos científicos al desarrollo de fármacos que eviten estas modificaciones. Hanahan y Weinberg publicaron en el año 2000 un artículo científico en el que establecieron las características distintivas que mostraban las células tumorales con respecto a las células propias de nuestro organismo[10]. Posteriormente, se realizaron actualizaciones en las que se añadieron nuevos rasgos que definían a las células tumorales [11,12].

Inicialmente, se estableció que los procesos tumorales se caracterizaban por ser capaces de mantener su capacidad proliferativa, evadir los factores supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, conseguir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, y activar su capacidad invasiva y metastásica (**Figura 1.2**).



Figura 1.2: Marcas identificativas de las células tumorales. Se esquematizan los 6 rasgos que diferencian las células tumorales de las células sanas [11].

En un estado de homeostasis normal, la proliferación celular está bajo un estricto control, en el que intervienen señales que promueven la división celular, y a su vez procesos de autorregulación negativa que la limitan. En cambio, las células tumorales pierden estos mecanismos de control, y adquieren una **capacidad proliferativa ilimitada**. Para ello, son capaces de producir sus propios factores de crecimiento, que activan de forma autocrina la proliferación celular. Estas proteínas, a su vez pueden estimular la secreción de otros factores de crecimiento por las células normales adyacentes al estroma tumoral, lo que amplifica las señales que inducen la multiplicación celular [13,14]. Para conseguir este estado de división ilimitada, las

células cancerosas también han de inactivar los genes supresores de tumores, como son los que codifican la proteína retinoblastoma (Rb) y la proteína p53, ampliamente conocidas por su papel en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis [15,16].

Otra de las características que poseen las células tumorales, es su capacidad de **resistir a los mecanismos de muerte** celular que se inducen como respuesta al estrés, o al daño excesivo en el ácido desoxirribonucleico (ADN) causado por la progresión tumoral. Uno de los más importante es la apoptosis, que principalmente está controlada por factores pro y anti-apoptóticos pertenecientes a la familia de proteínas de Bcl-2, y por el gen supresor de tumores *TP53*, que codifica el factor supresor de tumores p53. Las células cancerígenas han establecido una serie de estrategias para evadir la muerte celular, que pasan por la inactivación de *TP53*, eliminando así un sensor crítico a la hora de inducir la apoptosis, y por la sobreexpresión de factores anti-apoptóticos como son las proteínas de la familia Bcl-2, o las proteínas inhibidoras de la apoptosis [17,18]. Los dos mecanismos restantes son la autofagia y la necrosis, que aparentemente también deberían ser dos procesos que evitar para conseguir la progresión del tumor. Paradójicamente, que ambos mecanismos afecten negativamente a la tumorigénesis no está del todo claro, ya que existen diferentes estudios que postulan que ambos procesos podrían favorecer el progreso tumoral. Por una parte, sugieren que la autofagia podría estar estrechamente relacionada con la metástasis, la respuesta al tratamiento, y la recurrencia en algunos tumores [19,20]. Por otra parte, señalan que la necrosis, al estar relacionada con el sistema inmune, podría estar favoreciendo que las células tumorales activasen la angiogénesis, lo que también beneficia la carcinogénesis [21].

Sin embargo, estos mecanismos no tendrían sentido si los tumores no hubieran adquirido la capacidad de **replicarse de forma indefinida**, ya que las células sanas disponen de un número definido de ciclos de división tras los cuales entran en senescencia y mueren. Este número está determinado por una serie de repeticiones de secuencias de nucleótidos que se encuentran al final de los cromosomas y que se denominan telómeros, los cuales se van acortando con cada división celular [22]. En el 90% de las células cancerosas se reactiva un tipo de polimerasa denominada telomerasa, que se encarga de reparar el ADN telomérico. Esta enzima está compuesta por dos componentes: uno de ellos es la subunidad proteica con actividad retrotranscriptasa

Introducción

denominada telomerasa retrotranscriptasa inversa (TERT), y el otro es el componente ribonucleotídico que sirve como molde para realizar la reparación del telómero. Además, se han descrito nuevas funciones de esta proteína relacionadas con su subunidad enzimática, como son la inducción de la proliferación celular o la implicación en el mecanismo de reparación del ADN [23,24].

Por otro lado, las células tumorales al igual que las células normales, tienen la necesidad de recibir nutrientes y oxígeno, así como de eliminar los desechos producidos por el metabolismo. Este intercambio se realiza mediante la neovascularización generada a través del proceso de angiogénesis. En los tejidos normales este proceso se activa de forma transitoria, cuando se produce una herida o en el ciclo menstrual de la mujer. En cambio, la mayoría de los tipos tumorales presentan una **activación constitutiva de la angiogénesis**, que puede observarse ya en las fases tempranas de la tumorigénesis [25,26].

El último rasgo identificativo de las células tumorales propuesto por Hanahan y Weinberg en el año 2000, fue la **activación de la invasión y la metástasis**, las cuales son necesarias para la diseminación de las células tumorales a los tejidos circundantes. En términos generales, la invasión tumoral se consigue disminuyendo la expresión de las proteínas que median las uniones de las células entre sí, y de las células con la matriz extracelular, y aumentando de forma paralela la expresión de aquellas moléculas asociadas con la migración celular, como pueden ser las que se encuentran presentes en el desarrollo embrionario y en el proceso inflamatorio [27].

Estos rasgos identificativos son obtenidos por las células tumorales a través de dos **características habilitantes**: la inestabilidad genómica causada por la aparición de diversas mutaciones durante el proceso tumoral, y el proceso inflamatorio promovido por el tumor. Conjuntamente, se establecieron dos nuevos **rasgos distintivos emergentes**, uno de ellos relacionado con los reajustes metabólicos que deben llevar a cabo las células cancerosas para poder proveerse de suficiente energía con la que mantener sus procesos metabólicos, y el otro asociado con impedir la destrucción tumoral por parte del sistema inmune [11] (**Figura 1.3**).

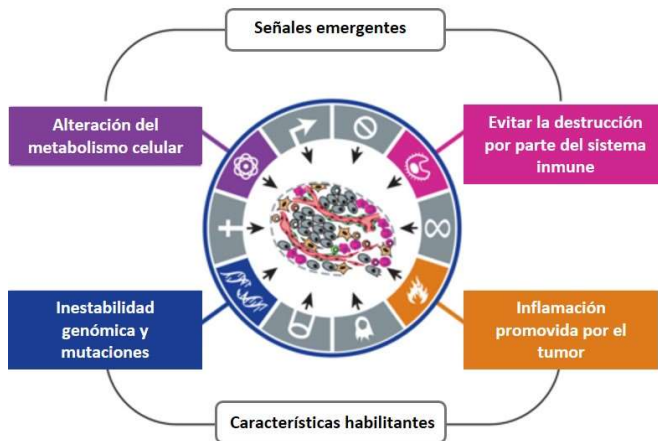


Figura 1.3: Señales emergentes y características habilitantes necesarias para obtener los rasgos de las células tumorales. Se representan las 6 características descritas inicialmente en gris, y se añaden las señales emergentes propuestas de forma posterior [11].

Recientemente, se han añadido lo que podrían denominarse “señales génicas del cáncer”, en las que se han establecido las alteraciones genéticas y epigenéticas relacionadas con la carcinogénesis. Estas modificaciones se han asociado principalmente con tres vías celulares, las cuales están relacionadas con el desarrollo de los tumores malignos. Estas tres vías se han clasificado como: a) “destino celular”, la cual engloba alteraciones que afectan a genes relacionados con la modificación de la cromatina o la regulación transcripcional; b) “supervivencia celular” que incluye genes que pertenecen a rutas que regulan el ciclo y la muerte celular; y c) “mantenimiento génico” que concierne a aquellos genes involucrados en los mecanismos responsables del control del daño en el ADN [12,28].

1.2 Tumores cerebrales o del SNC

Los cánceres cerebrales o del SNC son un grupo heterogéneo de tumores que pueden surgir a partir de las propias células del cerebro, y se les denomina tumores primarios; o bien desarrollarse en otros órganos y metastatizar en el cerebro, los cuales reciben el nombre de tumores secundarios. Los tumores primarios más frecuentes son el meningioma y el glioblastoma multiforme (GBM), y las metástasis más frecuentes son de cáncer pulmonar, de mama y piel [29,30].

1.2.1 Epidemiología y clasificación

Los tumores del SNC más comunes son los de tipo primario, siendo su incidencia de 22 habitantes por cada 100.000. Los tumores secundarios presentan una incidencia de 10

Introducción

habitantes por cada 100.000, siendo más frecuentes en pacientes de edad avanzada (82 de cada 100.000 con una edad por encima de los 85 años), la mayoría de ellos son benignos (un 66%). En el caso de los tumores del SNC malignos, los más frecuentes son el GBM (3 por cada 100.000), el astrocitoma de grado III (1 por cada 100.000) y el linfoma (1 por cada 100.000). Por el contrario, los tumores benignos con una mayor incidencia son el meningioma (8 por cada 100.000), el adenoma hipofisiario (4 por cada 100.000), y el schwannoma (2 por cada 100.000), según datos del año 2016 [31].

En la población pediátrica los tumores cerebrales representan la segunda causa de mortalidad por cáncer, por detrás de la leucemia. En la población adulta, el GBM es el tumor de alto grado más frecuente, con una supervivencia al año del 39% de los diagnosticados, y a los cinco años del 5% [29].

La supervivencia de los pacientes con este tipo de tumores está muy relacionada con el grado tumoral. La OMS ha establecido 4 grados distintos de tumores del SNC clasificándolos según sus características histológicas, y marcando una gradación en su malignidad y pronóstico:

Los tumores de **grado I** presentan un bajo potencial proliferativo, y una alta tasa de supervivencia tras la resección quirúrgica. Los englobados dentro del **grado II**, aunque siguen manteniendo un bajo nivel de actividad mitótica, suelen ser infiltrantes y presentar altas tasas de recurrencia. Las lesiones tumorales de **grado III** se caracterizan por núcleos atípicos, y una alta actividad proliferativa. Por último, el grupo de tumores de **grado IV** está formado por lesiones mitóticamente muy activas, con una extensa capacidad infiltrante, y en las cuales pueden apreciarse zonas necróticas. Por ello, se asocian a una rápida evolución tumoral, mal pronóstico y una baja esperanza de vida.

Por otro lado, la OMS también ha definido grandes grupos dentro de los tumores del SNC atendiendo al tejido del que provienen y/o al lugar donde se originan. Estos grupos están constituidos por los tumores del tejido neuroepitelial, dentro del cual se engloban los gliomas, los tumores de los nervios craneales y paraespinales, los tumores de las meninges, los linfomas y las neoplasias hematopoyéticas, los tumores de las células germinales, los tumores de la región selar, y los tumores metastásicos [32–34].

1.2.2 Factores de riesgo

Existen numerosos estudios sobre la relación de diversos factores de riesgo con la aparición de tumores cerebrales. Sin embargo, hasta la fecha solo la radiación ionizante, ciertas características genéticas, y enfermedades relacionadas con el sistema inmune han podido relacionarse de forma significativa con el desarrollo de estos tumores.

En cuanto a la radiación ionizante, existe una relación causal bien descrita. Estudios de seguimiento realizados en poblaciones expuestas a radiación por motivos médicos durante la niñez, han demostrado que dicha exposición está relacionada con la posterior aparición de tumores cerebrales en estos pacientes. Los tumores radio-inducidos más frecuentes son los meningiomas, gliomas y schwannomas [35–38]. Estos estudios, han contribuido a que la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer considere la radiación ionizante como el único factor ambiental asociado a la aparición de tumores del SNC [39].

La susceptibilidad genética también puede asociarse con la aparición de tumores cerebrales, aunque es importante señalar que la mayoría de estos tumores son esporádicos, y no hereditarios. En este sentido, existen varios síndromes que predisponen el desarrollo de un tumor del SNC. Entre ellos, podemos citar los síndromes de la neurofibromatosis de tipo I y II, que se relacionan con la aparición de gliomas en el nervio óptico y de meningiomas, respectivamente, y varias patologías con herencia monogénica como el síndrome de *Gorlin*, que está asociado a la aparición de meduloblastomas, y los síndromes de *Li-Fraumeni*, *Turcot* e *Hippel-Lindau*, relacionados con el desarrollo de gliomas [40–43].

Por el contrario, las alergias y algunas enfermedades relacionadas con el sistema inmune están inversamente relacionadas con el riesgo de aparición de gliomas. Por ejemplo, se ha demostrado que pacientes con asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica presentan una incidencia menor de este tipo de tumores que la población general [44–47].

1.3 Tumores neuroepiteliales: GBM

El grupo de los tumores neuroepiteliales se subdivide a su vez en tres grandes grupos según el tipo de células que los originan: los tumores gliales o gliomas, surgidos a partir

Introducción

de células gliales, los tumores neuronales y neurogliales mixtos, y los tumores neuroepiteliales no gliales [32].

Los gliomas son los tumores primarios del SNC más frecuentes en adultos, y representan un 81% de los tumores cerebrales malignos. A nivel global, estos tumores no tienen una incidencia muy alta, y aproximadamente se estima que pueden desarrollarse 5-6 casos por cada 100.000 personas al año. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, presentan unas tasas de mortalidad y morbilidad casi iguales a las tasas de incidencia [48].

Los gliomas, a su vez, se clasifican en astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y oligoastrocitomas, los cuales también engloban diferentes categorías de tumores. En este caso, nos centraremos en el grupo de los astrocitomas, ya que en él se encuentra incluido el GBM (**Figura 1.4**).

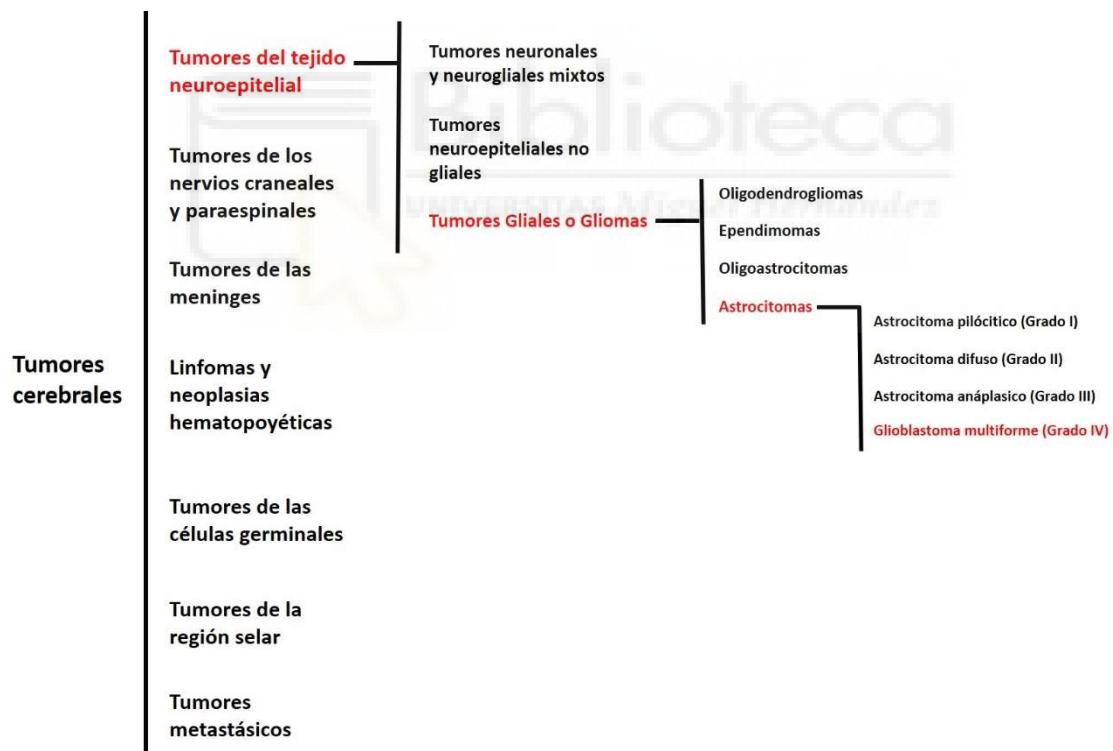


Figura 1.4: Clasificación de los tumores cerebrales y del SNC. Esquema de los principales grupos de tumores cerebrales, y sus diferentes subdivisiones en grupos, subgrupos, tipos y subtipos.

El GBM constituye un 12-15% de todos los tumores cerebrales, y alrededor del 50% de los gliomas. Está considerado como el tumor cerebral más agresivo y maligno, con una

incidencia anual de 2-3 personas por cada 100.000 en Estados Unidos y Europa. Su prevalencia es mayor en individuos varones adultos, y la tasa de supervivencia media se sitúa alrededor de los 15 meses, siendo hasta la fecha una patología incurable [49].

A este tipo de tumor se le denomina “multiforme” debido a su amplia heterogeneidad intra e intertumoral a nivel celular, molecular, clínico e histopatológico. Son altamente infiltrantes e invasivos, de patrón difuso (no definido y disperso), con proliferación celular incontrolada, propensos a la necrosis y angiogénesis, resistentes a la apoptosis y de elevada inestabilidad genética [50,51]. Desde el punto de vista citológico, los GBMs son gliomas celulares anaplásicos compuestos por astrocitos tumorales escasamente diferenciados, generalmente pleomórficos (de diferentes tamaños y formas), con atipia nuclear marcada (núcleos anormales), y alta actividad mitótica [52]. A nivel macroscópico, el GBM se caracteriza por presentar un alto grado de vascularización, áreas necróticas y edema perifocal (acumulación de líquido alrededor del foco de la lesión) [53].

1.3.1 Clasificación del GBM

Se distinguen dos tipos de GBM según su origen: los GBMs primarios o *de novo* y los GBMs secundarios. Los GBMs primarios se generan sin que haya evidencias clínicas de un tumor anterior menos maligno y son los más frecuentes, representando el 95% de los GBMs [40]. Los GBMs secundarios son poco frecuentes, y proceden de astrocitomas difusos o anaplásicos. Estos dos subtipos de GBMs presentan diferentes alteraciones moleculares y afectan a pacientes de diferentes edades, siendo los GBMs primarios propios de pacientes de mayor edad (media de 62 años), y los GBMs secundarios propios de pacientes más jóvenes (media de 45 años). Los GBMs primarios y secundarios son histológicamente indistinguibles, pero clínicamente tienen un mejor pronóstico los GBMs secundarios [54]. Por ello, se ha intentado establecer una clasificación del GBM a través de perfiles moleculares, que permita distinguir entre los diferentes tipos de GBMs. Hasta la fecha se han propuesto dos formas de realizar esta distinción:

La primera de ellas fue propuesta por Verhaak y colaboradores [55] en el año 2010 como resultado de un estudio expresión génica en el que se incluyeron 1.740 genes, y a partir de los cuales se consiguió clasificar los GBMs en 4 categorías diferentes. Esta

Introducción

clasificación también tiene en cuenta la respuesta a las terapias y subdivide a los GBMs en clásicos, mesenquimales, proneurales y neurales, como se esquematiza en la **Figura 1.5**.

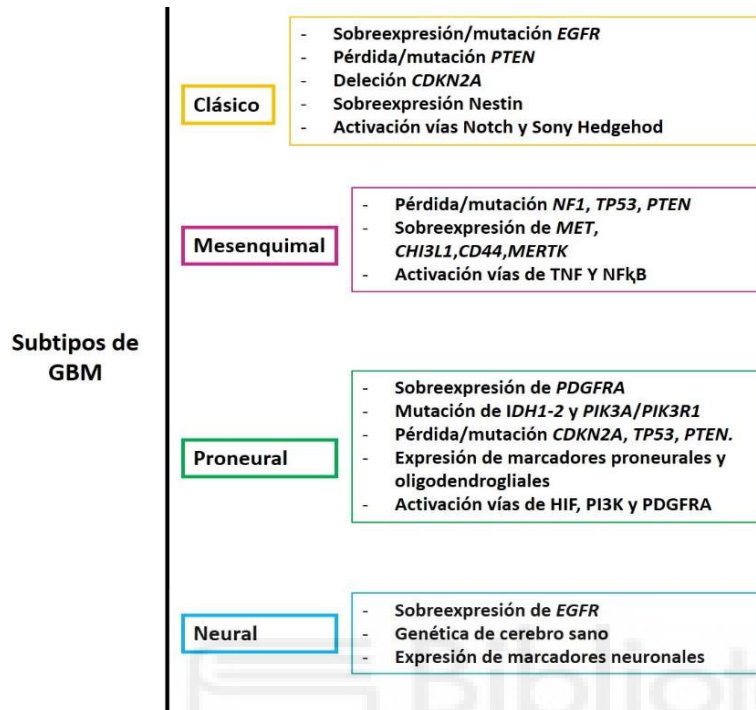


Figura 1.5: Clasificación de los GBMs según Verhaak. Características moleculares principales que definen los subtipos clásicos, mesenquimal, proneural y neural de GBM

Los **GBMs clásicos** se definen como tumores que presentan intacta la respuesta al daño en el ADN mediada por la proteína p53. Además, presentan frecuentemente sobreexpresión del gen *EGFR* (97 %), y pérdida de los genes supresores de tumores *PTEN* (gen que codifica una fosfatasa homóloga a la tensina), y *CDKN2A* (gen que codifica la proteína supresora de tumores p16). Los GBMs clásicos se caracterizan también por la sobreexpresión del marcador nestina de células madre neurales y por presentar activación de las rutas de señalización celular de Notch y Sonic Hedgehog, las cuales desempeñan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario. Este subtipo de GBM desarrolla cierta respuesta a la radioterapia y quimioterapia, probablemente por el hecho de que mantiene funcional el mecanismo de respuesta al daño en el ADN [55].

El **subtipo mesenquimal** presenta un perfil de expresión asociado con el mesénquima y con la angiogénesis. Este tipo de GBM se caracteriza principalmente por una alta expresión de los genes *CHI3L1* (que codifica la glicoproteína 39 de respuesta a cambios en el ambiente celular), *MET* (proto-oncogén que codifica el receptor de factores de crecimiento de hepatocitos), y de genes de las rutas de señalización celular de NFκB

(factor nuclear kappa B) y TNF (factor de necrosis tumoral). También, se caracteriza por la presencia de mutaciones o deleciones en el gen *NF1* (gen que codifica la neurofibromina 1, un regulador negativo de la ruta de Ras). En lo que se refiere a la respuesta a los tratamientos, estos tumores responden a terapias agresivas y se postula que podrían ser susceptibles a agentes inhibidores de la angiogénesis [55].

El **subtipo proneural** conserva una expresión génica similar a la que se da durante el desarrollo neuronal. Los GBMs proneurales se caracterizan por presentar sobreexpresión del gen *PDGFRA* (gen que codifica el receptor α de los factores de crecimiento derivados de plaquetas o PDGFs), y mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* (genes que codifican la enzima isocitrato deshidrogenasa I y II), y *TP53*. El perfil molecular de estos tumores se asemeja al de los GBMs catalogados como secundarios. Los pacientes que presentan GBMs proneurales son más jóvenes que los afectados por tumores del resto de subtipos, y su supervivencia es ligeramente superior, ya que son los que mejor responden a las terapias clásicas [55].

El **subtipo neural** presenta un perfil de expresión génica propio de células con fenotipo diferenciado, y similar al del tejido cerebral normal. Estos tumores presentan bajos niveles de infiltración, y expresan marcadores neuronales como *NEFL* (gen que codifica una proteína del citoesqueleto axonal), *GABRA1* (gen que codifica un receptor del neurotransmisor GABA), y *SYT1* (gen que codifica la sinaptotagmina 1, proteína transductora de la señal de Ca^{2+} en la exocitosis) [55].

Recientemente, la OMS ha actualizado su clasificación de los tumores del SNC del año 2.007 [34], introduciendo rasgos moleculares que permiten distinguir entre los diferentes gliomas, así como entre dos tipos de GBM: aquellos que con mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, los cuales presentan un mejor pronóstico y que se denominan GBMs secundarios; y los que no poseen mutación en los genes *IDH1* e *IDH2* cuyo pronóstico es peor, y que corresponden con GBMs primarios (**Tabla 1.1**). La supervivencia media de los pacientes con GBM primario se encuentra entre los 10 y 15 meses desde el diagnóstico. El 72% de estos GBMs suelen presentar mutaciones en el promotor del gen *TERT* y, el 27% en *TP53*. En cambio, la tasa de supervivencia en los GBMs secundarios oscila entre los 24 y 31 meses. Estos GBMs no suelen tener mutaciones en el promotor de *TERT* (26%), y suelen encontrarse mutaciones en el gen

Introducción

TP53 (81%). Tanto los GBMs primarios como los secundarios suelen conservar la expresión del gen *PTEN*, aunque se ha observado que las alteraciones en la expresión de este gen son más frecuentes en los GBMs primarios (24%) [56].

Además, existen alteraciones que son comunes a todos los GBMs. Por ejemplo un 74 % de los GBMs presentan afectadas las rutas de señalización de Rb y los receptores celulares de tipo tirosina quinasa [57]. Sin embargo, a pesar de que muchos GBMs comparten entre sí algunas anomalías, cada tumor individual presenta un patrón único de alteraciones, y este hecho supone serias dificultades a la hora de establecer estrategias terapéuticas comunes y efectivas para todos ellos [58].

Por ello, se han establecido diversos marcadores moleculares que se detectan de forma sistemática en la mayoría de los GBMs, y que ayudan al diagnóstico y tratamiento de los pacientes, ya que dependiendo de su presencia se puede interpretar el pronóstico asociado a cada tumor.

Tabla 1.1: Principales características identificativas del GBM de tipo primario y secundario.

	GBM IDH nativo	GBM IDH mutado
Sinónimo	GBM primario	GBM secundario
Lesión precursora	No identificada/ originado <i>de novo</i>	Astrocitoma difuso /anaplásico
Proporción de GBM	≈ 90 %	≈ 10 %
Edad media de diagnóstico	62 años	44 años
Tasa media de supervivencia	<u>Cirugía + radioterapia</u> 9.9 meses	24 meses
	<u>Cirugía + radioterapia + quimioterapia</u> 15 meses	31 meses
Mutaciones en el promotor de <i>TERT</i>	72 %	26 %
Mutaciones en <i>TP53</i>	27 %	81 %
Mutaciones en <i>PTEN</i>	24 %	Excepcional

1.3.2 Principales marcadores moleculares asociados al diagnóstico y/o pronóstico en GBM

1.3.2.1 Mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*

El gen *IDH1* se encuentra en la región 34 del brazo largo del cromosoma 2 (2q34), y codifica la proteína IDH1 (Isocitrato deshidrogenasa 1), la cual está formada por 414 aminoácidos (aa), y su masa molecular es de 46 kilodalton (kDa). Su forma activa es un homodímero que se encuentra en el citoplasma y en los peroxisomas. La mutación más frecuente en su secuencia codificante es un cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 395, que implica un cambio de la arginina 132 por una histidina (R132H). Este cambio ocurre en su centro activo y conlleva una ganancia de función [59].

El gen *IDH2* se localiza en la región 26.1 del brazo largo del cromosoma 15 (15q26.1), y la proteína que codifica es IDH2 (Isocitrato deshidrogenasa 2), constituida por 452 aa, y su masa molecular es de 50 kDa. Al igual que la proteína IDH1, en su estado activo conforma un homodímero, pero en este caso su localización celular es mitocondrial en vez de citosólica. También se han encontrado diversas mutaciones en su secuencia codificante, aunque la más común es el cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 515. Dicha mutación conlleva el cambio de una arginina por una lisina (R172K). Esta mutación también ocurre en el centro activo del enzima, concretamente en el residuo homólogo al cambio en IDH1, y por lo tanto se produce una ganancia de función [60].

La función de ambas proteínas se desarrolla dentro del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA, por sus siglas en inglés), y consiste en catalizar el paso de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG), mediante la reducción del NADP a NADPH. Las mutaciones en estas proteínas producen una pérdida de su función nativa, y la adquisición de la capacidad de catalizar la conversión del α -KG en D-2-hidroxiglutarato (2-HG), consumiendo para ello el NADPH formado y convirtiéndolo de nuevo en NADP (**Figura 1.6**). El 2-HG está considerado un oncometabolito, puesto que sólo se produce cuando las proteínas IDH1 e IDH2 se encuentran mutadas [61,62]. Esta nueva función tiene un efecto directo sobre la actividad del TCA, provocando la disminución del metabolismo oxidativo de la célula. También, se ven alterados diversos mecanismos relacionados con

Introducción

la regulación epigenética, los estados de oxido-reducción, y la reparación del ADN, en los que las proteínas IDH1 e IDH2 juegan un papel fundamental [63,64].

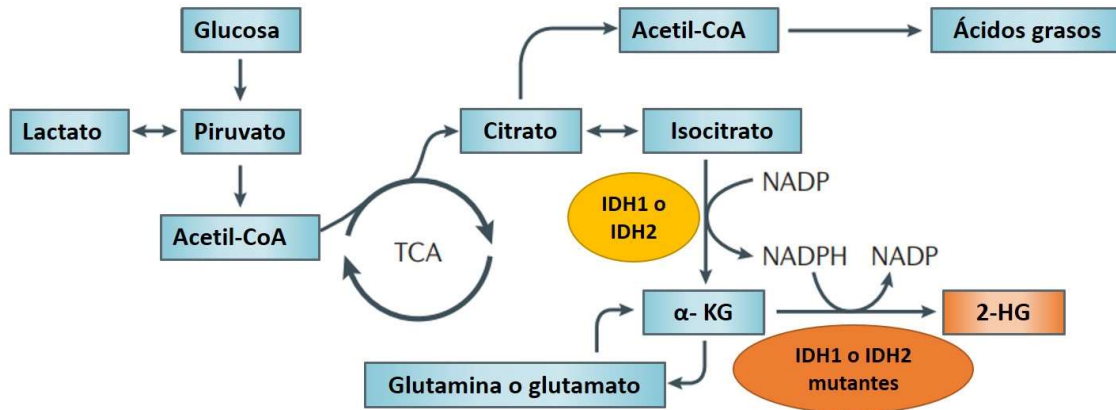


Figura 1.6: Esquema de las reacciones asociadas al TCA, especificando las nuevas funciones de las proteínas de IDH1 e IDH2 mutadas. En su forma nativa IDH1 e IDH2 (en amarillo) convierten el Isocitrato en α -KG produciendo NADPH a partir de NADP. IDH1 e IDH2 mutadas (en naranja) utilizan ese NADPH producido para convertir el α -KG en 2-HG [61].

Las mutaciones en estos dos genes se utilizan como marcador pronóstico en tumores gliales, ya que numerosos estudios han confirmado que la supervivencia de los pacientes con tumores que presentan mutaciones en los genes *IDH1* o *IDH2* es superior a la de los pacientes que presentan estos genes en su estado nativo [60,65–70].

1.3.2.2 Mutaciones en el promotor del gen *TERT*

El gen *TERT* se encuentra localizado en la región 15.33 del brazo corto del cromosoma 5 (5p15.33), y codifica la subunidad enzimática de la telomerasa denominada TERT, que está formada por 1.132 aa y tiene un peso molecular de 127 kDa. Como ya se ha indicado, los telómeros se acortan con cada división celular, y la telomerasa es la encargada de mantener su longitud a lo largo de las sucesivas divisiones. La actividad de la telomerasa va decayendo con la edad, y con ello se ve disminuida la longitud de los telómeros. La actividad de esta enzima se ve reducida en la edad adulta, y normalmente el gen *TERT* suele estar silenciado por mecanismos epigenéticos [71].

Sin embargo, se ha demostrado que el silenciamiento de *TERT* se encuentra alterado en múltiples cánceres, lo que provoca una mayor presencia de esta proteína en las células

tumorales y permite que sus telómeros mantengan su longitud [72,73]. La activación transcripcional de *TERT* suele realizarse a través de mutaciones en su región promotora, las cuales se han descrito en cánceres como GBM, melanoma, hepático y de vejiga [74–77]. Las mutaciones más ampliamente detectadas son el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en las posiciones –228 o –250 de su promotor [78,79].

En los GBMs, la presencia de las mutaciones anteriormente descritas se correlaciona con una menor tasa de supervivencia [80]. Además, las mutaciones en el promotor de *TERT* se han asociado con GBMs sin mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, reforzándose así su relación con los tumores de mal pronóstico [77].

1.3.2.3 Metilación de promotor del gen *MGMT*

El gen *MGMT* se sitúa en la región 26.3 del brazo largo del cromosoma 10 (10q26.3). La proteína que codifica se denomina O-6 metilguanina ADN metiltransferasa, con un tamaño de 207 aa y su masa molecular de 22 kDa. Su función consiste en reparar el daño génico causado por los grupos alquilo. Ello hace que esté estrechamente relacionada con el mal pronóstico y la resistencia a la quimioterapia en GBM, puesto que la mayoría de los fármacos utilizados en quimioterapia son agentes alquilantes [81,82]. Éstos, son capaces de generar metilaciones aberrantes en el ADN que pueden derivar en muerte celular. Por ello, dentro del sistema de reparación del ADN existen proteínas, como *MGMT*, encargadas de reparar el daño causado por estos agentes [83] (**Figura 1.7**).

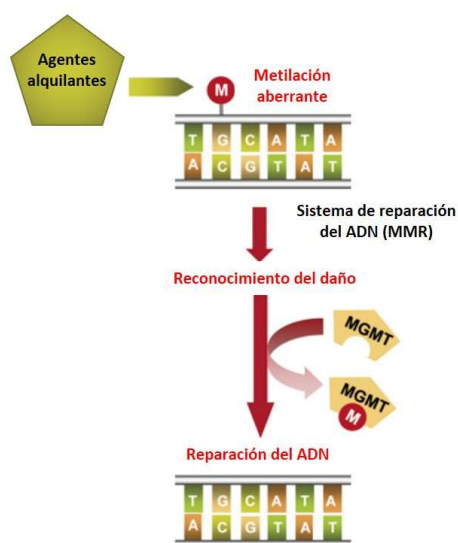


Figura 1.7: Mecanismo de acción de la proteína

MGMT. Los agentes alquilantes provocan daño en el ADN, que es detectado por el sistema de reparación *mismatch repair*. La proteína reparadora *MGMT* localiza y repara dicho daño [83].

Introducción

Las células tumorales aprovechan este mecanismo fisiológico de reparación celular para adquirir resistencia a fármacos quimioterapéuticos como la temozolomida (TMZ) y la carmustina (bis-cloroetilnitrosourea - BCNU) ambos utilizados en el tratamiento del GBM. El daño causado por estos fármacos es neutralizado por la proteína MGMT en los tumores que no tienen su promotor metilado, y por lo tanto conservan la expresión de este gen. Este hecho conlleva que aquellos GBMs que poseen metilado el promotor del gen *MGMT* respondan mejor al tratamiento quimioterapéutico y, como consecuencia, que los pacientes con este tipo de tumores presenten un mejor pronóstico [84–86]. Recientemente se ha postulado que la metilación en el promotor de *MGMT* puede estar asociada a la metilación en el promotor del gen *SOCS1*, y que la combinación de ambos puede diferenciar un subconjunto de GBMs que presenten una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico [87].

1.3.2.4 Mutaciones en los genes *TP53* y *PTEN*

El gen *TP53* se localiza en la región cromosómica 13.1 del brazo corto de cromosoma 17 (17p13.1), y codifica la proteína denominada p53, que está formada por 393 aa y cuya masa molecular es de 44 kDa. La proteína p53 ejerce un papel como proteína supresora de tumores, y responde a diversas situaciones de estrés dirigiendo diferentes respuestas celulares, que van desde el arresto en la fase G₁ del ciclo celular, inducción del sistema de reparación del ADN, la senescencia celular y la apoptosis [88] (**Figura 1.8**).

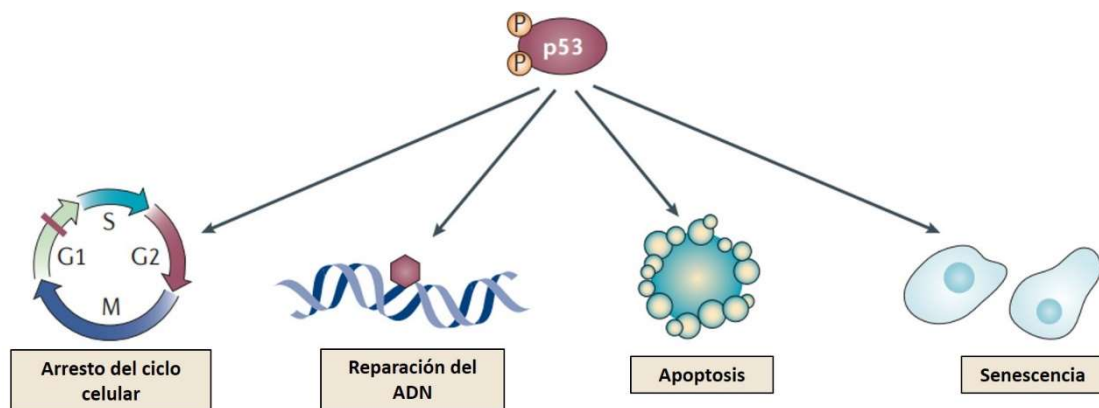


Figura 1.8: Mecanismos inducidos por la activación de la proteína p53. La activación de la proteína p53 conlleva el inicio de varios mecanismos de respuesta a estrés que se esquematizan en la figura [88].

Se han descrito mutaciones del gen *TP53* en numerosos tipos de cánceres entre los que se incluyen cáncer de mama y cervical, leucemia, sarcoma y tumores del SNC [89–91]. En GBM también se han identificado mutaciones en este gen, y su presencia se correlaciona con la transición de un glioma de bajo grado a la formación de un GBM. Además, los pacientes que desarrollan GBMs en los que p53 no es funcional tienen menores tasas de supervivencia, puesto que la proteína p53 nativa limita la expansión del tumor induciendo apoptosis, lo que se traduce en tumores menos agresivos [92].

Las mutaciones en el gen *TP53* muy frecuentemente están relacionadas con mutaciones en el gen *PTEN*, que también actúa como supresor de tumores. El gen *PTEN* se localiza en la región cromosómica 23.31 del brazo largo del cromosoma 10 (10q23.31). Este gen codifica la proteína PTEN, cuya masa molecular es de 47 kDa y su tamaño de 403 aa [93]. La proteína PTEN se expresa normalmente en el tejido cerebral y en los astrocitomas de bajo grado. Sin embargo, aproximadamente un 24% de los GBM primarios portan mutaciones que conllevan la inactivación de este gen [56]. Las alteraciones más habituales que inducen el silenciamiento del gen *PTEN* son las deleciones en el cromosoma 10 (muy frecuentes en GBM), la metilación de su promotor, o la presencia de mutaciones en su región codificante [94]. Hasta la fecha las alteraciones en *PTEN* se han relacionado con una mayor progresión tumoral [95].

1.3.3 Diagnóstico y tratamiento

Las primeras manifestaciones clínicas de la presencia de un GBM suelen ser dolores de cabeza sin un patrón definido que a menudo suelen asociarse a un tipo de patologías de menor gravedad. La progresión del tumor conlleva el desarrollo de otros síntomas como trastornos cognitivos, cambios de personalidad y otras alteraciones psiquiátricas como la demencia. A los síntomas neurológicos le acompañan parálisis faciales o pérdidas auditivas y visuales, que suelen estar directamente relacionadas con la localización del tumor [96].

El método estándar de diagnóstico es la detección del tumor mediante la resonancia magnética, en la que se obtienen imágenes de los tejidos blandos del paciente. Para llevar a cabo esta exploración se le administra al paciente un medio de contraste que permite mejorar la visualización de los diferentes tejidos, e identificar y localizar el

Introducción

tumor (**Figura 1.9**). El medio de contraste más utilizado es el que contiene Gadolinio, dada su buena tolerancia y ausencia de efectos adversos. En el caso de que no se pueda realizar una resonancia magnética, también se puede detectar el GBM mediante tomografía axial computerizada (TAC), aunque este método es menos recomendable puesto que conlleva la exposición del paciente a rayos X [97–99].

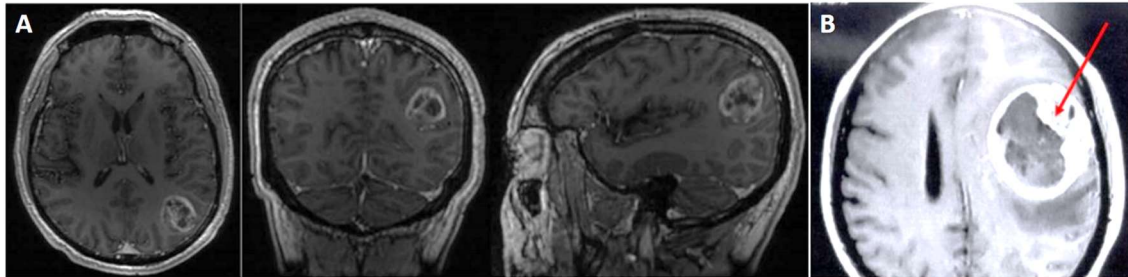


Figura 1.9: Imágenes de un GBM obtenidas mediante resonancia magnética. En la figura A se muestra el mismo tumor desde los diferentes planos cerebrales (horizontal, coronal y sagital), esta imagen está realizada sin medio de contraste. En la imagen B se observa también un GBM, en este caso la resonancia magnética se realizó con medio de contraste [97].

Una vez detectado el GBM mediante técnicas de imagen, es necesario obtener una biopsia del tumor para realizar un examen histopatológico, en el que se establece la estadificación del tumor (Grado I-IV) en base a los criterios establecidos por la OMS (anaplasia, necrosis, vascularización, actividad mitótica). Además, mediante técnicas inmunohistoquímicas se determinan las principales características genéticas del tumor como son el índice de proliferación celular, calculado a través del marcador ki67, y las alteraciones en p53 [100] (**Figura 1.10**). Posteriormente, se realiza el estudio genético, en el que se analizan la metilación del promotor de *MGMT*, y la presencia de mutaciones en *IDH1* o *IDH2* para completar su diagnóstico, y establecer un pronóstico aproximado del tumor [69,84,101].

El tratamiento completo del GBM engloba tres etapas. La primera de ellas consiste en una resección de la mayor parte del tejido tumoral posible, ya que se ha comprobado que la eliminación completa del tumor incrementa la supervivencia del paciente. En la mayoría de los casos, la resección total del tejido tumoral resulta complicada, puesto que los GBMs generalmente son altamente infiltrativos, y además tienen partes difusas difíciles de extirpar [102]. Para mejorar las cirugías de resección se están aplicando

nuevas técnicas, como el mapeo de ciertas áreas del cerebro durante la operación por resonancia magnética y, el uso de la terapia fotodinámica para la detección de compuestos fluorescentes, como el ácido 5-aminolevulínico, que son captados en mayor medida por la células malignas, y ayudan a localizar mejor el tumor [103–105].

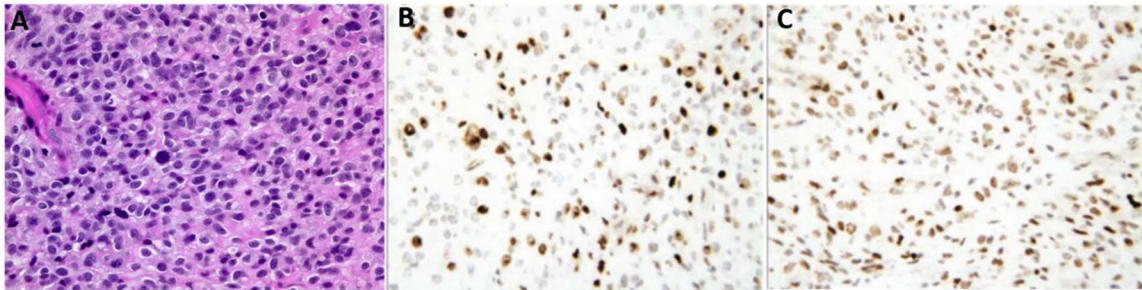


Figura 1.10: Secciones histológicas de un GBM con diferentes tinciones. (A) Tinción eosina-hematoxilina, a través de la cual se pueden observar características distintivas del GBM, como la anaplasia o la presencia de células mitóticas. (B) Inmunotinción con un anticuerpo específico de la proteína ki67, que se utiliza como marcador de proliferación celular. (C) Análisis de las alteraciones en p53, la proteína mutada se acumula en el núcleo celular, y se detecta su presencia a través de un anticuerpo específico contra p53 [100,106].

A continuación, se pauta un tratamiento de quimio y radioterapia, puesto que se ha demostrado que el tratamiento combinado implica mayores tasas de supervivencia [107–109]. En el tratamiento quimioterapéutico se administran agentes alquilantes como la TMZ, y algunas nitrosoureas como el BCNU o la lomustina. La dificultad de este tratamiento radica en que únicamente pueden utilizarse fármacos que atraviesen la barrera hematoencefálica, y consigan llegar en altas concentraciones a la masa tumoral [110]. Por ello, se están desarrollando nuevas estrategias que permitan aplicar estos fármacos directamente en la localización del tumor. Una de las más estudiadas, es la aplicación de discos cargados con BCNU directamente en el lugar del tumor cuando se realiza la cirugía de resección. Actualmente existen resultados provenientes de ensayos clínicos en fases III y IV en los que se ha visto incrementada la supervivencia de los pacientes que han sido tratados con este tipo de terapia [111].

El tratamiento radioterápico que mejores tasas de supervivencia ha aportado, y que por ello se utiliza de forma sistemática en el tratamiento del GBM, es la administración de un total de 60 Grays (Gy) en fracciones de 2 Gy a lo largo de 30 sesiones, distribuidas durante 5 días consecutivos realizando un descanso de dos días entre ellas. El aumento

Introducción

de la dosis total de radioterapia no conlleva un incremento en la supervivencia del paciente, y sí causa un empeoramiento en su calidad de vida [112].

1.3.4 Resistencia al tratamiento quimio y radioterápico en GBM

La administración del tratamiento quimio y radioterápico logra aumentar algunos meses la esperanza de vida de estos pacientes, aunque no siempre se consigue la erradicación completa del tumor, y en numerosas ocasiones meses después de haber completado el tratamiento el paciente sufre una recidiva y vuelve a desarrollar el GBM [113,114] (Figura 1.11).

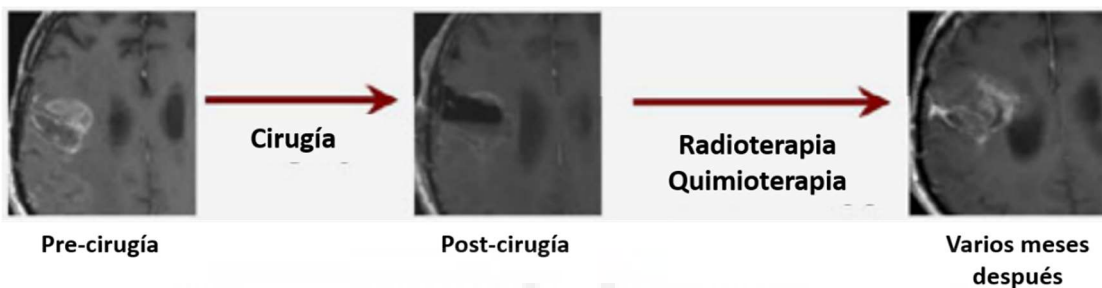


Figura 1.11: Imágenes de resonancia magnética de la progresión de un GBM. En la primera imagen se muestra el GBM inicial, en la siguiente se puede ver la cicatriz dejada por la cirugía de resección. Por último, se muestra la reaparición del GBM varios meses después del tratamiento quimio y radioterápico [113].

La resistencia a la quimioterapia, como se ha descrito anteriormente, está ampliamente estudiada, y en su mayor parte está causada por la activación de los mecanismos de reparación del ADN, a través de los cuales el tumor consigue evitar el efecto alquilante de los fármacos quimioterapéuticos [115].

En cambio, aún no se ha conseguido establecer el proceso por el cual los GBMs resisten al tratamiento radioterápico. El mecanismo de acción de la radioterapia consiste en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de la radiación ionizante aplicada. Estas ROS inducen a la célula a un estado de estrés que conlleva daño en el ADN, arresto del ciclo celular, entrada en senescencia y activación de la apoptosis celular [116]. Por ello, una de las principales causas de radiorresistencia es la activación de los sistemas de protección frente a estrés oxidativo, que se encargan de eliminar estas moléculas, devolviendo a la célula a su estado basal [117]. De hecho, se ha demostrado la relación directa entre la activación constitutiva de uno de estos sistemas,

El regulado por el factor de transcripción NRF2 (Factor nuclear derivado de eritrocito 2), y la resistencia a la radiación en cánceres como el de pulmón [118,119], mama [120], próstata [121], ovario [122] o cáncer colorrectal [123].

El factor de transcripción NRF2 regula la expresión de numerosos genes relacionados con enzimas detoxificantes y antioxidantes. Su activación se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión a una proteína citoplásmica llamada KEAP1 (del inglés, *Kelch-like ECH associated protein 1*) y al citoesqueleto. En el momento en que se produce una situación de estrés oxidativo, NRF2, promovido por la presencia de ROS, se escapa de la inactivación producida por KEAP1, y desencadena la respuesta de protección frente al daño celular [124,125](Figura 1.12).

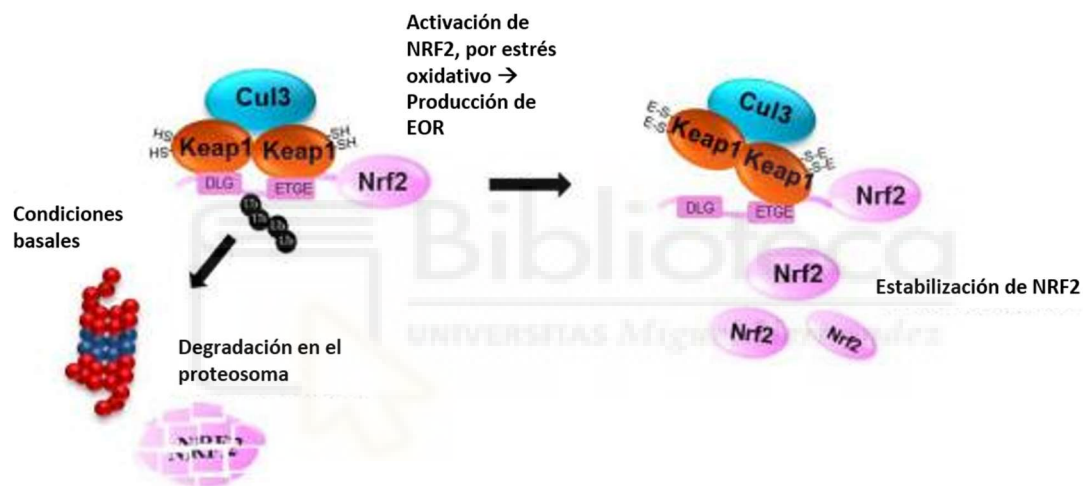


Figura 1.12: Mecanismo de represión y liberación del factor transcripcional NRF2. Se esquematiza en su estado basal, en el que su activación se encuentra reprimida por el dímero formado por las proteínas KEAP1; y en su estado de activación bajo la presencia de estrés oxidativo en el que se libera de la acción de KEAP1, se estabiliza y se transloca al núcleo [124].

Debido a esto, el silenciamiento de la expresión del gen *NRF2* se ha postulado como una estrategia para reducir la resistencia a la radioterapia, puesto que al inhibir su expresión se favorece la acumulación de las ROS que se producen como resultado de la radiación [126–128]. Sin embargo, la alta concentración de ROS en el tejido canceroso también se ha relacionado con la progresión del tumor. Por lo tanto, la inhibición de este mecanismo podría desencadenar al mismo tiempo el efecto contrario al promover la activación de la metástasis tumoral [129] (Figura 1.13).

Introducción

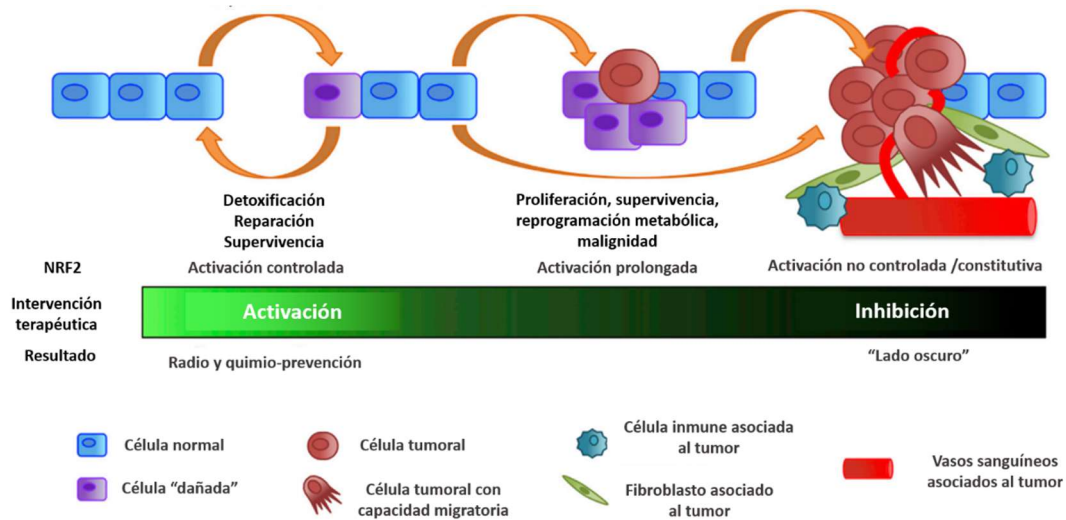


Figura 1.13: Papel dual de la proteína NRF2 en la carcinogénesis. Esquema de los mecanismos mediante los cuales NRF2 participa en la tumorigénesis, las diferentes estrategias terapéuticas en las que puede usarse, y las respuestas producidas a consecuencia de su modulación [129]

Además de la resistencia a la radioterapia mediada por NRF2, se han postulado diversas hipótesis sobre la adquisición de radiorresistencia de las células tumorales. Entre ellas, la teoría de la existencia de células madres tumorales, que se encuentran formando parte del tumor, y se encargan de regenerar las células cancerígenas que mueren como consecuencia del tratamiento [113]. Por otro lado, se ha señalado la posible contribución de la hiperactivación de la ruta de transducción de señal de la Fosfoinositol-3 quinasa/AKT (PI3K/AKT), y de la ruta de activación transcripcional JAK/STAT en la adquisición de esta resistencia [130–133].

1.4 Rutas de transducción alteradas en GBM

1.4.1 Ruta PI3K-AKT

La ruta PI3K/AKT participa en el control de la apoptosis, la migración y la invasión celular [134]. Esta cascada de señalización celular se inicia con la activación de la enzima PI3K por parte de los receptores tirosina quinasa (TRK) activados. PI3K fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), produciendo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), el cual media la activación de la quinasa AKT promoviendo el anclaje de ésta a la cara citosólica de la membrana plasmática. Aquí, las proteínas piruvato deshidrogenasa quinasa 1 y 2 (PDK-1 y PDK-2) la activan a través de la fosforilación de sus residuos de

treonina 308 y serina 473, respectivamente (**Figura 1.14**). Una vez fosforilada, la quinasa AKT desarrolla su actividad fosforilando multitud de sustratos, entre los que se encuentran proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la síntesis de proteínas, entre otras [134,135]. La pérdida de expresión de *PTEN*, que ocurre en algunos GBMs primarios, afecta directamente a la regulación de esta ruta, puesto que este gen codifica una fosfatasa que cataliza la desfosforilación de PIP_3 y, por lo tanto, su pérdida conlleva una hiperactivación de AKT. Esta activación constitutiva se ha relacionado con un aumento de la resistencia a la hipoxia y de la proliferación celular [136].

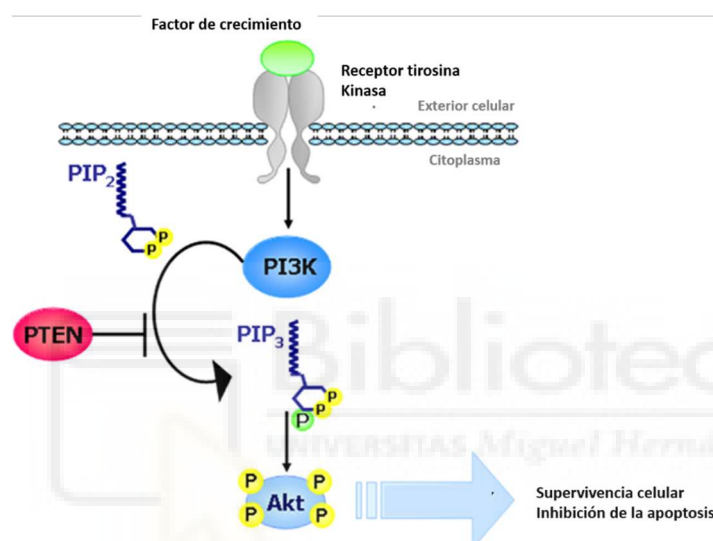


Figura 1.14: Vía de transducción PTEN/PI3K/AKT. La enzima P3IK fosforila el PIP_2 , generando PIP_3 que actúa como activador de AKT. A su vez, la principal función de PTEN consiste en desfosforilar PIP_3 para inactivar la vía [137].

1.4.2 Ruta JAK/STAT

La ruta JAK/STAT participa en la diferenciación, la migración y la proliferación celular, así como en la apoptosis. La activación intracelular de esta ruta se desencadena por la activación de los receptores de membrana a los cuales están asociadas las proteínas Janus quinasa (JAK). Cuando uno de sus ligandos extracelulares, como por ejemplo las citoquinas, se une a estos receptores se induce la dimerización de las proteínas JAK. Una vez activadas, estas enzimas se encargan de fosforilar un residuo de tirosina localizado en el dominio C-terminal de los factores de transcripción STAT. Esta fosforilación conlleva la dimerización de las proteínas STAT, que al ser activadas se translocan al

Introducción

núcleo para unirse a las secuencias reguladoras específicas y activar o reprimir la expresión de sus genes diana [138,139] (**Figura 1.15**).

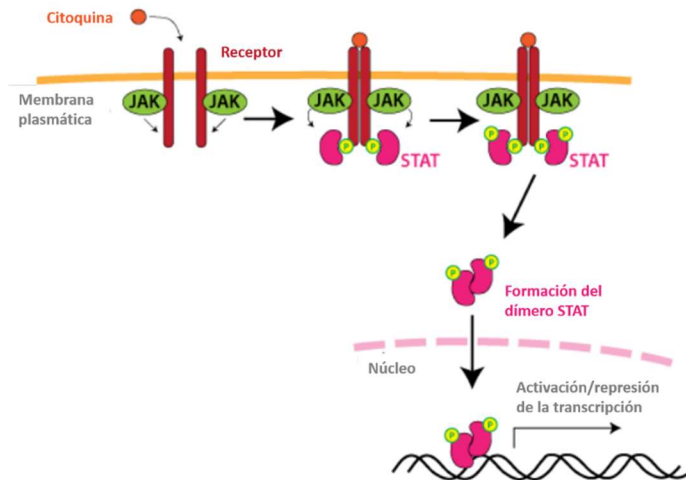


Figura 1.15: Ruta JAK/STAT. La activación de esta ruta se produce por uno de sus ligandos extracelulares, en este caso una citoquina que se une a su receptor y desencadena la dimerización de las proteínas JAK. Estas proteínas activan los factores de transcripción STAT encargados de regular la expresión génica de sus genes diana [138].

En un principio, se estableció que la fosforilación de los factores de transcripción STAT únicamente podía ocurrir a través de la acción de las proteínas JAK. De hecho, en el caso de STAT2 y STAT6 todavía se mantiene esta teoría. Sin embargo, se ha descubierto que STAT1 y STAT3 poseen también en su extremo C-terminal un residuo de serina susceptible de ser fosforilado (la serina 727) por enzimas como las quinasas activadas por mitógenos y estrés (MSKs) [140,141]. Aunque se desconoce qué desencadena este tipo de fosforilación, se ha comprobado que MSK1 es capaz de fosforilar el residuo 727 de serina de STAT3 como respuesta a la exposición a la radiación ultravioleta en células epiteliales de ratón [142].

La activación constitutiva de la ruta JAK/STAT se asoció por primera vez con un rasgo de malignidad tumoral por primera vez en la década de 1990s [143], y desde entonces se han encontrado alteraciones que promueven la hiperactivación de las proteínas JAK, o de los factores de transcripción STAT en diferentes tipos de cánceres, sobre todo hematopoyéticos como leucemias o linfomas [144], pero también en algunos tumores sólidos como el carcinoma hepático y los tumores del SNC [133].

El mecanismo principal a través del cual se produce la inhibición de esta vía es mediante acción de las proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS), en concreto SOCS1 y SOCS3. Las proteínas inhibidoras de STATs (PIAS), y las proteínas tirosina-fosfatasas (PTPs) también son capaces de inhibir la ruta JAK/STAT [138].

1.4.2.1 Familia de proteínas SOCS

En mamíferos existen 8 proteínas SOCS, cuatro de las cuales (SOCS1, SOCS2, SOCS3 y CISH: citoquina inducible con un dominio SH2) se encargan principalmente de la regulación de la señalización por citoquinas en la ruta de transducción de señal JAK/STAT y, el resto (SOCS4, SOCS5, SOCS6 y SOCS7) suelen estar relacionadas con el control de la vía de transducción de los receptores tirosina-quinasa [145].

Todas las proteínas SOCS contienen 3 dominios comunes: un dominio N-terminal escasamente conservado, y cuyo tamaño es variable; un dominio central denominado dominio homólogo de Src 2 (SH2), que presenta una mayor conservación; y un dominio C-terminal que está fuertemente conservado que se denomina caja SOCS [145].

Las proteínas SOCS se pueden agrupar en parejas atendiendo a la homología de su dominio N-terminal. En este sentido, CISH y SOCS2 poseen una extensión de su dominio SH2 denominado secuencia extendida de SH2 (ESS), cuya función está relacionada con la unión a su sustrato. Así, SOCS1 y SOCS3 comparten un dominio N-terminal similar denominado región inhibidora de quinasa (KIR), a través del cual son capaces de inhibir la activación de proteínas JAK. SOCS4 y SOCS5 presentan un dominio N-terminal del cual aún no se ha determinado su función y, SOCS6 y SOCS7 que en su extremo N-terminal contienen una secuencia de traslocación al núcleo. El dominio SH2 es el responsable de la unión específica de estas enzimas con sus proteínas diana. Por último, la caja SOCS contiene dos subdominios funcionales: BC, que recluta a las proteínas elongina B y C, y Cul, que permite la unión a la Culina 5. El resultado de estas interacciones es la formación de un complejo capaz de reclutar a una ubiquitina ligasa E3, que se encarga de marcar a las proteínas para dirigir las al proteasoma [145] (**Figura 1.16**).

Introducción

Las proteínas de esta familia más frecuentemente asociadas con diferentes patologías, así como con el proceso tumoral, son SOCS1 y SOCS3, codificadas por los genes igualmente denominados *SOCS1* y *SOCS3* [145–147].

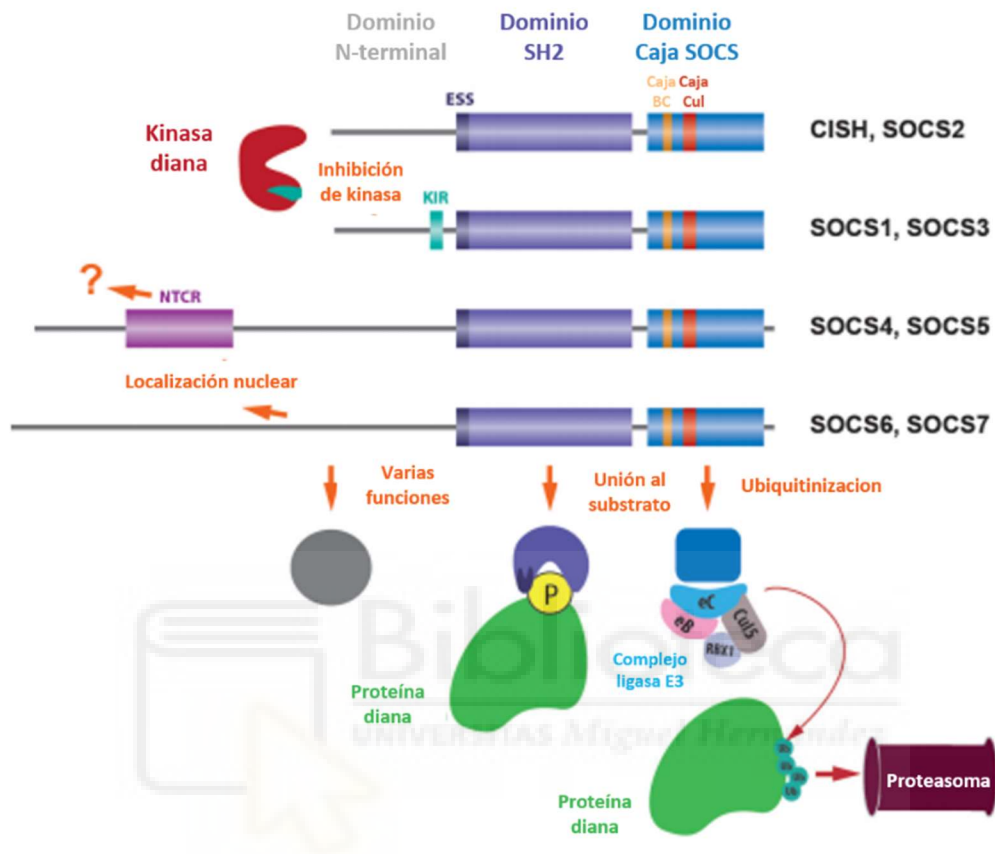


Figura 1.16: Estructura y función de las proteínas SOCS. Se muestran los tres dominios que comparten todas las proteínas de la familia SOCS, así como las diferentes funciones atribuidas a cada uno de ellos [145].

1.4.2.2 Expresión génica y función de las proteínas *SOCS1* y *SOCS3*

El gen *SOCS1* se encuentra localizado en la región 13 del brazo corto del cromosoma 16 (16p13) y contiene únicamente dos exones, localizándose su ORF (marco de lectura abierto) en el segundo de ellos (**Figura 1.17-A**). Su transcripción da lugar a un ARNm de 1.775 pares de bases (pb), de cuya traducción se obtiene la proteína SOCS1, que posee 211 aa y tiene una masa molecular de 23,5 kDa [148]. El gen *SOCS3* se encuentra en la región 25.3 del brazo largo del cromosoma 17 (17q23.5), contiene dos exones, y su ORF se encuentra en el exón 2. Su transcrito tiene un tamaño de 3.302 pb, que se traduce en la proteína SOCS3 de 225 aa, y cuya masa molecular es de 24.7 kDa (**Figura 1.17-B**).

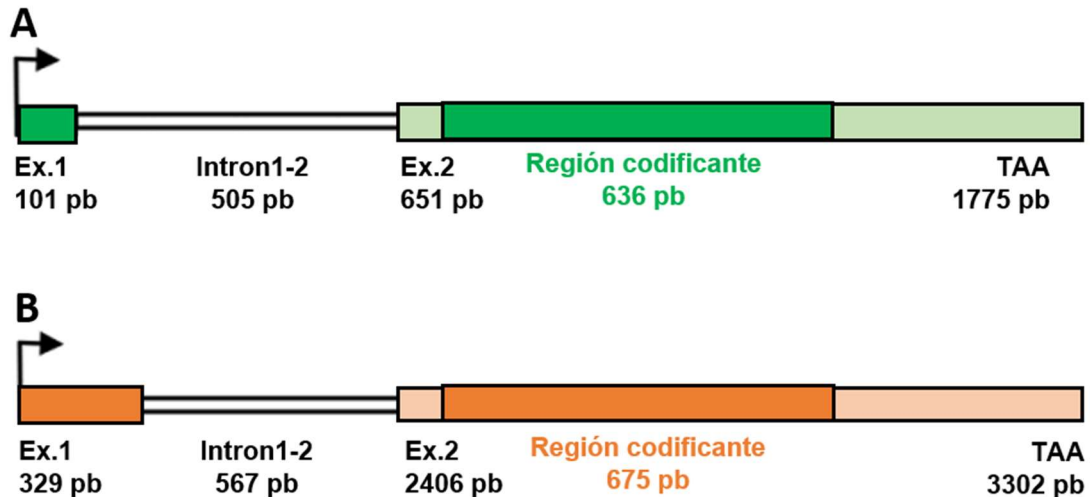


Figura 1.17: Esquematación de la estructura de los genes *SOCS1* (A) y *SOCS3* (B). Se muestran los dos exones que forman cada uno de los genes con su tamaño en pb, así como el intrón que se encuentra entre ellos, y su ORF. También, se indica el codón de terminación.

Ambos genes se expresan de forma ubicua en el organismo, aunque su nivel basal de expresión es bajo, lo que implica que existe una escasa cantidad de las proteínas SOCS1 y SOCS3 en el interior celular. La activación de la ruta JAK/STAT como consecuencia de la acción de las citoquinas, conlleva que los factores de transcripción STAT se transloquen al núcleo, y activen la expresión de estos genes. Con ello se inicia la síntesis de las proteínas SOCS1 y SOCS3, que regulan negativamente la ruta JAK/STAT. Por lo tanto, se crea un bucle de retroalimentación negativa que inactiva la ruta, y a su vez su propia expresión. La acción inhibitoria de las proteínas SOCS1 y SOCS3 puede llevarse a cabo de tres formas distintas: la primera de ellas ocurre mediante su unión directa a la región fosforilada de las proteínas JAK, impidiendo su unión con los factores de transcripción STAT; la segunda está mediada por la región KIR que poseen las proteínas SOCS1 y SOCS3, que les permite unirse a las proteínas JAK y anular su actividad quinasa. Por último, gracias a la formación del complejo BC y el reclutamiento de una ubiquitina ligasa 3, son capaces de inducir la degradación de las proteínas JAK y STAT [149] (**Figura 1.18**).

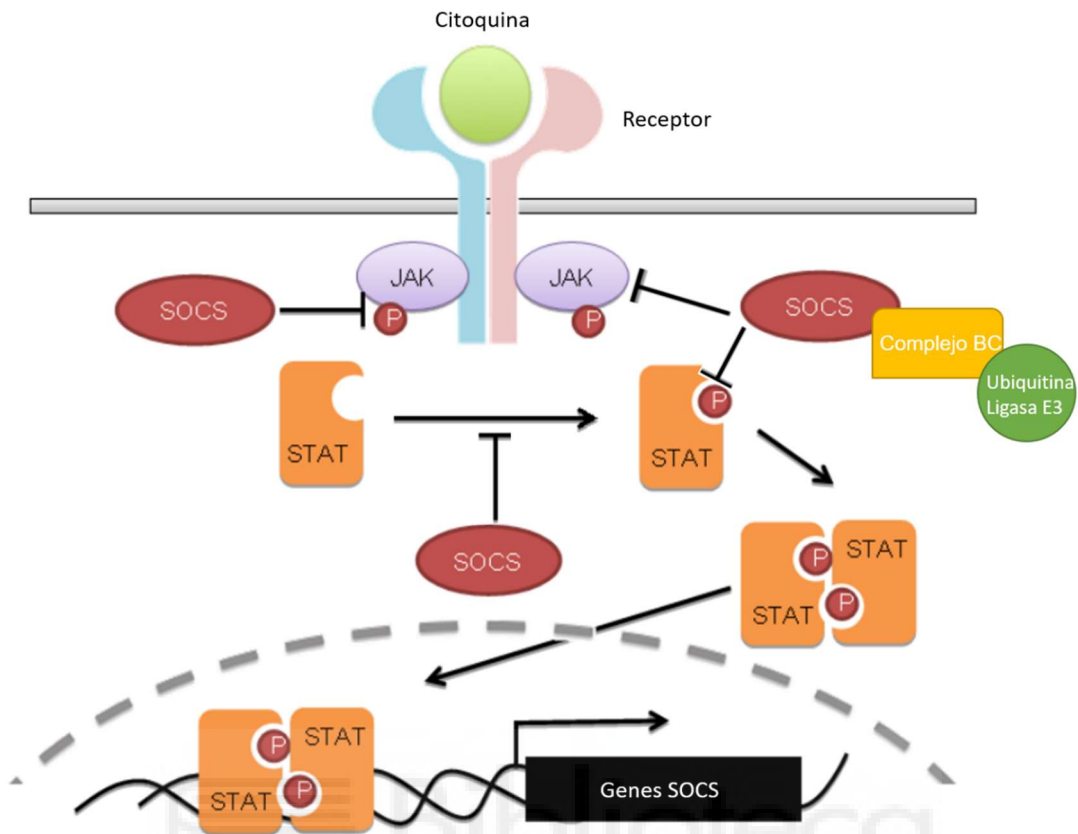


Figura 1.18: Inhibición de la ruta JAK/STAT por las proteínas SOCS1 y SOCS3. Se esquematizan los tres mecanismos a través de los cuales las proteínas SOCS inhiben la ruta de transducción de señales JAK/STAT [150].

Tanto *SOCS1* como *SOCS3* forman parte de la regulación de la misma ruta, y aunque su expresión es inducible por la mayoría de las citoquinas, se ha comprobado que la activación de la expresión de estos genes responde a la intervención de unos estímulos determinados. En el caso de *SOCS1*, la activación de su expresión está principalmente desencadenada por el mecanismo de respuesta a interferón, y a su vez mediada por la acción del factor de transcripción STAT1. En el caso del gen *SOCS3*, existen evidencias que demuestran que su expresión se activa como respuesta a la estimulación por interleuquinas, como por ejemplo la interleuquina 6 (IL-6), y a través de la acción de STAT3. Por ello, aunque en un principio parece que la acción de ambos genes regula la activación de los mismos procesos celulares, no siempre es así, puesto que sus activadores transcripcionales son distintos, y por lo tanto cada uno de ellos es capaz de desencadenar diferentes cascadas de transducción de señales [151].

1.4.2.3 Implicación de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en la carcinogénesis y el proceso tumoral

Los cambios en la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* se han relacionado con la carcinogénesis y el desarrollo tumoral [152]. Además, los niveles de expresión de ambos genes se han visto alterados en cánceres como el gástrico, de mama y GBM [153–155].

El promotor del gen *SOCS1* se encuentra silenciado, normalmente por metilación, en carcinoma hepático, carcinoma de páncreas, leucemia mieloide y mieloma múltiple, entre otros tipos de cáncer [156,157]. En cambio, se han detectado niveles de expresión elevados de *SOCS1* en melanoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, y cáncer neuroendocrino [156,158,159]. Esta controversia ha llevado a considerar que el gen *SOCS1* ejerce una función dual en la carcinogénesis, pudiendo actuar como un gen supresor de tumores a través de sus interacciones con la proteína p53, y con proteínas propias de las rutas de transducción de señal de PTEN/PI3K y RTK; y a la vez como un oncogén que promueve la capacidad proliferativa y metastásica en ciertos tipos de cánceres, como por ejemplo el cáncer colorrectal [160]. Además, se han encontrado mutaciones somáticas en la secuencia codificante del gen *SOCS1* que se asocian con una menor supervivencia en pacientes con linfoma de Hodking [148].

En cambio, los estudios realizados sobre la función del gen *SOCS3* en el proceso tumoral, apuntan a que, a través de sus interacciones con las proteínas p53 y PTEN, y de su acción inhibidora sobre la ruta JAK/STAT, desarrolla una función como gen supresor de tumores. El silenciamiento de *SOCS3* o la bajada en su expresión se ha asociado con la progresión tumoral y la metástasis en modelos animales de cáncer de próstata y de mama triple negativo, así como en modelos celulares de cáncer pancreático, y en pacientes con cáncer colorrectal [161–164].

Por otra parte, el silenciamiento epigenético de estos genes, también se ha relacionado con la resistencia al tratamiento tanto quimio como radioterápico, y con una menor tasa de supervivencia en pacientes con GBM, cáncer pulmonar, y cáncer de próstata entre otros [165–167]. Estas evidencias sugieren la posible utilización de los genes *SOCS1* y *SOCS3* como biomarcadores y/o dianas terapéuticas en algunos cánceres, así como su implicación en la resistencia a los tratamientos desarrollada en los tumores más

Introducción

agresivos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha obtenido resultados que relacionan la proteína quinasa 6 (PTK6), cuya expresión es inhibida por *SOCS3*, con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico en líneas celulares de cáncer de páncreas [168]. Además, PTK6 también está relacionada con la activación de la ruta JAK/STAT puesto que es capaz de fosforilar al factor transcripcional STAT3 [169,170].

Todas estas evidencias establecen el punto de partida de este trabajo, en el que se determina la expresión de los genes *MGMT*, *SOCS1* y *SOCS3* en líneas celulares de GBM establecidas a partir de cultivos primarios obtenidos de aspirados cerebrales procedentes de pacientes con GBM, sometidos a cirugías de resección en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE). Además, se estudia la utilidad de los genes *SOCS1* y *SOCS3* como biomarcadores o dianas terapéuticas, su implicación en la radioresistencia presente en GBM, y sus relaciones con otros genes, que también se han asociado con la respuesta al tratamiento en otros tipos de cánceres.



Capítulo 2

Objetivos



2.1 Objetivo general

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la búsqueda de nuevos biomarcadores y/o dianas terapéuticas en cultivos primarios de GBM, que puedan relacionarse con la respuesta a la quimio y/o radioterapia

Este objetivo general se centra en el estudio del gen *MGMT* por su relación con la resistencia a la quimioterapia, y de los genes *SOCS1* y *SOCS3* debido a su asociación con la carcinogénesis y la progresión tumoral.

2.2 Objetivos específicos

Para la consecución del objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer cultivos primarios de GBM a partir de aspirados cerebrales de pacientes sometidos a cirugías de resección en el HGUE.
2. Caracterizar las líneas celulares obtenidas a partir de dichos cultivos primarios, según los criterios de la nueva clasificación de los tumores del SNC de la OMS, y de su grado de quimio y radorresistencia.
3. Definir el perfil de metilación y expresión de los genes *MGMT*, *SOCS1* y *SOCS3*, y estudiar la correlación entre la metilación de sus promotores y su expresión a nivel de ARNm en las líneas celulares de GBM.
4. Confirmar la relación causa-efecto entre la metilación o expresión del gen *MGMT* y el nivel de quimiorresistencia desarrollada por las líneas celulares de GBM.
5. Valorar la implicación de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en la respuesta a la radioterapia.
6. Evaluar la posible utilización de los genes *SOCS1* y *SOCS3* como biomarcadores y/o posibles dianas terapéuticas en GBM.
7. Estudiar la implicación de otros genes relacionados con los genes *SOCS1* y *SOCS3* en la radorresistencia de las líneas celulares de GBM establecidas.
8. Evaluar diferentes estrategias experimentales para potenciar el efecto de la radioterapia en GBM



Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Cultivo celular

3.1.1 Establecimiento y mantenimiento de cultivos primarios de GBM

Los cultivos primarios de GBM se obtuvieron a partir de aspirados tumorales procedentes de pacientes que se sometieron a cirugías de resección en el HGUE. Previamente, los pacientes habían firmado un consentimiento informado para donar el material tumoral excedente de los procedimientos clínicos al Biobanco del HGUE, para su uso en investigación. El establecimiento de dichos cultivos se desarrolló bajo el amparo del Comité Ético de investigación Clínica (CEIC) del HGUE, y su obtención contó con la colaboración de los servicios de Neurocirugía, Anatomía Patológica y Biobanco.

La cirugía de resección se llevó a cabo mediante un dispositivo denominado *Cavitron*, que mediante ultrasonidos fragmenta el tejido tumoral causando una mínima afectación en las estructuras vecinas. Simultáneamente se realiza una irrigación con suero fisiológico, y se aspiran los fragmentos de tumor hacia un recipiente estéril. El aspirado tumoral resultante fue estudiado y seleccionado por el servicio de Anatomía Patológica para determinar la naturaleza y el estadio del tumor cerebral. El tejido celular sobrante se vehiculizó a través del Biobanco y se recepcionó en la Unidad de Investigación del HGUE, donde en un plazo máximo de 24 h se realizó el procesamiento del material celular para el establecimiento del cultivo primario.

El aspirado tumoral inicial se alicuotó en tubos *Falcon* de 50 ml, y se realizó una primera centrifugación a 1.000 rpm durante 10 min, con el fin de separar las fracciones sólidas y la fracción líquida. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 3 volúmenes de tampón de lisis de eritrocitos (EL; QIAGEN). Esta suspensión se incubó durante 30 min a 4 °C, tras lo cual se volvió a centrifugar a 1.000 rpm durante 10 min, descartándose de nuevo el sobrenadante. Si el precipitado resultante aún presentaba coloración rojiza, indicación de que no se habían lisado todos los eritrocitos, se realizaba una segunda incubación con 3 volúmenes de tampón EL, a 1.000 rpm, durante 15 min, a 4°C, seguida de una centrifugación durante a 1.000 rpm, 10 min. El precipitado obtenido tras el proceso de lisado de los eritrocitos se resuspendió en 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con la mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12; GIBCO), suplementado suero fetal bovino (FBS; GIBCO) al

Materiales y métodos

10% v/v, y una mezcla de los antibióticos estreptomicina y penicilina (Biowest) al 1% v/v. La solución formada por el medio DMEM/F12 completo y el material celular se disgregó manualmente empleando un tamiz y un mortero de vidrio (*Sieve tissue grinder*; Sigma Aldrich) (**Figura 3.1**).



Figura 3.1: Herramientas para la obtención de cultivos primarios. *Sieve tissue grinder* de Sigma-Aldrich.

El tamizado se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 50 ml, y se centrifugó a 1.000 rpm, 5 min. En los casos en los que el precipitado presentaba fragmentos sólidos sin disgregar, se procedió a la digestión enzimática con hialuronidasa a una concentración final de 4,5 U/ml, y colagenasa II a una concentración final de 0,09 mg/ml. La digestión se realizó durante 30 min a 37°C y en agitación. Tras la incubación se realizó una nueva centrifugación a 1.000 rpm, durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 25 ml de medio DMEM/F12 completo. De esta última suspensión celular se transfirieron 5 ml a un frasco de cultivo denominado frasco T25, obteniendo finalmente 5 frascos T25 de cada aspirado tumoral de partida. Estos frascos se mantuvieron en un incubador a 37°C, y con una atmosfera del 5% de CO₂. Pasadas 24 h, y no más de 48 h, se procedió a realizar un cambio de medio a los frascos del cultivo primario recién establecido, con el fin de eliminar las células muertas que no se hubieran adherido al frasco, dejando únicamente aquellas células que continuarían el proceso de desarrollo del cultivo celular. Para ello, se retiró el medio antiguo, y se transfirieron al frasco 5 ml de medio DMEM/F12 completo fresco. Todos los cultivos primarios establecidos se mantuvieron a 37°C/5% CO₂, realizando pases consecutivos al alcanzar el cultivo una confluencia del 90-100%.

Para realizar el pase al cultivo celular, se retiró el medio DMEM/F12 completo, y se lavó el frasco con 5 ml de tampón fosfato salino 1x (DPBS; Gibco). A continuación, se procedió a la retirada del DPBS 1x y adición de 1 ml de Tripsina-EDTA 0.01% (GIBCO) para despegar las células de la superficie del frasco. Las células se incubaron con Tripsina-EDTA 0,01%

durante 1-2 min a 37°C/5% CO₂, hasta que adquirieron una morfología redondeada, y se despegaron de la superficie. Si transcurrido este tiempo las células no se habían despegado, se golpeó el frasco suavemente. A continuación, se añadieron 4 ml de medio DMEM/F12 completo con el fin de neutralizar la tripsina, y se transfirió el volumen total (5 ml) a un tubo *corning* de 15 ml, que se centrifugó a 1.000 rpm, durante 5 min, a temperatura ambiente (T_a) (23°C). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un 1ml de medio DMEM/F12 para realizar el conteo de las células mediante una cámara de Neubauer. Una vez determinada la cantidad total de células por ml, se sembraron entre 100.000 y 200.000 células, dependiendo del cultivo primario, en un nuevo frasco, con 4,5 ml de medio.

En cada pase, la utilización de los frascos se distribuyó sistemáticamente de la siguiente forma: dos se emplearon para criopreservar el cultivo, y dos se utilizaron para aislar ácidos nucleicos (uno para ADN, y otro para el ácido ribonucleico (ARN)) según los protocolos descritos en el [apartado 3.1, sección 3.1.2](#) El último se dividió en 5 frascos, para volver a iniciar el proceso en el pase siguiente (**Figura 3.2**).

Este sistema se mantuvo hasta que los cultivos primarios alcanzaron el pase 15, momento en el cual se consideró que se comportaban como una línea celular inmortalizada, y sólo se hacían dos réplicas de cada cultivo. Además, periódicamente, se seguían criopreservando, y aislando ADN y ARN.

Todos los pasos de manipulación del cultivo celular, excepto las centrifugaciones e incubaciones, se realizaron en una cabina de seguridad biológica clase II, y con materiales estériles y desechables.

3.1.2 Recogida y almacenamiento de muestras de los cultivos primarios de GBM

3.1.2.1 Criopreservación

Los frascos destinados a criopreservar el cultivo, se procesaron de la misma forma en la que se realizaron los pases del cultivo celular. Sin embargo, en este caso, el precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de congelación (FBS al 50% v/v, medio DMEM/F12 completo al 40% v/v, y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% v/v (Sigma Aldrich)),

Materiales y métodos

en lugar de en medio de cultivo DMEM/F12 completo, y se transfirió a un criotubo sumergido en hielo. Este criotubo se mantuvo 2 h a -20°C para que se llevase a cabo una congelación lenta, y después de almacenó a -80°C .

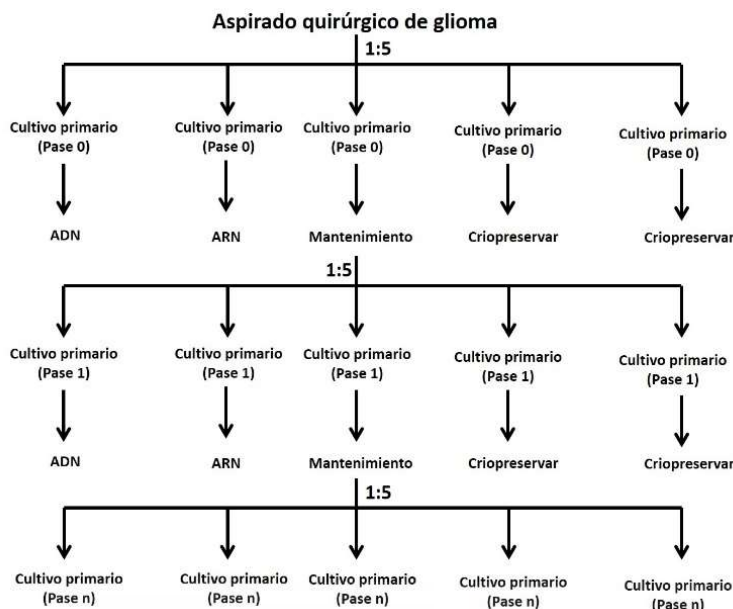


Figura 3.2: Sistematización del mantenimiento de los cultivos primarios. Se esquematizan los pasos de criopreservación, obtención de ácidos nucleicos, y mantenimiento realizados a partir del aspirado quirúrgico de GBM.

3.1.2.2 Muestras de ácidos nucleicos

El procesado del frasco para la obtención de las muestras celulares para aislar ADN, se realizó siguiendo el mismo protocolo que para un pase celular. Sin embargo, después de la centrifugación se descartó el sobrenadante, y el precipitado celular se almacenó seco a -20°C .

El protocolo seguido para la obtención de muestras celulares para aislar ARN se llevó a cabo añadiendo directamente al frasco 350 microlitros (μl) de tampón de lisis *RNeasy* (RLT; QIAGEN), suplementado con β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich) al 1% v/v. Esta solución se recogió en un *ependorf* de 1,5 ml que se almacenó a -80°C .

3.1.3 Siembra de las líneas celulares establecidas a partir de los cultivos primarios de GBM para la realización de los ensayos posteriores

El número de células que contiene un frasco T25 no siempre es suficiente para realizar experimentos posteriores en los que se requiere un elevado número de células. Por ello, para llevar a cabo los ensayos de viabilidad, ciclo celular e inmunocitoquímicos, se

procedía a sembrar una réplica de cada línea celular en un frasco T75, que se mantenía a 37°C/5%CO₂ hasta que alcanzaba el 90-100% de confluencia.

Las células de estos frascos se despegaron siguiendo el mismo protocolo de pase celular, y se sembraron 250.000 células para estudios de viabilidad y ciclo celular en placas de 6 pocillos, o 75.000 células para estudios inmunocitoquímicos en placas de 24 pocillos.

3.2 Extracción de ácidos nucleicos

3.2.1 Extracción de ADN total

La extracción de ADN total se llevó a cabo a partir de los precipitados guardados a -20°C, utilizando el kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN). El precipitado se resuspendió en 200 µl de DPBS, se le añadieron 20 µl de proteinasa K junto con 200 µl de tampón AL, y se incubó 10 min, a 56°C, con agitación intermitente, para conseguir el lisado total de las células. Tras la incubación, se le añadieron 200 µl de etanol al 100%, y se transfirió toda la mezcla a la columna proporcionada en el kit. Esta columna contiene una membrana de sílica-gel en la cual el ADN, tras una centrifugación a 8.000 rpm, 1 min, queda retenido. Posteriormente se realizaron dos lavados, el primero con tampón AW1 seguido de una centrifugación de a 8.000 rpm, 1 min, y el segundo con tampón AW2, centrifugando la columna a 14.000 rpm, durante 3 min. Por último, se eluyó el ADN añadiendo 50 µl de tampón AE a la membrana y centrifugándola a 8.000 rpm, 1 min. **(Figura 3.3).**

La cuantificación del ADN se realizó mediante la medida de la absorbancia a 260 nanómetros (nm), y la estimación de la pureza a través del cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro NANODROP 1000 (ThermoFisher Scientific), descartando aquellas muestras que tenían una muy baja concentración de ADN y/o un valor del cociente 260/280 por debajo de 1,8 o por encima de 2,2. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso para estudios de secuenciación, y metilación de promotores.

Materiales y métodos



Figura 3.3: Esquema del procedimiento de aislamiento de ADN total.

Se detallan los pasos protocolizados del Kit *DNeasy Blood & Tissue* de QIAGEN. Imagen tomada y modificada del catálogo de imágenes de la página web de QIAGEN (www.qiagen.com).

3.2.2 Extracción de ARN total

El ARN total de las muestras almacenadas a -80°C se aisló empleando el kit *RNeasy Plus* (QIAGEN). El lisado de las células se produjo al recoger la muestra y adicionarle el tampón RLT + β -mercaptoetanol al 1% v/v. Este lisado se transfirió a una columna destinada a la eliminación de ADN genómico y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 s. Al sobrenadante se le añadió un volumen de etanol al 70%, y se transfirió todo el volumen a una columna proporcionada por el kit, que contiene una membrana de sílica-gel en la que, tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min, el ARN quedó adsorbido. A continuación, se lavó la membrana tres veces, con los tampones del kit, en el siguiente orden: *tampón* RW1, *tampón* RPE y de nuevo *tampón* RPE. Después de añadir cada *tampón* se centrifugó la columna a 10.000 rpm 15 s, 15 s y 2 min respectivamente. Antes de la elución, se realizó una nueva centrifugación, sin la adición de ningún tampón, a máxima velocidad durante 1 min para secar completamente la membrana. Finalmente, se eluyó el ARN con 25 μl de agua libre de RNasas mediante una nueva centrifugación a 10.000 rpm, 1 min, tras esta última centrifugación se mantuvieron siempre los tubos en hielo. (**Figura 3.4**).

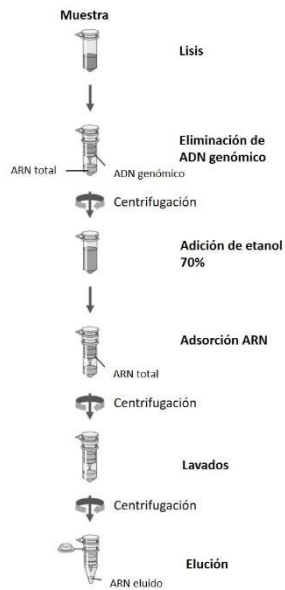


Figura 3.4: Esquema del procedimiento de aislamiento de ARN total. Representación de los diferentes pasos descritos en el protocolo del kit *RNeasy Plus* de QIAGEN. Imagen tomada y modificada del catálogo de imágenes de la página web de QIAGEN (www.qiagen.com).

La pureza y concentración (ng/ μ l) del ARN obtenido se determinó siguiendo el mismo protocolo descrito para las muestras de ADN ([Sección 3.2.1](#)). Una vez cuantificadas, se almacenaron a -80° C para el posterior análisis de la expresión génica.

3.3 Ensayos inmunocitoquímicos

3.3.1 Microscopía óptica

La detección de la expresión a nivel de proteína de p53 y PTEN se realizó mediante técnicas inmunocitoquímicas sobre secciones de *Tissue Microarray* (TMA) en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA).

Para ello, se utilizaron precipitados celulares de las líneas celulares establecidas fijados en formol al 100% (Sigma Aldrich). Estos precipitados se incluyeron en parafina para su posterior corte en secciones y construcción del TMA utilizando el dispositivo *manual tissue arrayer* (Beecher Instruments). La utilización de este soporte permite estudiar de forma simultánea todas las líneas celulares, minimizando el coste en reactivos, y proporcionando una reacción inmucitoquímica uniforme. Una vez construido el TMA, las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas con los anticuerpos primarios anti-p53 (D0-7) o anti-PTEN (6H2.1) ambos suministrados por la casa comercial DakoCytomation. Como anticuerpo secundario, se utilizó en ambos casos un anticuerpo biotinilado. Posteriormente se añadió la enzima estreptavidina conjugada

Materiales y métodos

con peroxidasa, y se incubaron las secciones del TMA con diaminobencidina para revelar la tinción. En el HGUA, este procedimiento se realiza de forma automatizada con el equipo *Techmate-500* (DakoCytomation).

La valoración de las tinciones se llevó a cabo mediante microscopía óptica. En el caso de p53, la tinción positiva de los núcleos significa que existen alteraciones en dicha proteína, ya que en su estado nativo tiene una vida corta, y no se produce su acumulación. Para PTEN, se considera anómalo la ausencia de tinción, puesto que indica la pérdida de expresión de dicho gen al no detectarse la proteína que codifica.

3.3.2 Microscopía confocal de inmunofluorescencia

Los experimentos de inmunocitoquímica, y la observación de los mismos mediante microscopía confocal, se realizaron en colaboración con el Grupo de Investigación de Genética Humana y de Mamíferos, perteneciente al Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante.

3.3.2.1 Fijación e inmunotinción de las muestras

Se sembraron 75.000 células por pocillo de las líneas celulares de GBM en placas de cultivo de 24 pocillos (apartado 3.1, sección 3.1.3), cada uno de los cuales contenía 1 ml de medio de cultivo y un cubreobjetos redondo estéril en su base, y se incubaron durante 24 h, a 37°C/5% CO₂.

Cuando las células adheridas a los cubreobjetos alcanzaron la confluencia deseada, se lavaron 2 veces con DPBS a pH 7,4 suplementado con CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 0,5 mM, y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en DPBS durante 10 min a T_a. Después se lavaron 3 veces con DPBS, durante 5 min cada vez, a T_a y con agitación suave. A continuación, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% en DPBS durante 10 min a T_a y con agitación suave. Posteriormente, se realizaron 3 nuevos lavados con DPBS, y se llevó a cabo el bloqueo de sitios de unión inespecíficos con una solución de BSA al 1% en DPBS durante 1 h en las mismas condiciones. Tras lavar nuevamente 3 veces con DPBS, las células se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios correspondientes, a las diluciones indicadas en la **Tabla 3.1** en solución de bloqueo, en una cámara humidificada durante una noche, a 4°C. Los cubreobjetos se lavaron nuevamente 3 veces con DPBS, y las células se incubaron en oscuridad en presencia de

los anticuerpos secundarios correspondientes (todos ellos desarrollados en asno por la compañía Molecular Probes) a las diluciones detalladas en la **Tabla 3.2**, en solución de bloqueo durante 1 h a T_a ambiente en cámara humidificada. Con el fin de visualizar los núcleos de las células al microscopio, se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 10 µg/ml a la mezcla de anticuerpos secundarios.

Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con DPBS y, se colocaron sobre un portaobjetos añadiéndose una gota de medio de montaje de fluorescencia compuesto por glicerol y DPBS (Citifluor AF1; Monocamp). El exceso de medio se eliminó con papel de filtro, y los cubreobjetos se sellaron empleando laca de uñas.

Las preparaciones se guardaron en oscuridad a 4°C hasta su observación al microscopio confocal. Con el fin de comprobar si la inmunorreactividad observada en los experimentos era atribuible a los anticuerpos primarios, se incubaron de forma paralela los cubreobjetos sin anticuerpos primarios como controles negativos.

Tabla 3.1. Anticuerpos primarios utilizados para el análisis de proteínas mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia.

Antígeno	Especie	Compañía (Nº catalogo)	Origen*	Dilución en inmunocitoquímica
SOCS1	Humano	Abcam (ab9870)	Cabra (p)	1/250
SOCS3	Humano	Abcam (ab16030)	Conejo (p)	1/250
GFAP	Humano	Milipore (AB5804)	Conejo (m)	1/500

* (p) policlonal, (m) monoclonal

Tabla 3.2. Anticuerpos secundarios utilizados para el análisis de proteínas mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Etiqueta	λ emisión	Dilución
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor 546	590 nm (rojo)	1/100
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor 488	515 nm (verde)	1/100

3.3.2.2 Observación de las muestras mediante microscopía confocal

La fluorescencia de las muestras se detectó mediante un microscopio confocal espectral invertido Leica TCS SP2 utilizando dos fuentes de láser óptico: 1) láser azul de Ar, con una longitud de onda (λ) de excitación de 450-490 nm, utilizado para los ensayos en que se emplearon anticuerpos secundarios marcados con el fluoróforo Alexa Fluor (AF) 488, el cual emite fluorescencia a una λ de 515 nm (verde); 2) láser verde de He-Ne, con una λ de excitación de 515-560 nm, utilizado en los ensayos con anticuerpos secundarios marcados con AF 546 o AF 555, los cuales emiten fluorescencia a una λ de 590 nm (rojo).

Para la visualización del colorante DAPI, se utilizó un diodo ultravioleta (UV) con una λ de emisión de 405 nm (azul). En los casos en que se visualizaron dos o más fluoróforos sobre la misma muestra, éstos fueron excitados secuencialmente para evitar interferencias entre los canales de emisión.

Se utilizó un objetivo Leitz Plan-apocromático de inmersión en aceite mineral de 63 \times . La platina del microscopio era galvanométrica de alta precisión y alta velocidad para controlar el eje Z. Las fotografías, obtenidas a una resolución 300 dpi, se almacenaron en formato TIFF. El análisis y procesado de las fotografías se llevó a cabo con el programa Photoshop CS5 extended.

3.4 Ensayos moleculares

La secuenciación Sanger, y parte del estudio del grado de metilación de los promotores, se realizó durante mi estancia en el Laboratorio de Apoyo de la Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL).

3.4.1 Secuenciación Sanger

El material genético de partida fue el ADN previamente extraído de las líneas celulares establecidas de GBM. El primer paso, consistió en amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones específicas de los genes *IDH1*, *IDH2* y *TERT*. En los genes *IDH1* e *IDH2* se amplificó la región que codifica el dominio catalítico de la proteína, situada en el exón 4. Para ello, se utilizaron los cebadores específicos descritos en la **Tabla 3.3** [171]. En esta región se han encontrado mutaciones somáticas (*IDH1*-

R132/ *IDH2*-R172) que se relacionan con la reducción de la actividad enzimática de las proteínas codificadas por dichos genes [60]. En el caso de *TERT*, se amplificó la región promotora utilizando los cebadores que se encuentran en la **Tabla 3.3** [79], para detectar dos mutaciones descritas en esta región (C228T y C250T), y que están presentes en el 70-80% de los GBMs primarios y oligodendrogliomas [77].

Tabla 3.3: Cebadores utilizados para la reacción de amplificación de *IDH1*, *IDH2*, y *TERT*, y el tamaño del fragmento amplificado con cada pareja de cebadores.

	Cebador directo	Cebador inverso	Fragmento
<i>IDH1</i>	5'CTCCTGATGAGAAGAGGGTTG3'	5'TGGAAATTTCTGGGCCATG3'	248 pb
<i>IDH2</i>	5'TGGAACTATCCGGAACATCC3'	5'AGTCTGTGGCCTTGACTGC3'	187 pb
<i>TERT</i>	5'CACCCGTCCTGCCCTTCACCTT3'	5'GGCTTCCCACGTGCGCAGCAGGA3'	193 pb

La amplificación por PCR de los tres genes se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, conteniendo 10 µl de AmpliTaq Gold 2x (ThermoFisher Scientific), 1 µl de la mezcla de los cebadores específicos para cada gen (directo e inverso; Integrated DNA technologies), con una concentración de 20 µM, 4 µl de glicerol al 50% v/v (Sigma Aldrich), 250 ng de ADN, y agua destilada hasta llegar al volumen final. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (ThermoFisher Scientific), cuyo termobloque permite fijar diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores, por lo que se pudieron llevar a cabo las amplificaciones por PCR de los 3 genes a la vez. La temperatura de hibridación de los cebadores fue de 57°C para *IDH1*, 56°C para *IDH2*, y de 60°C para *TERT*. El protocolo del termociclador para la PCR se detalla en la **Figura 3.5**.

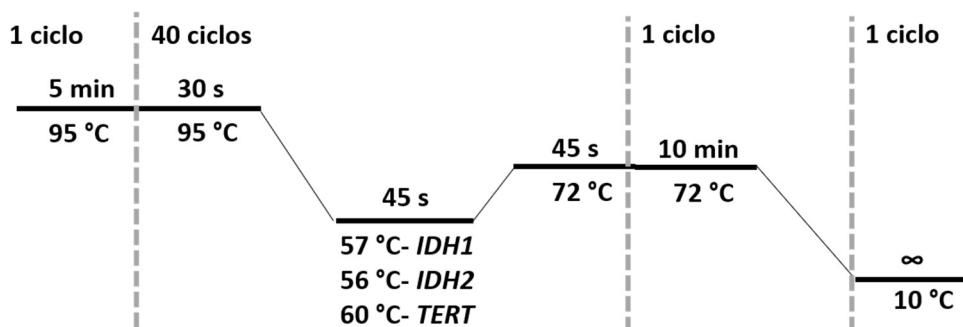


Figura 3.5: Esquema del protocolo de PCR para los tres genes estudiados. La temperatura de hibridación fue de 57 °C para *IDH1*, DE 56°C para *IDH2* y de 60°C para *TERT*.

Materiales y métodos

El producto de PCR se purificó con el reactivo *ExoSAP-IT™* (ThermoFisher Scientific), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante, para eliminar los reactivos excedentes de la reacción de PCR (desoxinucleótidos trifosfato y cebadores no utilizados).

Después de la purificación, se llevó a cabo la reacción de secuenciación utilizando para ello el kit *BigDye™ Terminator v1.1* (ThermoFisher Scientific). La reacción se realizó añadiendo 4 μl de *BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix*, 1 μl de cebador directo o inverso a una concentración de 5 μM , 5 ng del producto purificado de PCR, y H_2O destilada hasta alcanzar un volumen final de 10 μl . Para esta reacción se utilizó el mismo termociclador que para la reacción de PCR, y el protocolo usado se describe en la **Figura 3.6**.

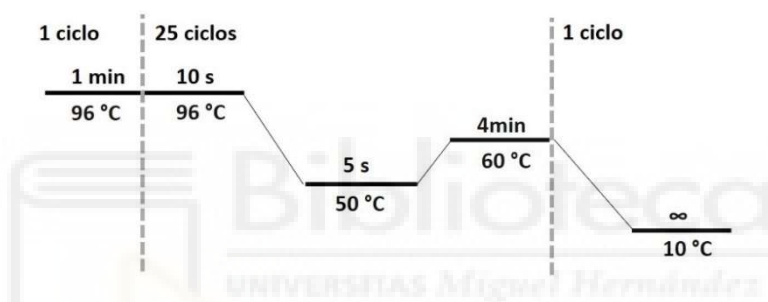


Figura 3.6: Reacción de secuencia. Esquema del protocolo del termociclador para la reacción de secuenciación (ThermoFisher Scientific).

Finalmente, se realizó una nueva purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación, mediante las columnas de purificación *DTR Gel Filtration Cartridges* (EdgeBio) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado se desnaturalizó incubándolo con 20 μl de formamida (ThermoFisher Scientific) durante 5 min a 95°C. Después, se cargó todo el producto en una placa de 96 pocillos, y se resolvió mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI-PRISM 3500 (Applied Biosystem). La visualización se llevó a cabo mediante el programa *Sequencing Analysis v5.4* (Applied Biosystem). El límite de detección de una mutación somática mediante esta técnica es aproximadamente del 10%. Por lo tanto, si el número de células que poseen el alelo mutado está por debajo de ese límite, la técnica no será capaz de resolverlos, y se producirán falsos negativos.

3.4.2 Metilación de promotores

Actualmente, existen dos técnicas para estudiar el estado de metilación del promotor de un gen, la técnica denominada amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples específica de metilación (MS-MLPA), y la PCR específica de metilación (MS-PCR). Ambas interrogan las distintas islas CpG del gen estudiado, y mediante métodos diferentes (explicados en la [sección 3.4.2.1](#) y [3.4.2.2](#) respectivamente), consiguen determinar si dicha isla está o no metilada en la muestra analizada.

En este trabajo se han utilizado las dos técnicas descritas, en función de la disponibilidad de kits comerciales. Para estudiar la metilación del promotor de *MGMT*, se utilizó la técnica de MS-MLPA y, para el promotor del gen *SOCS3* se empleó la técnica de MS-PCR, mientras que el estudio de la metilación del promotor del gen *SOCS1* se realizó mediante ambas técnicas.

3.4.2.1 MS-MLPA

Esta técnica se basa en el uso de sondas complementarias a las islas CpG del promotor del gen a estudiar. Las sondas contienen un sitio de corte para una enzima de restricción sensible a metilación (*HhaI*). Por lo tanto, estas sondas se unirán a las islas CpG del gen analizado, y si dicha isla no está metilada será cortada por la enzima de restricción, haciendo posible diferenciar una isla metilada (no digerida), de la isla que no lo está (digerida). En este procedimiento la muestra a estudiar se divide en dos alícuotas; en una de ellas no se lleva a cabo la digestión con *HhaI*, y sirve de muestra control (ninguna isla CpG estará digerida); la segunda alícuota, se somete a una reacción de digestión y posterior ligación con la enzima de restricción, en la que se eliminan las islas CpG no metiladas. Después, se realiza una PCR por separado, de ambas alícuotas, en la que se amplifican únicamente las islas CpG que no han sido digeridas. Por último, ambas alícuotas se someten a un análisis de fragmentos y se comparan entre sí, pudiendo identificar claramente que islas son las que están metiladas (**Figura 3.7**).

Materiales y métodos

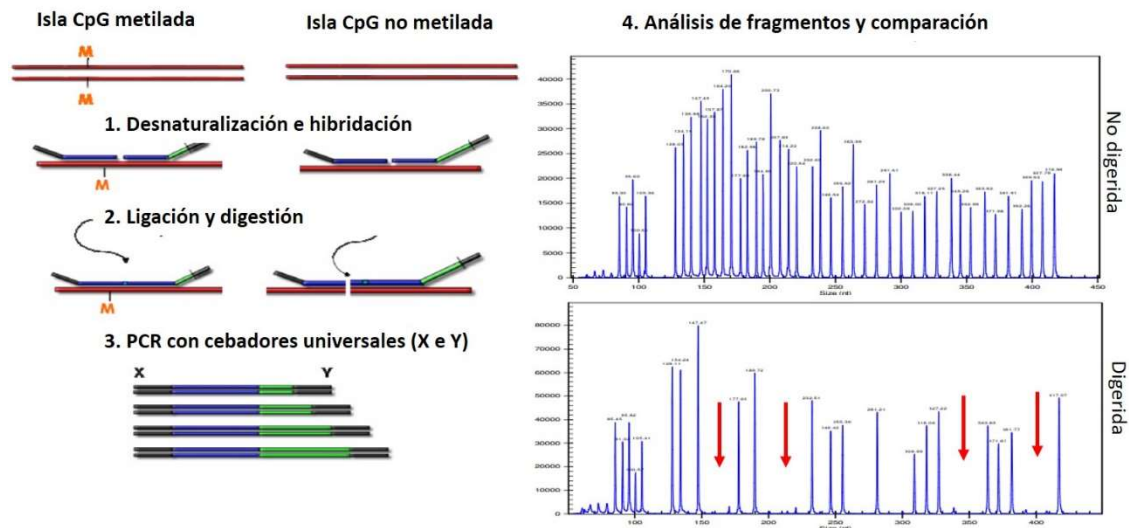


Figura 3.7: Esquema de la técnica MS-MLPA. Se detallan los diferentes pasos: desnaturalización e hibridación, ligación y digestión, PCR, análisis de fragmentos y comparación. Las flechas rojas en el electroferograma de la muestra digerida, indican algunos de los lugares donde se observa la pérdida de señal para las islas CpG no metiladas. Imagen modificada del manual de SALSA MS-MLPA kit ME011 *Mismatch Repair Genes* (MRC-Holland).

El estudio de la metilación del promotor de *MGMT* se llevó a cabo utilizando el kit *SALSA MS-MLPA ME011.B1 Mismatch Repair Genes* (MRC-Holland) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, y partiendo de 200 ng del ADN previamente extraído ([Sección 3.2.1](#)). Este kit contiene 38 sondas, 16 de las cuales carecen de la secuencia reconocida por la enzima *HhaI*, y por ello actúan como sondas control (nunca digeridas). Las sondas restantes hibridan con diferentes islas CpG de genes implicados en el sistema de reparación de errores, entre ellos *MGMT* (**Figura 3.8**). Estas islas CpG poseen la secuencia diana de la enzima *HhaI*, por ello las islas no metiladas serán digeridas y desaparecerá su señal en el electroferograma.

Los productos de PCR generados al final del protocolo del MS-MLPA (muestra digerida, y sin digerir) se resolvieron mediante una electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI-PRISM 3500 (Applied Biosystem). Los electroferogramas se visualizaron con el programa *GeneMapper 5*, a partir del cual se extrajeron las alturas de cada una de las señales (picos) de ambas alícuotas. Después, estos datos brutos se introdujeron en una plantilla suministrada por la casa comercial (MRC-Holland) para calcular la ratio de metilación de cada sonda. Esta ratio se calculó como el cociente entre la altura

normalizada de cada pico de la muestra digerida y la altura normalizada de su pico correspondiente del control no digerido.

MGMT

```
GGTCTCTGCTGGTCTGGGGGTCCCTGACTAGGGGAGCGGCACCAGGAGGGGAGAGACTCGCGCT
CCGGGCTCAGCGTAGCCGCCCGGAGCAGGACCAGGGATTCTCACTAAGCGGGCGCCGCTCCTACGA
CCCCCGCGGCTTTTCAGGACCAGCTCGGGCACGTGGCAGGTCGCTTGCACGCCCCGCGACTATCC
CTGTGACAGGAAAAGGTACGGGCCATTTGGCAAATAAGGCACAGAGCCTCAGGCGGAAGCTGG
GAAGGCGCCGCGCTTGTACCGGCCGAAGGGCCATCCGGGTGAGGCGCACAGGGCAGCGGGC
CTGCCGGAGGACCAGGGCCGGCGTCCCGGCCGTCCAGCGAGGATGCGCAGACTGCCTCAGGCCCG
GCGCCGCCGCACAGGGCATGCGCCGACCCGGTCCGGCGGGAAACACCCCGCCCTCCCGGGCTCC
GCCCCAGCTCCGCCCGCGCGCCCCGGCCCCCGCCCCGCGCGCTCTCTTGCTTTTCTCAGGTC
CTCGGCTCCGCCCGCTCTAGACCCCGCCCCACGCCGCCATCCCCGTGCCCTCGGCCCGCCCC
CCGCGCCCCGGATATGCTGGGACAGCCCGCGCCCTAGAACGCTTTGCGTCCCGACGCCCGCAG
GTCCTCGCGGTGCGCACCGTTTGCAGACTTGGTGAAGTGTCTGGGTGCGCTCGCTCCCGGAAGAGT
GCGGAGCTCTCCCTCGGGACGGTGGCAGCCTCGAGTGGTCTGCAGGCGCCCTCACTTCGCCGT
CGGGTGTGGGGCCGCCCTGACCCCCACCCATCCCGGGCGAGCTCCAGGTGCGCCCCAAGTGCCT
CCCAGGTGTTGCCAGCCTTTCCCGGGCCCTGGGGTTTCTGGACTAGGCTGCGCTGCAGTGACT
GTGGACTGGCGTGTGGCGGGGGTGTGGCAGCCCTGCCTTACCTCTAGGTGCCAGCCCCAGGC
CCGGGCCCCGGGTTCTTCCCTACCCTTCCATGCTGCCAGCTTTCCCTCCGCCAGCTGCTCCAGGA
AGCTTCCAGAAGCCCTGCGCGGGCCTTGGCTTGCAGCAACCCTTTAGCATACTTA
```

TCAC... Sonda 1 CCCG... Sonda 3
 TTGG... Sonda 2 ATG codón inicio

Figura 3.8: Extracto de la secuencia del gen *MGMT*. Se observa parte de su región promotora, y el inicio de la región codificante (ATG). Se muestran tres de las seis sondas de hibridación que posee el kit *SALSA MS-MLPA ME011.B1 Mismatch Repair Genes* (MRC-Holland), (TACAC..., TTGG..., CCCG...). Los sitios de corte de la enzima *HhaI* dentro de ellas se indican con formato subrayado.

La ratio establecida para discriminar entre el estado metilado y no metilado de cada sonda se estableció en 0,25 según lo descrito por Jeuken y colaboradores [172]. Siguiendo las indicaciones del fabricante del kit (MRC-Holland), no se tuvieron en cuenta para el análisis las sondas cuarta y sexta. MRC-Holland indica que generalmente la 4ª sonda no suele aparecer metilada, y en cambio la 6ª suele estar metilada en la mayoría de las muestras. También, se siguieron los criterios propuestos en dicho trabajo para determinar el estado global de metilación del promotor de *MGMT* en cada línea celular de GBM establecida (Tabla 3.4) [172].

El análisis de la metilación del promotor del gen *SOCS1*, se realizó utilizando el kit *SALSA MLPA ME042.B1 CIMP* (MRC-Holland), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, con una cantidad de partida de 200 ng del ADN previamente extraído (Sección 3.2.1).

Materiales y métodos

Este kit contiene 44 sondas, 12 de las cuales no tienen la secuencia de corte de la enzima HhaI, y por lo tanto se consideran sondas controles (nunca digeridas). Las demás sondas hibridan con regiones de 8 genes que definen el fenotipo hipermetilador (CIMP) en cáncer de colon, entre ellos se encuentra *SOCS1* (**Figura 3.9**). Todas ellas, poseen la secuencia reconocida por la enzima HhaI, y por lo tanto serán digeridas cuando no estén metiladas.

Tabla 3.4: Criterios para determinar el estado de metilación global del promotor de *MGMT* y *SOCS1* [172].

Metilado

3 sondas tienen una ratio $> 0,25$

1 sonda tiene una ratio entre 0,4 - 0,7, y al menos otra sonda con una ratio $> 0,25$

1 única sonda tiene una ratio $> 0,7$

Parcialmente metilado

1 o 2 sondas con una ratio ligeramente $> 0,25$

1 sonda con una ratio entre 0,4 - 0,7

No metilado

Todas las sondas tienen una ratio $< 0,25$

Los productos de PCR de las dos alícuotas (digerida y no digerida), se resolvieron en el secuenciador ABI-PRISM 3500 (Applied Biosystem), y los electroferogramas se visualizaron con el programa *GeneMapper 5*. A partir de cual, se extrajeron los datos de la altura de cada pico en cada alícuota, y se transcribieron a una plantilla suministrada por MRC-Holland para extraer las ratios de metilación de cada sonda, dicho cálculo se llevó a cabo de la misma forma que en el caso de *MGMT*. La ratio de discriminación entre isla CpG metilada y no metilada se estableció también en 0,25, y la determinación de la metilación del promotor de *SOCS1* se realizó con los criterios descritos en la **tabla 3.4**. Se consideró que los cultivos primarios presentaban CIMP positivo cuando al menos 5 de los 8 genes analizados estaban metilados.

SOCS1

```

CCCTCGAGAGGCGGGTGTGGGGCAGGTGCGAACAGGCGGGCAGAGGGCCCCGCGGGAGGGTCCAGAAGA
GAGGGAAACAGGGCCGAAGCGGTCTCGCCGGACGCCACCGCGAAAGAGAAACCAAAGTGGAGCTGGG
GGCGGGGCCGGCAGGGGGCGGGGCTCCCGCCGTCCAGCCCGCCCTCCGAGCCGGTTTAAAAGACTGG
CGCACCCAGGCCGCCCCCGCGCGGGGGTCCCGCAGCACAGCCTTCTCCGGCCCTAGCCCAAAT
CGCCCAGACCAGGCGCGGATCCAGCCTGGCCAGCAGGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG
-140pb-
GCTGAACGGATCCGCGCGGACTTGGTGTCCGTGCTCGCCCCCTAGGGCCGGGTCCGCGGGAGCGCCGC
CCTCCGGAGTTGTCCGGCCGGCGCACACCTGCCCGGCCCGCAGCGCCCCAGCTCACCTCTTTGTCTCTC
CCGAGCGCACCCCGGACGCTATGGCCACCCCTCCGGCTGGCCCCCTTCTGTAGGATGGTAGCACACAA
-210pb-
CGCCTGCGGATTCTACTGGGGGCCCTGAGCGTGCACGGGGCGCACGAGCGGCTGCGCGCCGAGCCCGTG
GGCACCTTCTGGTGGCGACAGCCGCCAGCGGAAGTCTTTTTCGCCCTTAGCGTGAAGATGGCCTCGG
-210pb-
CTCGCATCCCCCTCAACCCCGTCTCCGCGACTACCTGAGCTCCTTCCCCTTCCAGATTGACCGGCAGC
GCCCGCCGTGCACGCAGCATTAACTGGGATGCCGTGTTATTTTGTATTACTTGCCTGGAACCATGTGGG
TACCCTCCCGGCTGGGTGGAGGGAGCGGATGGGTGTAGGGGCGAGGCGCCTCCCGCCCTCGGCTGGA
GACGAGGCCGAGA
    
```

AGGG... Sonda 1	CCAG... Sonda 3	ATG Codón inicio
GGGC... Sonda 2	CCTT... Sonda 4	TGA Codón Stop

Figura 3.9: Secuencia del gen SOCS1. Se observa parte de su región promotora, y la región codificante (parte subrayada). En formato subrayado verde se muestra el codón de inicio (ATG), y en rojo el de terminación (TGA). Se indica, también, la localización de las cuatro sondas de hibridación que posee el kit *SALSA MLPA ME042.B1 CIMP* (MRC-Holland), (AGGG..., GGGC..., CCAG..., CCTT...).

3.4.2.2 MS-PCR

La técnica de MS-PCR se fundamenta en la conversión única de las citosinas a uracilos a través de un tratamiento con bisulfito. Dicho tratamiento no afecta a las citosinas metiladas, que se mantienen como citosinas. Este cambio permite, a través de dos PCR con cebadores específicos diseñados para detectar citosinas o uracilos, determinar el estado de metilación de las islas CpG (Figura 3.10).

La localización de las regiones con posibles islas CpG, y el diseño de los cebadores específicos se realizó mediante el programa *MethPrimer* [173]. En el caso del gen *SOCS1*, se encontraron 2 posibles regiones con islas CpG, una de ellas se localizaba aguas arriba del codón de iniciación, y la otra dentro del ORF (Figura 3.11). Los cebadores elegidos (Tabla 3.5) fueron aquellos que interrogaban a la primera posible isla CpG, puesto que se encontraba en la región promotora.

Materiales y métodos

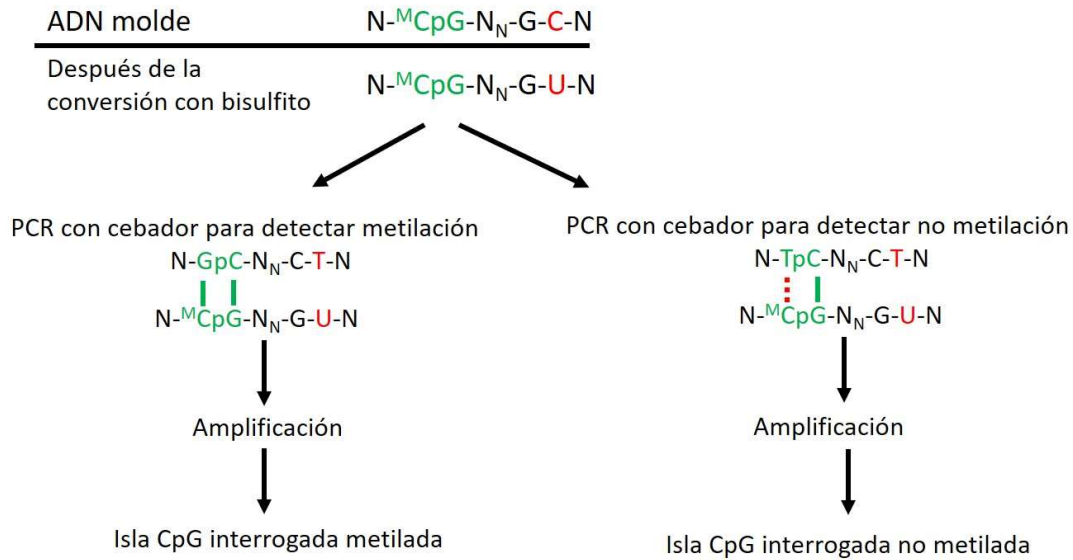


Figura 3.10: Esquema de la técnica MS-PCR. Se parte del ADN molde, el cual es tratado con bisulfito. Posteriormente se realizan dos PCR cada una con cebadores diseñados para detectar o no metilación. La amplificación, o la ausencia de ella indica si la isla interrogada está o no metilada.

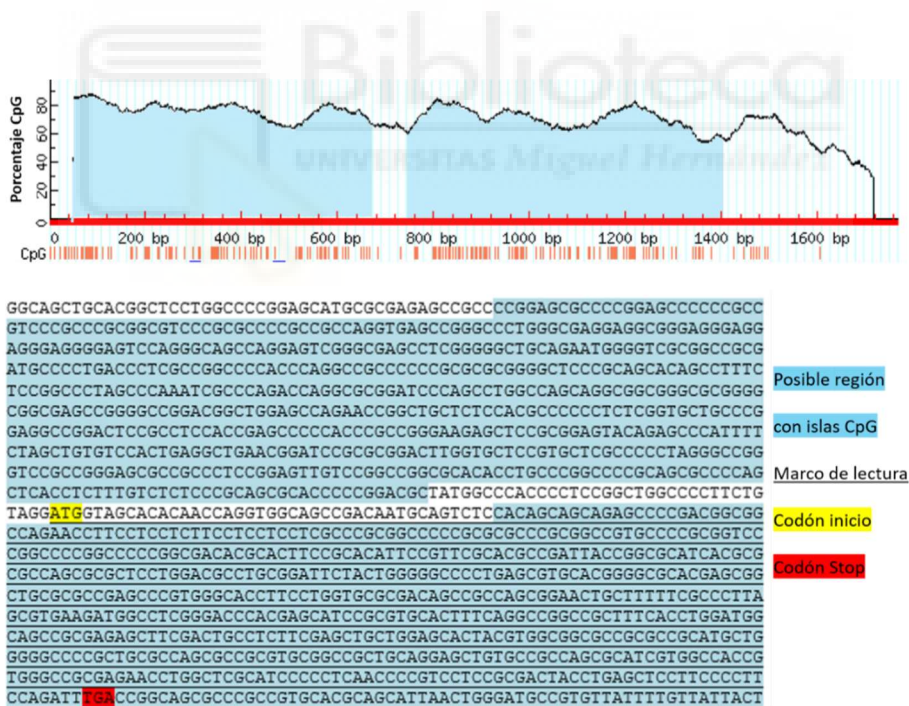


Figura 3.11: Representación de las regiones con posibles Islas CpG (parte superior del gráfico) y extracto de la secuencia de SOCS1 (parte inferior de gráfico). La localización de las regiones con posibles islas CpG predichas mediante el programa *MethPrimer* se muestra en azul; en amarillo el codón de Inicio (ATG), y en rojo el codón STOP (TGA). El ORF se indica con formato de texto subrayado.

Para *SOCS3*, el programa *MethPrimer* predijo 5 posibles islas CpG (**Figura 3.12**), 3 de ellas aguas arriba del codón de inicio, y 2 de ellas dentro del ORF. En este caso, se seleccionaron los cebadores complementarios (**Tabla 3.5**) a la isla CpG predicha número 3, por ser la más cercana al codón de iniciación.

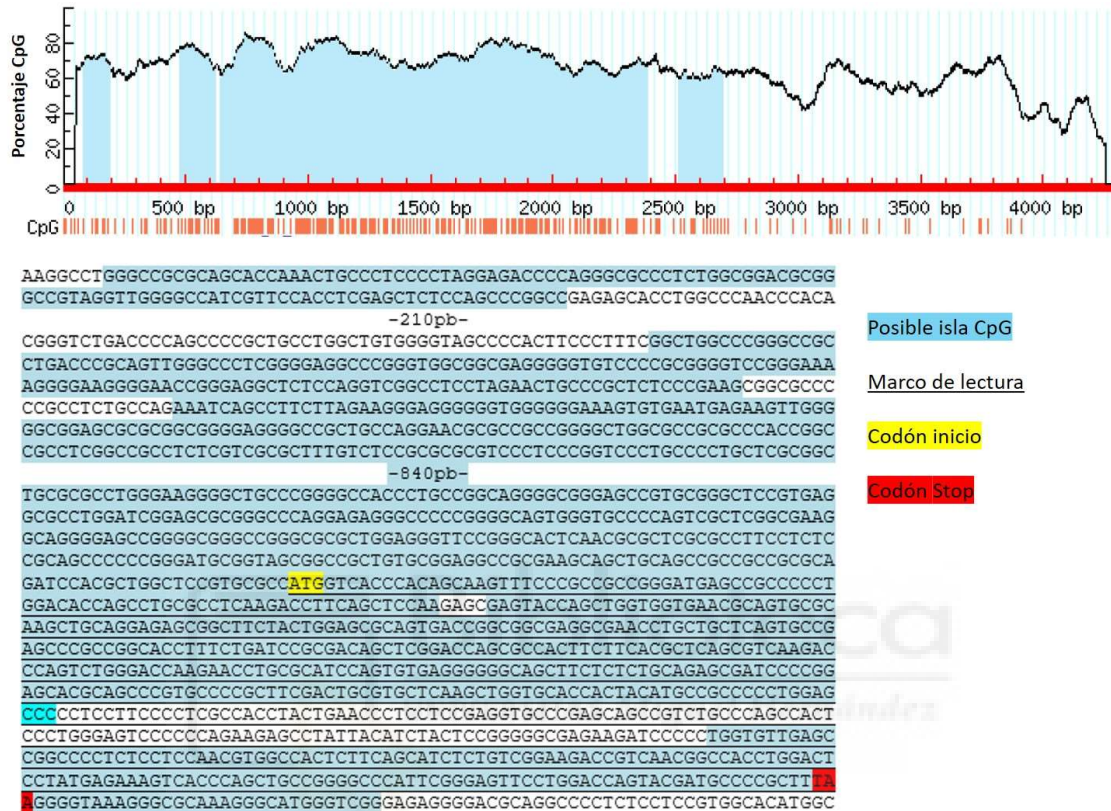


Figura 3.12: Representación de las regiones con posibles islas CpG (parte superior del gráfico) y extracto de la secuencia de *SOCS3* (parte inferior de gráfico). La localización de las regiones con posibles islas CpG predichas con el programa *Methprimer* se muestra en azul; en amarillo el codón de Inicio (ATG), y en rojo el codón STOP (TGA). El ORF se indica con formato de texto subrayado.

Además de los cebadores diseñados con *MethPrimer*, se utilizaron dos parejas de cebadores descritos anteriormente para estudiar la metilación de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en cáncer de cérvix (**Tabla 3.5**) [174]. Los cebadores específicos del gen *SOCS1* se localizaron en la segunda isla CpG predicha, y los específicos para *SOCS3* no coinciden con ninguna isla CpG predicha por el programa *MethPrimer*.

Finalmente, en el caso del gen *SOCS1* se realizó una comparativa entre los lugares de metilación interrogados por ambas técnicas, y por cada una de las parejas de cebadores (**Figura 3.13**).

Materiales y métodos

CCCTCGAGAGGGGGTCTGGGGCAGGTGCGAACAGGGCGGGCAGAGGGCCCCCGGGAGGGTCCAGAAGA
 GAGGGAACAGGGCCGAAGCGGTCTCGCCGGACGCCACCGCGGAAAGAGAAACAAAAGTGGAGCTGGG
 GGCGGGGCGGGCAGGGGGGGGGCCCTCCCGCCGTCCAGCCCGCCCTCCGAGCCGGTTTAAAGACTGG
 CGCAGGGGCGGGCCGAACAGAGCGAGCTGCGGCCGTGGCAGCTGCACGGCTCCTGGCCCCGGAGCATG
 CGCGAGAGCCGCCCGGAGCGCCCCGAGCCCCCGCGTCCCGCCCGGGCGTCCCGCGCCCCGGCC
 AGGTGAGCCGGGCCCTGGGCGAGGAGGGGGAGGGAGGGAGGGAGTCCAGGGCAGCCAGGAGTCCGG
 GCGAGCCTCGGGGCTGCAGAAATGGGGTCCGGCCCGCATGCCCTGACCCTCGCCGGCCCCACCCAGGC
 CGCCCCCGCGCGGGGCTCCCGCAGCACAGCCTTTCTCCGGCCCTAGCCCAAATCGCCCAAGCCAGGC
 GCGGATCCAGCCTGGCCAGCAGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGAGCCGGGGCCGGACGGCTGGAGCCAGA
 ACCGGGTGCTCTCCACGCCCCCTCTCGGTGCTGCCCGGAGGCCGGACTCCGCCTCCACCGAGCCCCAC
 CCGCCGGGAAGAGCTCCCGGGAGTACAGAGCCATTTTCTAGCTGTGTCCACTGAGGCTGAACGGATCCG
 CGCGGACTTGGTGTCTCGTGTCTGCCCTTAGGGCCGGGTCCGGCCGGAGCGCCGCCCTCCGGAGTTGTC
 CGGCCGGCGCACACTGCCCGCCCCCGCAGCGCCCCAGCTCACCTCTTGTCTCTCCCGCAGCGCACCCC
 CGGACGCTATGGCCACCCCTCCGGCTGGCCCTTCTGTAGGATGGTAGCACACAACCAGGTGGCAGCCG
 ACAATGCAGTCTCCACAGCAGCAGAGCCCGACGGCGGCCAGAACCTTCTCCTCTTCTCCTCTCGCC
 CGCGCCCCCGCGCGCCCGCGCTGCCCGCGGTCCCGGCCCGCCCCGGCGACACGCCTTCCGC
 ACATTCGTTCCGACGCGGATTACCGGCGCATCACGCGCGCCAGCGCGCTCCTGGACGCTGCCGATTCT
 ACTGGGGCCCCCTGAGCGTGCACGGGGCGCAGGCGGCTGCGCGCCGAGCCCGTGGGCACCTTCTTGGT
 GCGCGACAGCCCGCAGCGGAAGTGTCTTTTCGCCCTTAGCGTGAAGATGGCCTCGGGACCCACGAGCATC
 CGCGTGCACTTTCAGGCCGGCCGCTTTCACCTGGATGGCAGCCCGGAGAGCTTCGACTGCCTCTTCGAGC
 TGCTGGAGCACTAGCTGGCGGGCGCGCGCATGCTGGGGGCCCGCTGCGCCAGCGCCCGCTGCGGGC
 GCTGCAGGAGCTGTGCCCGCAGCGCATCGTGGCCACCGTGGGCGCGGAGAACCCTGGCTCGCATCCCCCTC
 AACCCCGTCTCCCGCACTACCTGAGCTCCTTCCCCTTCCAGATTTGACCGGCAGCGCCCCCGCTGCAGC
 CAGCATTAAGTGGATGCCGTGTATTTTGTATTACTTGCCCTGGAACCATGTGGGTACCCCTCCCCGGCC
 TGGGTTGGAGGGAGCGGATGGGTGTAGGGGCGAGGGCGCTCCCGCCCTCGGCTGGAGACGAGGCCGAGA
 CCCCTTCTCACCTCTTGAGGGGGTCTCCCCCTCCTGGTGTCTCCCTTGGGTCCCCCTGGTTGTGTAGC
 AGCTTAACTGTATCTGGAGCCAGGACCTGAACTCGCACCTCCTACCTC

AGGG... Sonda 1 (MLPA) GGGC... Sonda 2 (MLPA) CCAG... Sonda 3 (MLPA)
 CCTT... Sonda 4 (MLPA) CCCA... MS-PCR TGAA MS-PCR
 ATG Codón inicio TGA Codón Stop marco de lectura

Figura 3.13: Localización de las islas CpG interrogadas mediante las dos técnicas utilizadas: MS-MLPA y MS-PCR en la secuencia del gen *SOCS1*. Se muestran las sondas que incluye al kit *SALSA MLPA ME042.B1 CIMP*, y las islas CpG que interrogan los cebadores diseñados por Kim y colaboradores (naranja) [174], y los diseñados en este trabajo (rosa).

El tratamiento con bisulfito del ADN procedente de los cultivos primarios se llevó a cabo con el kit *EpiJET Bisulfite Conversion* (ThermoFisher Scientific). Se utilizó el ADN anteriormente extraído (Sección 3.2.1), y almacenado a -20 °C. La cantidad de ADN de partida fue de 500 ng a la cual se le añadieron 120 µl de reactivo de modificación. Esta mezcla se incubó durante 10 min, a 98°C, y después durante 150 min. a 60°C, durante estas incubaciones tuvo lugar la modificación de las citosinas no metiladas en uracilos. La eficiencia de la conversión es mayor del 99%, según el fabricante del kit. Después, a la solución anterior se le añadieron 400 µl de Tampón de unión, y se traspasó todo el volumen a una columna de purificación. Esta columna posee una membrana de sílica-gel en la que, mediante una centrifugación a 13.000 rpm durante 30 s, queda retenido el ADN modificado. A continuación, se descartó el sobrenadante, se añadieron 200 µl de tampón de desulfonación sobre la columna, y ésta se incubó 20 min a T_a. Después de la

incubación, se centrifugó la columna a 12.000 rpm, 30 s, se descartó el sobrenadante y se le adicionaron 200 μ l de tampón de lavado, para a continuación volver a centrifugarla a 12.000 rpm durante 1 min. Este paso se repitió dos veces. Finalmente, se añadieron sobre la columna 20 μ l de tampón de elución, y se centrifugó la columna a 12.000 rpm, 1 min para eluir el ADN retenido ya purificado. El ADN modificado se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

Para analizar el estado de metilación de las islas CpG interrogadas se realizaron cuatro PCR diferentes para cada línea celular. Cada una de ellas contenía 10 μ l de *AmpliAq Gold 2x* (ThermoFisher Scientific), 1 μ l de la mezcla de los cebadores específicos de metilación/no metilación para cada gen (**Tabla 3.5**), con una concentración de 20 μM , 1 μ l de ADN modificado, y 4 μ l de agua para llegar al volumen final de 20 μ l. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (ThermoFisher Scientific). El protocolo de PCR se detalla en la **Figura 3.14**.

Los productos de amplificación se resolvieron en un gel con una concentración de agarosa del 2% en tampón TBE 1x (Tris-Borato-EDTA), suplementado con el reactivo para la tinción de ácidos nucleicos *RedSafe* (Ecogen) a una dilución 1/20.000. En el gel se cargaron 8 μ l del producto de PCR mezclado con 2 μ l de tampón de carga 5x (ThermoFisher Scientific). Además, se cargaron 3 μ l del marcador de masa molecular comercial 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen) para identificar el tamaño de los fragmentos amplificados. La separación se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis horizontal, en tampón TBE 1x, a un voltaje constante de 90V durante 60 min. Pasado ese tiempo se visualizó mediante un trans-iluminador exponiendo el gel a una λ de 312 nm.

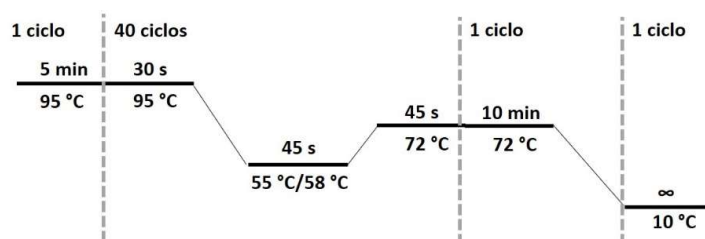


Figura 3.14: Protocolo de PCR para los genes *SOCS1* y *SOCS3*. Se indica la temperatura de hibridación de los cebadores específicos de *SOCS1* [174], los cebadores específicos de metilación de *SOCS1*, y *SOCS3* diseñados con *MethPrimer* que fue de 58 °C; y la de los cebadores restantes que en este caso fue de 55 °C.

Materiales y métodos

Tabla 3.5: Cebadores utilizados en la técnica de MS-PCR para analizar el estado de metilación de cada una de las islas CpG analizadas. ¹Cebadores descritos anteriormente [174]; ²Cebadores diseñados para este trabajo con el programa *MethPrimer*. Se marcan en rojo los nucleótidos que cambian en el cebador específico de metilación, y en el de no metilación.

		Cebador directo	Cebador inverso
SOCS1	Metilado ¹	5'TGAAGATGGTTT C GGGATTTA C GA3'	5'ACAACCTCTACAAC G ACCGCAC G 3'
	No Metilado ¹	5'TGAAGATGGTTT T GGGATTTA T GA3'	5'CACAACCTCTACAAC A ACCA C ACA3'
	Metilado ²	5'TTTAAAT C GTTTAGATTAGG C GC3'	5'AAAAATAAACTCTATACTCC G CGAA3'
	No Metilado ²	5'TTTAAAT T GTTTAGATTAGG T GTGG3'	5'AAAAATAAACTCTATACTCC A CAA3'
SOCS3	Metilado ¹	5'TGTAGATTTTAGTGTATGAAAG C GT3'	5'GAAAACCGAAAATTA A AAAC G TA3'
	No Metilado ¹	5'TGTAGATTTTAGTGTATGAAAG T GT3'	5'CCAAAACCAAAAATTA A AAAC A TA3'
	Metilado ²	5'TTTTT C GGTTTTTGT T TTTGT C 3'	5'ACCTTCTATAATATTTAATCACTACT C GC3'
	No Metilado ²	5'TTTTT T TGGTTTTTGT T TTTGT T 3'	5'ACCTTCTATAATATTTAATCACTACT A CA3'

3.4.3 Estudio de expresión génica mediante qRT-PCR

3.4.3.1 Reacción de retrotranscripción

El ARN extraído de los cultivos primarios (Sección 3.2.2), se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) para posteriormente realizar la reacción de q-PCR. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific). El volumen final fue de 20 µl, conteniendo 2 µl de *tampón* de retrotranscripción, 2 µl de cebadores aleatorios, 0.8 µl de desoxinucleótidos trifosfato, 1 µl de la enzima retrotranscriptasa, 1 µl de inhibidor de ARNasas, 1 µg de ARN, y agua libre de ARNasas hasta llegar al volumen final.

La reacción se realizó en el termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (ThermoFisher Scientific), y el protocolo consistió en una primera incubación durante 10 min, a 25°C, seguida de 120 min a 37°C, y para finalizar una última incubación a 85°C, 5 min.

El producto de la retrotranscripción se cuantificó mediante en el espectrofotómetro NANODROP 1000 (ThermoFisher Scientific), y se diluyó hasta una concentración igual a 200 ng/µl. Se almacenó a -20 °C hasta la realización de la q-PCR.

3.4.3.2 q-PCR

Las reacciones de q-PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de reacción estaba formada por un 1 μ l de ensayo *TaqMan* (cebadores + sonda) prediseñado específicamente para cada gen estudiado (*TaqMan Gene Expression Assays*; ThermoFisher Scientific) (**Tabla 3.6**), 10 μ l de *TaqMan Gene Expression Master Mix 2 \times* (ThermoFisher Scientific), 4 μ l de cada muestra a estudiar, y agua de grado molecular hasta alcanzar el volumen final. Como control endógeno se utilizó el ensayo *GAPDH-VIC* (ThermoFisher Scientific) diseñado para amplificar el mensajero del gen de la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), ya que este gen se expresa de forma constitutiva en las células, y su expresión no varía en respuesta a los tratamientos empleados. Como muestra normalizadora se utilizó la más apropiada en cada estudio: para analizar las expresiones basales de los genes estudiados se utilizó un *pool* de ARN de cerebro sano procedente del lóbulo temporal de 5 adultos (Bionova), y para los estudios comparativos con muestras tratadas se empleó el control sin tratar. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, asimismo, se realizaron controles negativos que contenían agua en lugar de ADNc. El equipo empleado fue el termociclador 7.300 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). El protocolo de q-PCR se detalla en la **Figura 3.15**.

Tabla 3.6: Referencias de los ensayos prediseñados *TaqMan* utilizados para estudiar la expresión de los genes *SOCS1*, *SOCS3*, *NRF2*, *PTK6* y *MSK1*.

Gen a estudiar	Ensayo TaqMan
<i>SOCS1</i>	Hs00705164_S1
<i>SOCS3</i>	Hs02330328_S1
<i>NRF2</i>	Hs00975961_G1
<i>PTK6</i>	Hs00178742_M1
<i>MSK1</i>	Hs01046597_M1
<i>MGMT</i>	Hs01037698_M1

Materiales y métodos

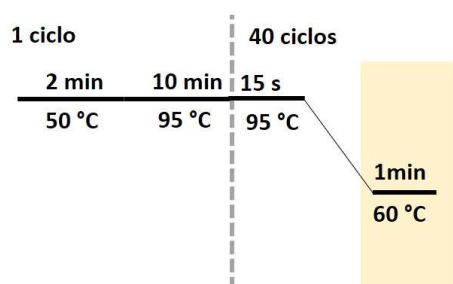


Figura 3.15: Protocolo de la reacción de q-PCR. En amarillo, se señala la fase en la que el sistema obtiene los datos de fluorescencia de la placa.

Al terminar la q-PCR, el programa utilizado calcula de forma automática el umbral de expresión y el nivel de ruido basal, aportando como resultado los datos de *threshold cycle* (Ct) para cada una de las muestras estudiadas. Estos datos se transcribieron a una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel (2016), en donde se normalizaron los resultados de expresión utilizando el control endógeno, y se calculó el valor de expresión relativa de cada gen con respecto a la muestra normalizadora, denominado $\Delta\Delta C_t$ (**Figura 3.16-A**). Una vez obtenido este valor, y dependiendo del tipo de experimento realizado, se calculó el valor de cuantificación relativa (RQ) (**Figura 3.16-B**) o el valor de *Fold Change* (FC) (**Figura 3.16-C**). Ambos valores indican la expresión relativa de cada gen con respecto a la muestra calibradora, pero en diferentes escalas. El valor de RQ toma valores entre 0 y 1: si RQ es igual a 1, significa que no existen diferencias de expresión entre la muestra estudiada y la muestra normalizadora; si RQ es menor de 1, indica que la muestra estudiada presenta una menor expresión que la normalizadora; y si RQ es mayor que 1, la muestra estudiada sobreexpresa el gen con respecto a la muestra normalizadora. En cambio, el valor de FC puede tomar infinitos valores tanto positivos como negativos, indicando el número de veces por encima (valores positivos), o por debajo (valores negativos) que la muestra estudiada expresa el gen de interés con respecto a la muestra normalizadora. Después, se realizó el análisis descriptivo de los datos calculando la media y la desviación típica de los valores de expresión relativa de cada muestra estudiada. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante los programas Microsoft Excel (2016), GraphPad Prism 5 (2007), y SPSS Statistics v24 (IBM, 2016). El criterio seguido fue el propuesto por Schmittgen y colaboradores [175] en el que se establece que las alteraciones de expresión son significativas cuando el valor de RQ se encuentra por encima de 2 o por debajo de 0,5, lo que corresponde a valores de FC ± 2 respectivamente.

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{A} \\
 \Delta\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})_{muestra} - (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})_{calibrador} \\
 \\
 \mathbf{B} \qquad \qquad \qquad \mathbf{C} \\
 \text{"Relative quantification (RQ)}" = 2^{-\Delta\Delta Ct} \qquad \qquad \text{"Fold Change (FC)}" = \text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Log}_2 \text{RQ}
 \end{array}$$

Figura 3.16: Ecuaciones para el análisis de los datos de q-PCR. Fórmulas para calcular la expresión relativa, $\Delta\Delta Ct$ (A), el valor de RQ (B) y de FC (C) de cada gen estudiado en cada muestra [175].

3.5 Ensayos celulares

3.5.1 Tratamiento quimioterapéutico

En este trabajo se ha utilizado como fármaco quimioterápico BCNU (Sigma Aldrich) cuya solubilidad es de 20 mg/ml en etanol, y la concentración inicial de partida es de 93 mM. Se realizaron estudios previos con TMZ, que es el fármaco quimioterapéutico de primera línea, pero se descartó su utilización en esta tesis doctoral por su baja solubilidad en DMSO (10 mg/ml), y por el interés de probar nuevos fármacos no tan estudiados.

El tratamiento quimioterapéutico se llevó a cabo en placas de 6 pocillos para hacer estudios de ciclo celular y viabilidad mediante el analizador celular MUSE (Merk Millipore).

El tratamiento con el fármaco se inició transcurridas 24 h de la siembra celular inicial, en este momento se añadió al medio de cultivo BCNU a concentraciones crecientes desde 25 μM hasta 100 μM . En este tratamiento, el efecto del etanol sobre el ciclo y la viabilidad celular se descartó mediante controles en los primeros ensayos. Además, el volumen necesario de etanol para conseguir las concentraciones deseadas era despreciable considerando el volumen total de medio DMEM/F12 en el pocillo, por lo que no se incluyeron controles con el mismo volumen de etanol.

Después de la adición del fármaco, se dejó el tratamiento durante 24 h para estudios de ciclo y viabilidad celular. Pasado este tiempo se paró el tratamiento, se procesaron y se almacenaron las células de la forma adecuada dependiendo del tipo de estudio que se fuese a realizar posteriormente.

3.5.2 Tratamiento radioterápico

La realización de este de tratamiento se realizó en colaboración con la Unidad de Oncología Radioterápica del HGUE. La dosis de radioterapia elegida se fijó en 7 Gy, administrada con una tasa de 6 Gy/min. La elección de esta dosis estuvo motivada por la necesidad de irradiar las líneas celulares a una dosis subletal que nos permitiese analizar la radiorresistencia de estas líneas, y los efectos de potenciación o inhibición sobre este tratamiento.

Para llevar a cabo la irradiación de las células, se sembraron las líneas celulares de GBM en placas de 6 pocillos como se detalla en el [apartado 3.1.3](#). Transcurridas 24 h de la siembra, se añadieron a cada pocillo de la placa 13 ml de DPBS, se selló con Parafilm (Sigma Aldrich) y se trasladó a la Unidad de Oncología Radioterápica. Allí, se irradió bajo la supervisión de un radiofísico, con el mismo instrumento utilizado para administrar el tratamiento radioterápico a los pacientes, el acelerador lineal de electrones VARIAN 2100C.

Después del tratamiento, la placa con las células irradiadas se devolvió a la Unidad de Investigación y se descartó el DPBS, siendo reemplazado por 2ml de medio de cultivo DMEM/F12 completo. La placa se introdujo nuevamente en el incubador a 37°C/5% CO₂, y se mantuvo allí el tiempo determinado para cada estudio. Pasado ese tiempo, se recogieron, procesaron y almacenaron las células para los análisis posteriores.

3.5.3 Alteración de la expresión génica

3.5.3.1 ARN de interferencia

Este tipo de ensayo se basa en la disminución transitoria de la expresión del gen de interés utilizando para ello un ARN de interferencia comercial. La presencia de dobles cadenas de ARN (ARNdc) de gran tamaño en el citoplasma de las células eucariotas provoca la activación de la respuesta de interferón, que entre otras cosas conlleva el silenciamiento no específico de diversos genes. El procesamiento de estas cadenas pasa por la activación de la ARNasa III, denominada DICER, que corta estas largas cadenas en secuencias más cortas de 21 a 31 nucleótidos. Los ARN interferentes sintéticos de pequeño tamaño (ARNsi) mimetizan estas secuencias cortas de ARN, sin activar la respuesta de interferón puesto que no se han creado como procesamiento de las ARNdc

de gran tamaño. Una vez en el interior de la célula, se convierten en funcionales a través de una quinasa celular que fosforila su extremo 5', y forman el complejo de inducción de silenciamiento (RISC) que está compuesto por una helicasa que desenrolla el ARNsi, y una ribonucleasa que corta la secuencia diana. El reconocimiento de la secuencia diana se realiza mediante la cadena antisentido desenrollada del ARNsi, que es complementaria al ARN mensajero (ARNm) del gen a silenciar. Por lo tanto, dicho ARNm es cortado impidiendo su traducción a proteína, y produciendo la reducción de la expresión del gen deseado [176] (**Figura 3.17**).

En estos ensayos se utilizaron las células procedentes de las líneas celulares de GBM sembradas en placas de 6 pocillos (apartado 3.1.3), reduciendo a 100.000 el número de células inicial debido a larga duración de este tipo de experimento.

Para llevar a cabo la transfección se prepararon dos soluciones; la primera de ellas contenía 2,5 µl del ARNsi comercial específico del gen a silenciar (Invitrogen) a una concentración de 10 µM diluido en 247,5 µl de medio OPTI-MEM (GIBCO®) por pocillo, a la segunda se le añadieron 5 µl de lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) y 245 µl de OPTI-MEM por pocillo. Estas dos soluciones se incubaron durante 5 min a T_a, y después, se mezclaron en una proporción 1:1, obteniendo un volumen final de 500 µl. Esta mezcla se incubó de nuevo 20 min, a T_a. Durante este tiempo, se cambió el medio de las células por 1,5 ml de medio DMEM/F12 suplementado con FBS AL 10% v/v, pero sin antibiótico ya que no es compatible con la lipofectamina. Una vez transcurridos los 20 min, se añadieron los 500 µl de la mezcla de transfección a cada pocillo, gota por gota y repartiendo la mezcla por toda la superficie del pocillo. Como control negativo se añadió a uno de los pocillos la misma solución, pero realizada con un ARNsi inespecífico (Invitrogen).

Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C/5% CO₂ por un periodo de 48 h. En este momento se recogieron las células de los pocillos destinados a extraer ARN (apartado 3.2.2), y analizar la bajada de expresión mediante qRT-PCR (apartado 3.4.3), y seguidamente se realizó el tratamiento radioterápico según el protocolo detallado en el apartado 3.5.2.

Materiales y métodos

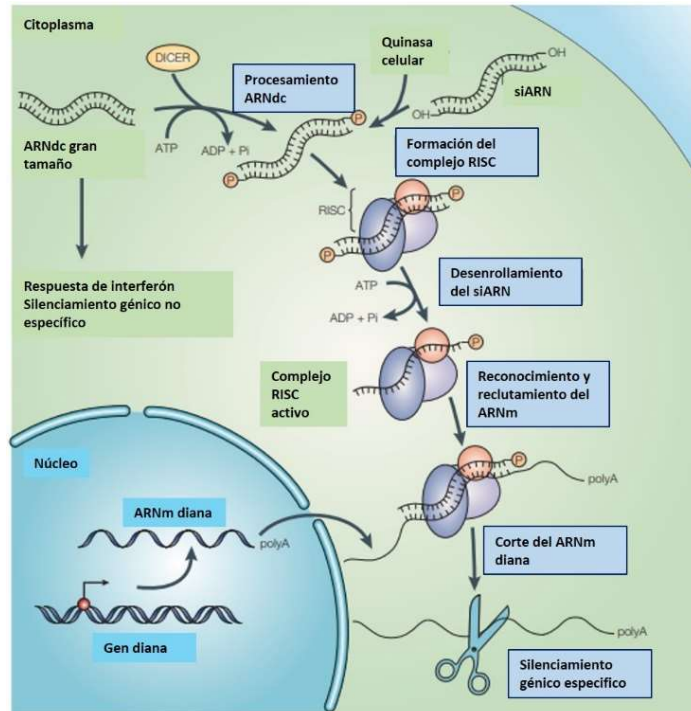


Figura 3.17: Proceso de silenciamiento génico mediante ARNsi. Se muestra el procesamiento de las dobles cadenas largas de ARN, mediante la formación del complejo RISC, y el punto donde se incorporan los ARNsi para llevar a cabo el silenciamiento génico específico sin disparar la respuesta de interferón. Posteriormente, se produce la activación de complejo RISC mediante el desenrollamiento del ARNsi, que reconoce y recluta el ARNm diana. Este ARNm es cortado por la helicasa incluida en el complejo y con ello se produce el silenciamiento del gen deseado [176].

3.5.3.2 Plásmido de sobreexpresión

Esta técnica se realizó con el fin de aumentar la expresión del gen *SOCS3*. Para ello, se utilizó una construcción plasmídica comercial (Sinobiological) que contiene la ORF de la proteína *SOCS3* bajo el promotor del citomegalovirus humano y un *cassette* de resistencia a higromicina, cuya expresión está controlada por el promotor del virus SV40. La transfección se llevó a cabo partiendo de líneas celulares de GBM sembradas como en el apartado anterior en medio DMEM/F12 sin antibiótico. Se prepararon las dos soluciones de transfección, una de ellas con 5 μ l de lipofectamina 2.000 (Invitrogen) y 245 μ l de OPTI-MEN (GIBCO®) por pocillo; y la otra con 1,5 o 2,5 μ l del plásmido de *SOCS3* con una concentración 10 μ g/ml diluido en 247,5 μ l de medio OPTI-MEM por pocillo. Se incubaron 5 min a T_a , se mezclaron en una proporción 1:1, y se volvieron a incubar durante 20 min antes de añadir la mezcla gota por gota al cultivo a transfectar. Se cultivaron durante 48 h a 37°C/5% CO_2 . Tras las 48 h, se reemplazó el medio por medio DMEM/F12 completo con higromicina, y se mantuvieron en ese medio durante

una semana para seleccionar únicamente las células que habían incorporado el plásmido. Posteriormente se extrajo ARN ([apartado 3.2.2](#)) para evaluar la subida de expresión del gen *SOCS3*, y se sometió a las células transfectadas a una sesión de radioterapia ([apartado 3.5.2](#)).

3.5.3.3 Tratamiento con tricostatina A (TSA)

Las deacetilasas de histonas (HDAC) son enzimas involucradas en la regulación epigenética de la expresión génica. Se encargan, principalmente, de eliminar grupos acetilos de los residuos de lisina de las histonas, lo que conlleva un empaquetamiento de la cromatina y con ello una reducción de la expresión de determinados genes. Debido a la cantidad de alteraciones epigenéticas que portan muchos tipo de tumores, se está empezando a evaluar el efecto de los inhibidores de HDAC (iHDAC) como una nueva opción para el tratamiento de distintos cánceres [177,178]. El TSA es un iHDAC que en altas concentraciones produce un arresto en las fases G₁ y G₂M del ciclo celular, y posterior muerte celular [179]. A bajas concentraciones, es capaz de modular los niveles de expresión de ciertos genes actuando sobre las HDAC [180].

El tratamiento con TSA (Sigma Aldrich) se realizó en la línea celular HGUE GB39, y utilizando placas de 6 pocillos. En este ensayo, se aplicaron 5 concentraciones crecientes de TSA (25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM y 250 nM) 16 h antes de la irradiación celular. Transcurrido este pretratamiento, se guardó una muestra de células para la posterior extracción de ARN ([apartado 3.2.2](#)), y seguidamente se irradiaron los pocillos restantes.

3.6 Evaluación del efecto de los tratamientos

3.6.1 Estudio de la viabilidad celular

Este ensayo se utilizó para determinar el número de células viables después de cada tratamiento realizado. Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos ([apartado 3.1.3](#)) y se cultivaron durante 24 h a 37°C/5% CO₂. Después se realizó el tratamiento radio o quimioterápico, y las células se volvieron a incubar durante 24, 48 o 72 h dependiendo del experimento. Pasado ese tiempo, se recogió el medio de cultivo en un *corning* de 15 ml, con el fin de recolectar las células que se habrían despegado del pocillo por efecto del tratamiento. Para recoger las células restantes, aún adheridas a la placa de cultivo, se añadieron 500 µl de Tripsina-EDTA 0,01% en el pocillo, y una vez las

Materiales y métodos

células se hubieron despegado, se añadió 1 ml de medio DMEM/F12 (GIBCO®) fresco para neutralizar la tripsina, y todo ello se volvió a recoger e introducir en el *corning* de 15ml. Este *Corning* se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1ml de DPBS 1×.

Seguidamente, se mezclaron 50 µl de esta suspensión celular con 450 µl del reactivo de viabilidad proporcionado en el kit comercial *Muse Count & Viability* (Merck Millipore), se incubó 5 min a T_a , y se analizó mediante el analizador celular Muse (Merck Millipore) para obtener los porcentajes de las células viables de cada muestra (**Figura 3.18**).

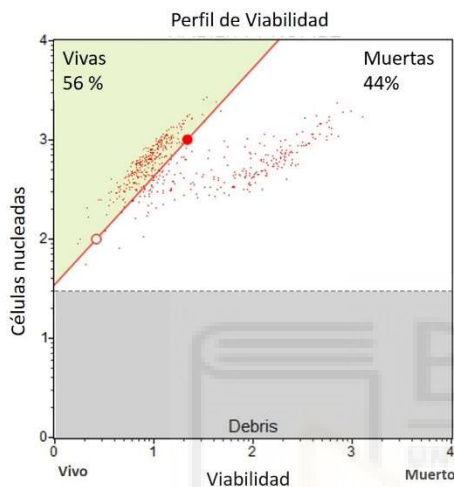


Figura 3.18: Perfil de viabilidad de una de las líneas de GBM obtenido a través de analizador celular Muse (Merck Millipore). A la izquierda se muestran las células viables y a la derecha las células no viables. La parte de abajo en gris define el *debris*, ruido que no debe considerarse como material celular.

3.6.2 Estudio del ciclo celular

Este análisis se utiliza para cuantificar el porcentaje de células presente en cada fase del ciclo celular en un momento concreto. El contenido de ADN presente en cada célula varía según la fase del ciclo celular en la que ésta se encuentre, por ello se utilizó el porcentaje de células por fase celular para determinar la distribución del ciclo celular en cada uno de los ensayos realizados. La técnica que se empleó está basada en el marcaje del ADN con un agente intercalante fluorescente, en este caso se utilizó yoduro de propidio (Sigma Aldrich). Este fluoróforo se excita con una λ de 480 nm y emite fluorescencia roja a 620 nm, aproximadamente. El yoduro de propidio se intercala en los ácidos nucleicos de las células, de forma que, tras la digestión del ARN, éstas emiten mayor o menor fluorescencia, en función de su contenido de ADN. Según esto, las células que se encuentran en las fases G_2 y M del ciclo celular y que, por lo tanto, han superado la fase de síntesis y han duplicado su material genético (dotación cromosómica tetraploide (4n)), dan lugar a una señal de fluorescencia cuya intensidad duplica a la de

las células que se encuentran en fase G₁ y tienen dotación cromosómica diploide (2n). La señal fluorescente que emiten las células que se encuentran en la fase S o de síntesis se encuentra comprendida entre la que emiten las células de las fases G₁ y G₂/M. Por su parte, las células muertas presentan el ADN fragmentado y emiten fluorescencia de menor intensidad que las que tienen el ADN íntegro (fase SubG₁) (**Figura 3.19**).

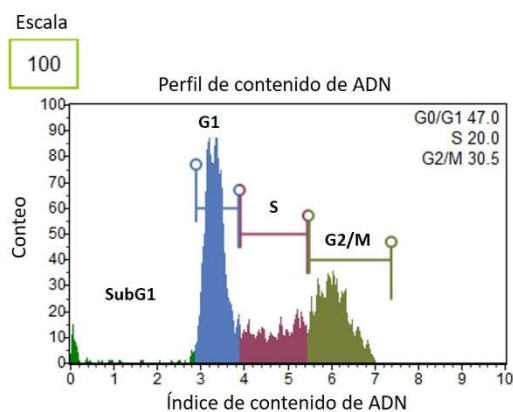


Figura 3.19: Perfil del ciclo celular de una de las líneas celulares de GBM control obtenida a través del analizador celular Muse (Merck Millipore). En el eje de ordenadas se representa el número de células analizadas, y en el de coordenadas el contenido en ADN calculado a través de su emisión de fluorescencia.

La recolección de las células se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior ([apartado 3.6.1](#)), aunque en este caso el precipitado de células obtenido después de cada tratamiento se resuspendió en etanol frío al 75% en DPBS 1×, y se mantuvo durante al menos 2 h, a -20°C .

Para llevar a cabo el análisis del ciclo celular, estas células se centrifugaron a 1.000 rpm, 5 min, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se disolvió en 500 μl de una solución que contenía DPBS-Tritón al 0,5% para permeabilizar las células; ARNasa A (Serva) a una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$ para degradar el ARN; y yoduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$ como agente intercalante. Después, se incubaron durante 30 minutos a T_a en oscuridad, y se analizaron mediante el analizador celular Muse (Merck Millipore) para obtener los porcentajes de las células en cada fase del ciclo celular.

3.7 Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó una estadística descriptiva con el programa GraphPad Prism v5, calculando la media y la desviación estándar para los valores de expresión de todos los genes, de viabilidad y ciclo celular en todas las líneas celulares. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba estadística de *Shapiro-Wilk*, y la homocedasticidad se comprobó utilizando la prueba estadística de *Levene*. Las comparaciones entre dos

Materiales y métodos

grupos se realizaron mediante la prueba estadística *T-Student* en conjuntos de datos paramétricos y homocedásticos, y utilizando la prueba estadística no paramétrica *U-Mann Withney* para los datos que no cumplieran los principios de normalidad y homocedasticidad. Para las comparaciones de más de dos grupos se utilizó el contraste ANOVA (datos paramétricos y homocedásticos), o el de *Kruskal Wallis* (datos no paramétricos ni homocedásticos). En todos los casos, se fijó un p-valor $< 0,05$ para considerar que las diferencias entre los conjuntos de datos fueran significativas y no debidas al azar. El programa utilizado para este análisis estadístico fue SPSS Statistics v24 (IBM; 2016).



Capítulo 4

Resultados



4.1 Obtención y caracterización del modelo de estudio: líneas de celulares procedentes de cultivos primarios de GBM

4.1.1 Caracterización celular y morfológica

El número de aspirados cerebrales recepcionados en la Unidad de Investigación durante la realización de este trabajo fue de 15. Sin embargo, el total de aspirados cerebrales procesados por nuestro grupo de investigación desde el inicio de este proyecto asciende a 52. En el laboratorio de Genética Molecular del HGUE se mantienen criopreservadas muestras celulares de los aspirados procesados, así como material genético (ADN y ARN) de todos ellos. Estos aspirados cerebrales fueron estudiados en la Unidad de Anatomía Patológica del HGUE, y diagnosticados como GBMs, según la clasificación de tumores del SNC propuesta por la OMS en 2007 [34].

A partir de los aspirados cerebrales de GBM se realizaron cultivos primarios. Durante los primeros pases, se observó una mezcla de células con distintas morfologías, y habitualmente formando agregados (**Figura 4.1**), que adquirió uniformidad progresivamente durante los pases posteriores. La cinética de crecimiento de los cultivos primarios durante los 10 primeros pases fue lenta, y se consideró como la fase crítica del establecimiento de los cultivos primarios, ya que no todos los aspirados cerebrales puestos en cultivo adquirieron la capacidad dividiéndose indefinidamente, sino que cesaron su crecimiento en pases anteriores.

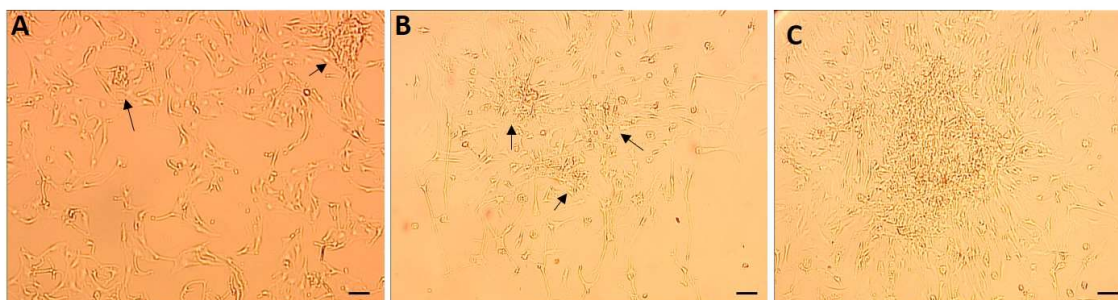


Figura 4.1: Cultivos primarios de GBM en pases tempranos. Se muestran los cultivos primarios HGUE GB 37 (A), HGUE GB 39 (B), y HGUE GB 42 (C) durante la primera fase de su desarrollo como cultivos primarios de GBM. Se observa la baja densidad celular, las diferencias morfológicas entre las distintas células, y la formación de agregados (marcados con flechas negras). Barra de escala: 20 μ m.

Resultados

A partir del pase 10, el cultivo primario creció formando una monocapa de células morfológicamente uniformes, con forma de huso y con ramificaciones. La cinética de crecimiento en estos pases se caracterizó por ser rápida. Los cultivos celulares mantenidos a 37°C/5% CO₂, duplicaron su cantidad de células en 24 h, y alcanzaron el 90% de confluencia requerida para realizar un nuevo pase a los 4 o 5 días. Una vez alcanzada esta fase, los cultivos primarios mantuvieron la tasa de crecimiento y sus características moleculares estables durante un número indeterminado de pases. Por ello, se consideró que los cultivos habían conservado la capacidad de reproducirse de forma ilimitada, conformando nuevas líneas celulares que pueden ser utilizadas como modelo para estudiar el GBM.

De los 15 aspirados cerebrales recepcionados durante este trabajo, 5 formaron nuevas líneas celulares, y fueron los utilizados en este trabajo, junto con uno que ya se había establecido anteriormente en el grupo de investigación. Analizándose finalmente un total de 6 líneas celulares establecidas. La nomenclatura empleada para identificar los cultivos primarios estaba compuesta por la abreviatura del hospital (HGUE); seguida del tipo de tumor, en este caso glioblastoma (GB); y del número de recepción. Así, las 6 líneas celulares de GBM elegidas como modelo de estudio fueron: HGUE GB 16, HGUE GB 37, HGUE GB 39, HGUE GB 40, HGUE GB 42 y HGUE GB 48 (**Figura 4.2**).

Con el fin de confirmar el carácter glial de las líneas celulares establecidas, se realizó un ensayo inmunocitoquímico acoplado a microscopía confocal dirigido a detectar la expresión de la proteína fibrilar ácida glial (GFAP), la cual se considera un marcador de células gliales, y en particular de astrocitos [181]. Para ello, se realizó una inmunotinción con un anticuerpo específico contra la proteína GFAP, que mediante microscopía confocal. Todas las líneas celulares de GBM establecidas mostraron una inmunotinción positiva para el anticuerpo anti-GFAP, y por lo tanto se confirmó la preservación de la naturaleza glial durante el proceso de establecimiento de dichas líneas. La proteína GFAP se localizaba dispersa por el citoplasma de todas las células de las líneas celulares de GBM establecidas (**Figura 4.3**).

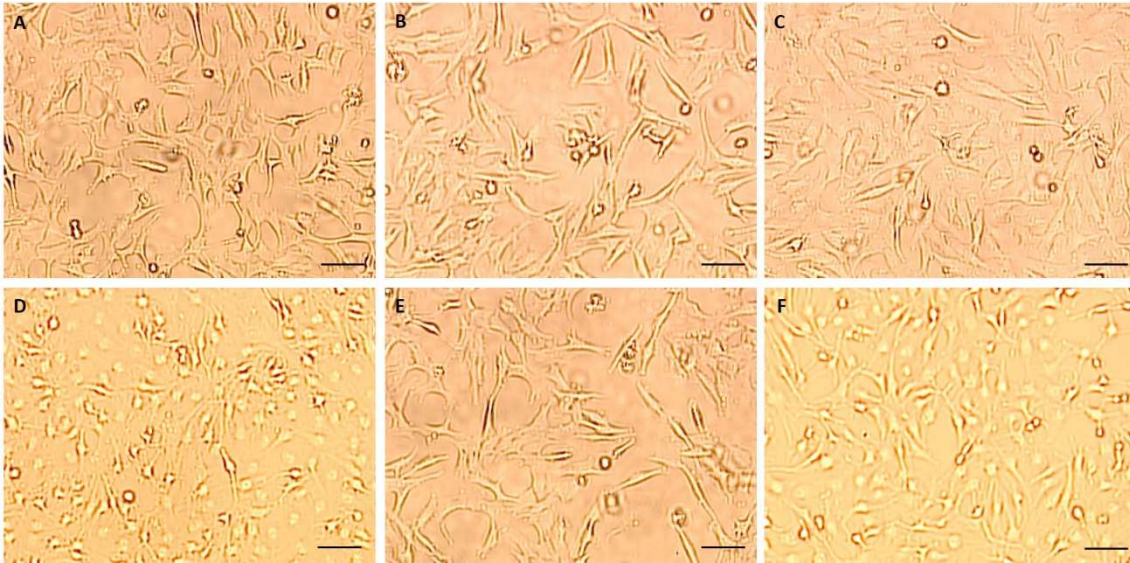


Figura 4.2: Líneas celulares de GBM. Imágenes de las líneas celulares de GBM establecidas en la Unidad de Investigación del HGUE. HGUE GB 16 (A), HGUE GB 37 (B), HGUE GB 39 (C), HGUE GB 40 (D), HGUE GB 42 (E), HGUE GB 48 (F). Barra de escala: 20 micras (μm).

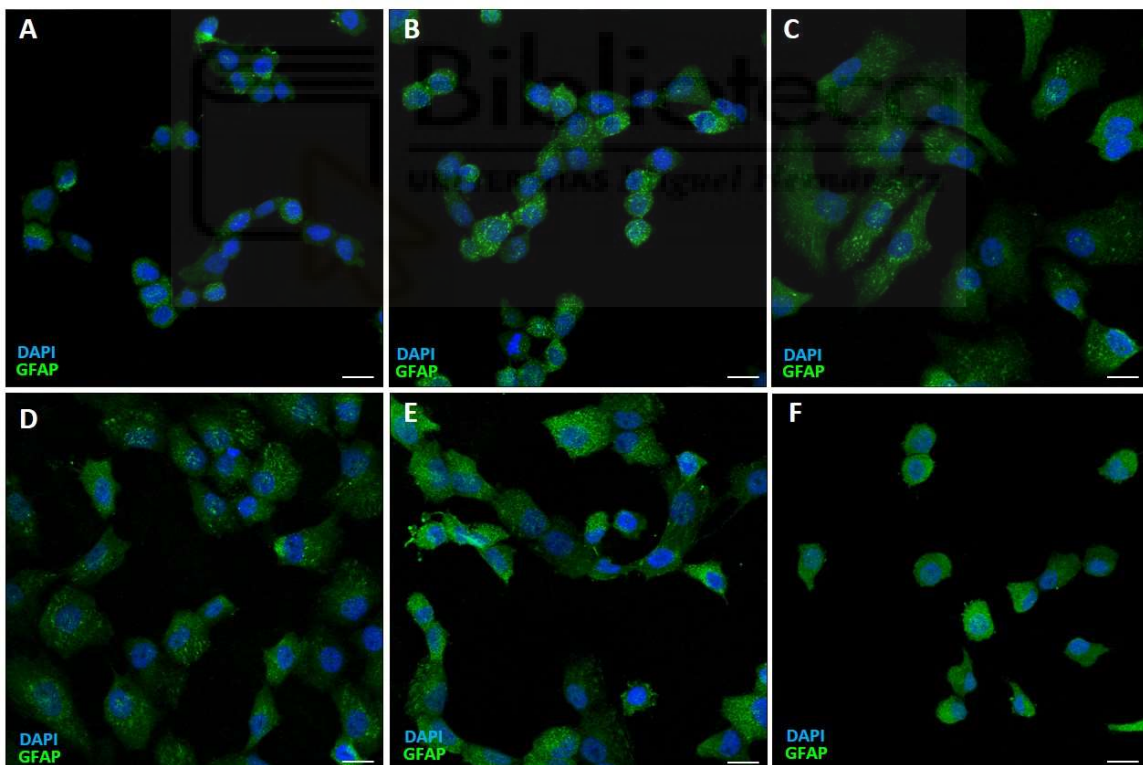


Figura 4.3: Inmunodetección de la proteína GFAP, utilizada como marcador de astrocitos. Las microfotografías corresponden a la inmunotinción realizada sobre las líneas celulares de GBM: HGUE GB 16 (A), HGUE GB 37 (B), HGUE GB 39 (C), HGUE GB 40 (D), HGUE GB 42 (E), HGUE GB 48 (F). En verde se muestra la proteína GFAP, y en azul los núcleos teñidos con DAPI. GFAP se muestra distribuida por el citoplasma de las células. Barras de escala: 20 μm .

Resultados

4.1.2 Caracterización según la clasificación actual de los tumores del SNC de la OMS

La caracterización de las líneas celulares de GBM establecidas se realizó mediante la detección de mutaciones puntuales en los genes *IDH1*, *IDH2* y *TERT* a nivel genómico, y de alteraciones en los genes *TP53* y *PTEN* a nivel proteico.

La búsqueda de mutaciones puntuales se llevó a cabo mediante la secuenciación directa de las regiones *hotspot* de los genes *IDH1*, *IDH2*, y *TERT*, y después se analizaron los electroferogramas en busca de las mutaciones descritas en el [Capítulo 3 - apartado 3.4.1](#). Como se puede observar en la **Figura 4.4**, no se encontró ninguna mutación en los genes *IDH1* e *IDH2* en ninguna de las 6 líneas celulares estudiadas, lo que indicó que todas ellas forman parte del grupo de GBMs IDH-nativos o GBMs primarios.

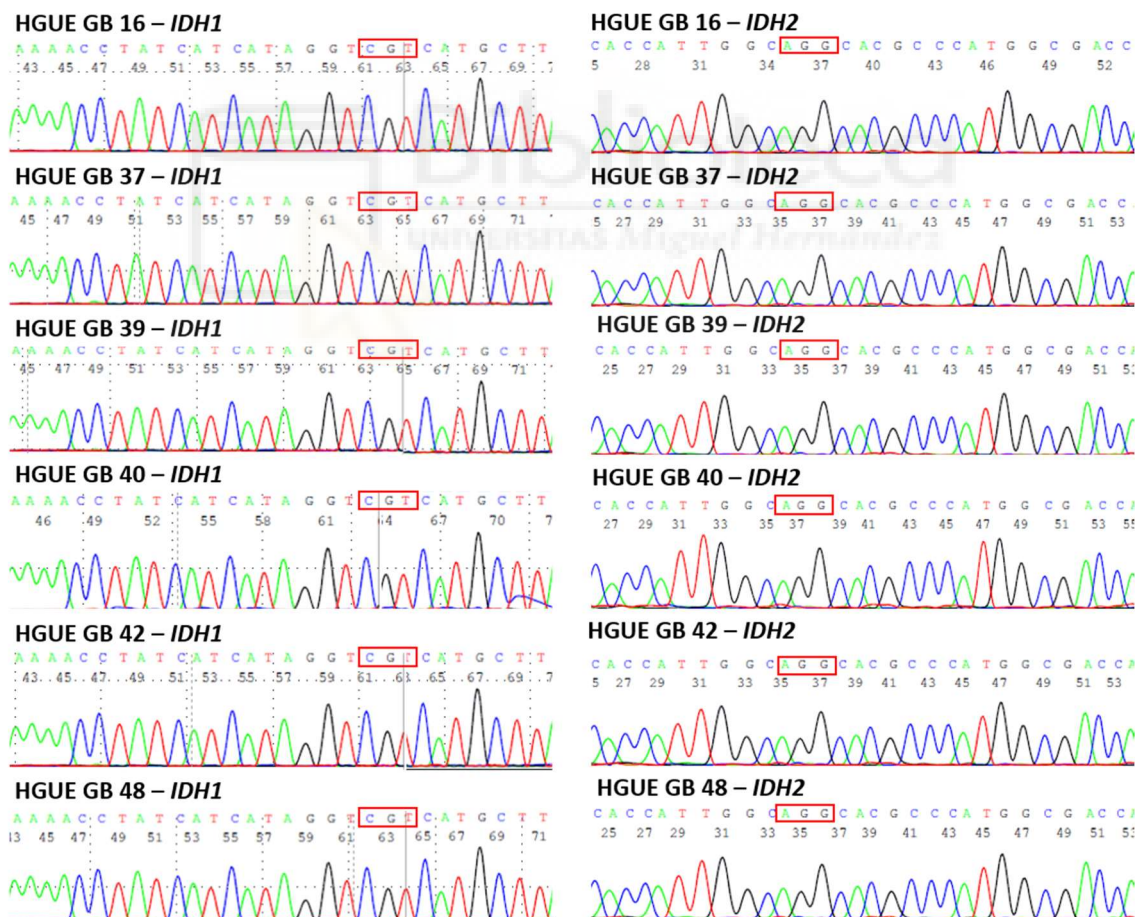


Figura 4.4: Electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los genes *IDH1* (a la izquierda de la imagen) e *IDH2* (a la derecha de la imagen). Se observa la ausencia de mutaciones en las líneas celulares de GBM estudiadas. El recuadro rojo indica los tres nucleótidos que constituyen el codón en el que se produce la mutación.

En cambio, al estudiar las mutaciones de la región promotora de *TERT*, se observó que las 6 líneas celulares de GBM establecidas habían adquirido una de las dos mutaciones descritas en esta zona, el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición -250. Todas las líneas presentaron esta mutación en homocigosis, excepto HGUE GB 16 que como se puede comprobar en su electroferograma, posee la mutación en heterocigosis (**Figura 4.5**). La presencia de esta mutación en el promotor de *TERT* permitió completar la clasificación de las líneas celulares establecidas como GBMs primarios.

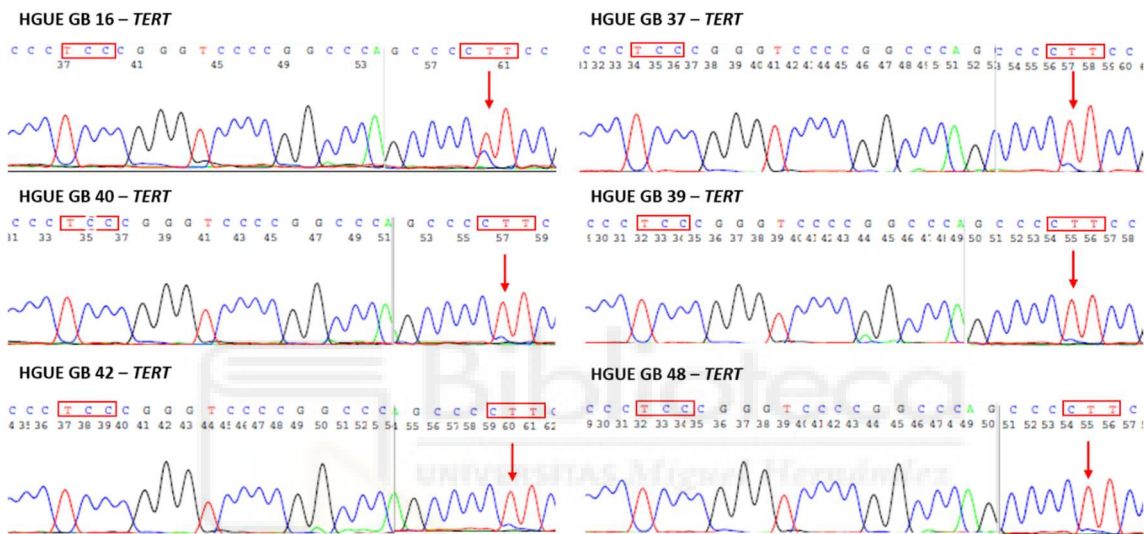


Figura 4.5: Electroferogramas obtenidos de la secuenciación del promotor del gen *TERT*. Se observa que todas las líneas celulares de GBM tienen la mutación C250T en el promotor de *TERT*. Los rectángulos rojos indican los nucleótidos que forman los codones en los que se producen las 2 mutaciones más frecuentes. La flecha roja señala el nucleótido mutado.

Adicionalmente, la clasificación de los tumores del SNC propuesta por la OMS en el 2016, establece además una característica que permite complementar la identificación de los GBMs como primarios o secundarios: la presencia de mutaciones en los genes *TP53* y *PTEN* [56]. Por ello, se decidió estudiar las alteraciones de ambos de genes en las líneas celulares de GBM establecidas. El análisis se llevó a cabo utilizando las técnicas inmunocitoquímicas validadas para la rutina clínica en el HGUA.

En el caso del estudio de la presencia de alteraciones en el gen *TP53*, las 6 líneas celulares establecidas mostraron una acumulación anormal de la proteína p53 en el núcleo de todas sus células (**Figura 4.6**). Por otro lado, las 6 líneas conservaron la

Resultados

expresión del gen *PTEN*, ya que en todas ellas se detectó la presencia de la proteína PTEN dispersa por el citoplasma celular. Es importante señalar que las líneas celulares HGUE GB 16 y HGUE GB 37 presentaron una tinción con mayor intensidad para esta proteína (**Figura 4.6**).

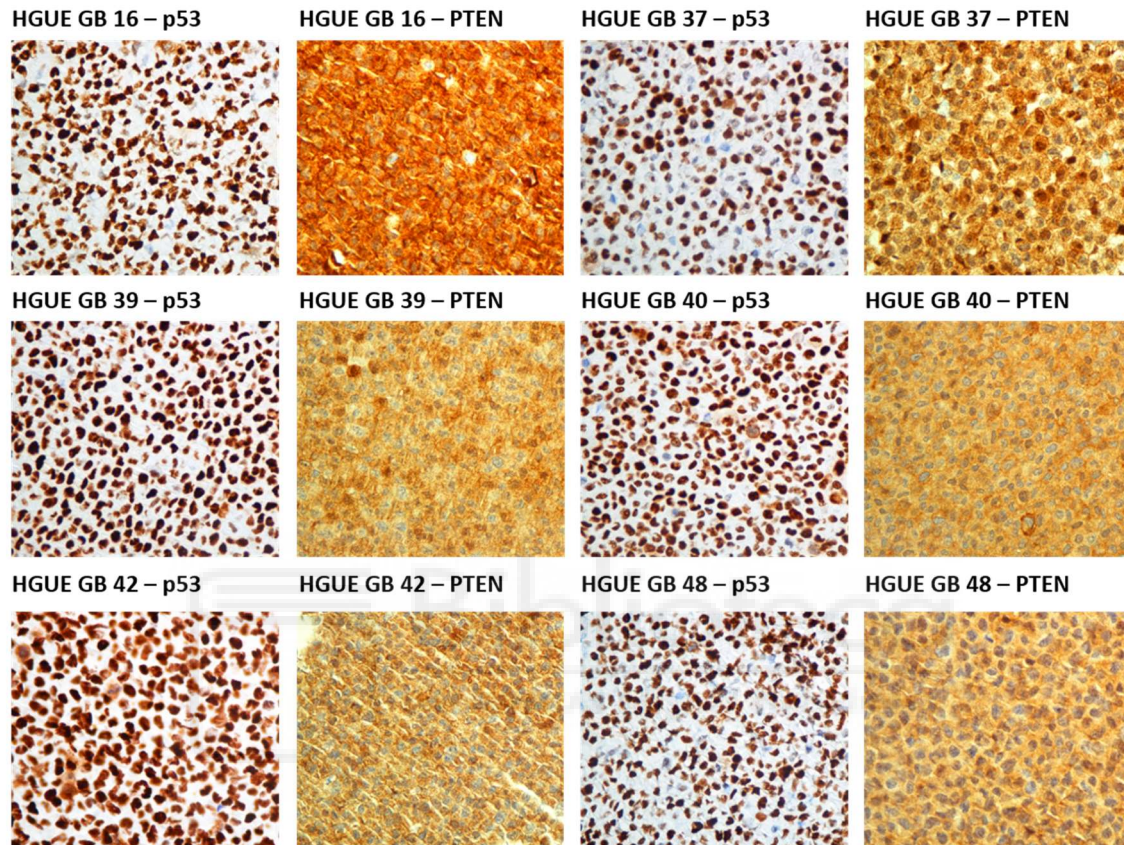


Figura 4.6: Inmunodetección de las proteínas p53 y PTEN mediante la técnica inmunocitoquímica de Estreptavidina-Biotina. Se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de las inmunotinciones de las secciones del TMA de las 6 líneas celulares de GBM establecidas. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 40x.

4.2 Quimioterapia y su relación con el gen *MGMT*

Una vez realizada la caracterización morfológica y molecular del modelo de estudio, se llevó a cabo el análisis del efecto de la quimioterapia sobre las líneas celulares establecidas de GBM, y la relación de la quimiorresistencia con la metilación del promotor del gen *MGMT* y la expresión de dicho gen. En este estudio se utilizó BCNU, un fármaco quimioterapéutico de segunda línea que posee el mismo mecanismo de acción que la TMZ. La elección del BCNU se debió a la baja solubilidad que

presenta la TMZ en DMSO, y los problemas de enmascaramiento de efecto que ello plantea al interferir este compuesto en el ciclo celular.

4.2.1 Efecto del BCNU sobre los cultivos primarios de GBM

Se realizó una única administración de BCNU a una concentración de 50 μ M y se valoró el efecto sobre la viabilidad celular en todas las líneas celulares 24 h post-tratamiento. Las 6 líneas celulares de GBM estudiadas presentaron diferentes grados de afectación tras el tratamiento. La línea celular más sensible fue HGUE GB 42 en la que el porcentaje de muerte celular ascendió hasta un 49,9% \pm 3,7 (**Figura 4.7**). Las líneas celulares HGUE GB 37, HGUE GB 39, HGUE GB 40 y HGUE GB 48 mostraron un aumento del porcentaje de muerte celular intermedio, que se mantuvo entre el 20 y el 35%. (**Figura 4.7**) La mayor tasa de supervivencia la presentó la línea celular HGUE GB 16, en la que solamente se produjo la muerte de un 12,6% \pm 2,3 de sus células (**Figura 4.7**), y por lo tanto se estableció como la línea celular más resistente a la quimioterapia.

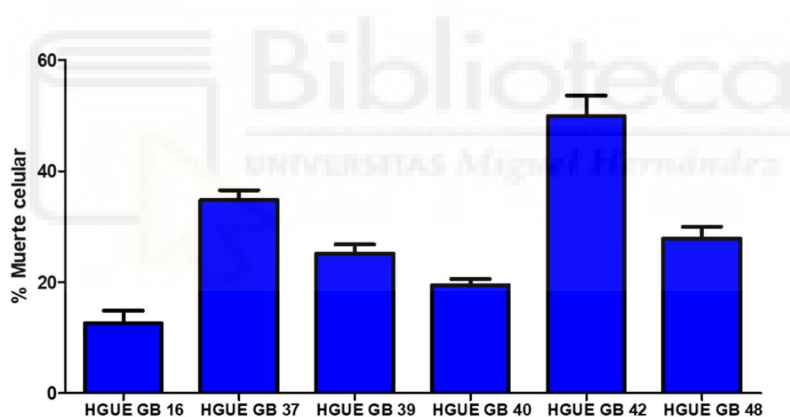


Figura 4.7: Respuesta de las líneas celulares de GBM al BCNU. Se muestran los porcentajes de muerte celular de cada uno de los cultivos tras 24 h de tratamiento con BCNU. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$).

4.2.2 Metilación del promotor del gen *MGMT*

El grado de metilación del promotor de *MGMT* en los cultivos primarios de GBM, se obtuvo mediante el análisis de los electroferogramas resultantes de la aplicación de la técnica de MS-MLPA.

Los valores de metilación de cada isla CpG se muestran en la **Figura 4.8**. En base a ellos, y siguiendo los criterios establecidos en el [Capítulo 3 - apartado 3.4.2](#), se definió la metilación de cada una de las líneas celulares. Los resultados mostraron que las líneas

Resultados

celulares HGUE GB 37, HGUE GB 39, HGUE GB 40, HGUE GB 42 y HGUE GB 48 tenían el promotor de *MGMT* metilado, ya que presentaron más de tres islas CpG con un valor por encima de 0,25 (Tabla 4.1, Figura 4.8). La línea celular HGUE GB 16, no presentó ninguna isla CpG con un valor superior a 0,25, y por lo tanto fue la única línea de GBM establecida que no tuvo metilado el promotor del gen *MGMT* (Tabla 4.1, Figura 4.8).

Tabla 4.1: Valores de metilación obtenidos para cada línea celular mediante la técnica MS-MLPA. Se marcan en gris las dos sondas que no se incluyeron en el análisis global de metilación debido a las recomendaciones del fabricante. En formato subrayado se señalan los valores por encima de 0,25 de las sondas incluidas en el análisis.

Línea celular	Sonda 1	Sonda 2	Sonda 3	Sonda 4	Sonda 5	Sonda 6
HGUE GB 16	0,05	0,00	0,00	0,00	0,14	0,19
HGUE GB 37	0,08	<u>0,28</u>	<u>0,74</u>	0,65	<u>0,47</u>	0,88
HGUE GB 39	0,00	<u>0,95</u>	<u>0,53</u>	0,81	<u>1,42</u>	0,55
HGUE GB 40	<u>0,35</u>	<u>0,47</u>	0,03	0,17	<u>0,41</u>	0,38
HGUE GB 42	<u>0,32</u>	0,15	<u>0,57</u>	0,76	<u>0,61</u>	1,52
HGUE GB 48	0,06	<u>1,11</u>	0,08	0,60	<u>1,10</u>	0,00

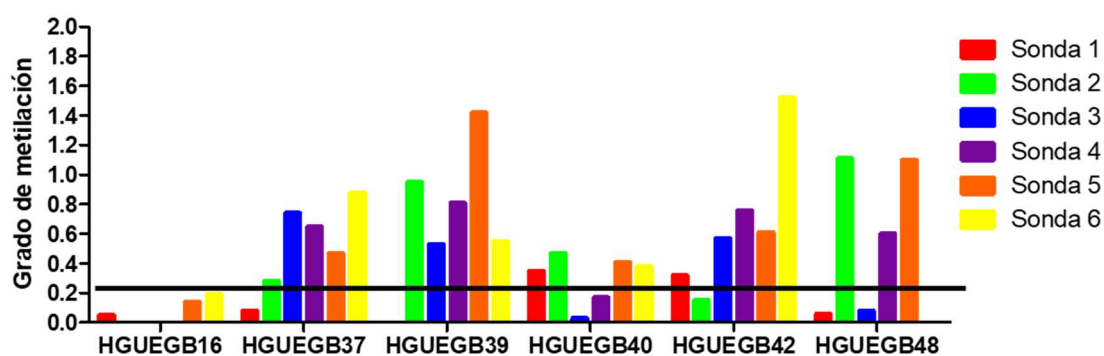


Figura 4.8: Estado de metilación del promotor del gen *MGMT* a partir de los valores obtenidos mediante la técnica MS-MLPA en las líneas celulares de GBM establecidas. Cada una de las barras representa el valor de metilación de las sondas del kit *SALSA MS-MLPA ME011.B1 Mismatch Repair Genes*, que interrogan las distintas islas CpG, en cada una de las líneas celulares. Aunque en la gráfica se muestran las 6 sondas para el análisis de la metilación, no se tuvieron en cuenta las sondas 4 y 6 por indicaciones del fabricante. La línea horizontal negra indica el valor umbral por encima del cual se considera metilada la isla (0,25).

4.2.3 Expresión del gen *MGMT* a nivel de ARNm, y correlación con el grado de metilación de su promotor

Una vez conocido el estado de metilación del promotor del gen *MGMT*, se llevó a cabo el estudio de la expresión de este gen a nivel de ARNm mediante qRT-PCR para establecer si existía relación entre el estado de metilación y la expresión del mismo. Para ello, se utilizó el ensayo comercializado por la empresa ThermoFisher Scientific, específico para *MGMT*. Como control endógeno se empleó un ensayo que detectaba la expresión del gen *GAPDH*, que es un gen de expresión constitutiva y estable en humanos, y como muestra normalizadora se hizo uso de un *pool* comercial de ARN humano obtenido de cerebros sanos.

En este caso, la expresión del gen *MGMT* fue indetectable en todas las líneas celulares de GBM establecidas, excepto en la línea HGUE GB 16, que tuvo un valor de RQ igual a $2,7 \pm 0,15$. Es decir, se encontró sobreexpresado con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano. Teniendo en cuenta que de forma fisiológica existe expresión de *MGMT* en el tejido cerebral, se pudo considerar que los cultivos primarios restantes tenían silenciado este gen.

Al comparar los datos de expresión de *MGMT* a nivel de ARNm con los datos de metilación del promotor de dicho gen, se comprobó que todas las líneas celulares cuya expresión de *MGMT* era indetectable tenían metilado el promotor de este gen. En cambio, la línea HGUE GB 16 presentó el promotor de *MGMT* no metilado, y fue la única en la que se detectó expresión de *MGMT*. Por lo tanto, se pudo correlacionar la expresión a nivel de ARNm con la metilación del promotor del gen *MGMT*. Además, esta línea fue la más resistente al tratamiento de quimioterapia (**Figura 4.7**), por lo que también se pudo asociar la expresión de *MGMT* con una mayor quimiorresistencia.

4.3 Radioterapia y su relación con los genes *SOCS1* y *SOCS3*

En primer lugar, se determinó el efecto de la radioterapia sobre las líneas celulares de GBM, y se estableció una clasificación de las mismas según su radiorresistencia. Seguidamente, se estudió el estado de metilación de los promotores de *SOCS1* y *SOCS3*, así como sus niveles de expresión a nivel de ARNm, y de proteína. Finalmente, se valoró

Resultados

el efecto de la radioterapia sobre la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3*, y su implicación en la radiorresistencia presentada por las líneas de GBM.

4.3.1 Efecto de la radioterapia en las líneas celulares de GBM

Las líneas celulares de GBM se sometieron a tratamientos de radioterapia en la Unidad de Oncología Radioterápica del HGUE. En primer lugar, se realizó un estudio de viabilidad como se describe en el [Capítulo 3 - apartado 3.6.1](#) administrando a las líneas celulares distintas dosis de radioterapia, con el fin de determinar la más adecuada para este trabajo. Las dosis administradas se eligieron en función de la dosis máxima por día que reciben los pacientes con GBM en tratamiento radioterápico, y fueron 2 Gy (dosis pauta en clínica), 5 Gy, 7 Gy, y 10 Gy, utilizando siempre una tasa de 6 Gy/min. La viabilidad se determinó 72 h post-irradiación. La **Figura 4.9** muestra los valores de viabilidad resultantes para cada línea celular de GBM, después de normalizar los resultados tomando la muestra sin tratar como el 100% de viabilidad. Se observa que la dosis más baja (2 Gy) tenía un efecto casi nulo sobre la viabilidad de las líneas celulares estudiadas, las dosis intermedias (5-7 Gy) presentaron un efecto similar en todos los cultivos, y la dosis más alta (10 Gy) fue la que originó menores tasas de viabilidad, matando aproximadamente un 60% de las células.

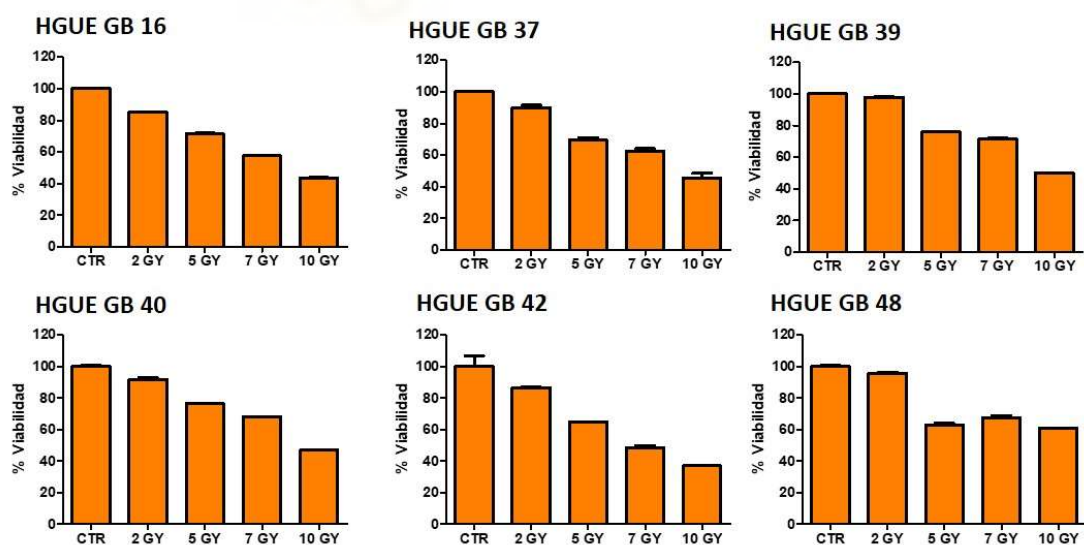


Figura 4.9: Gráficas de viabilidad de las líneas celulares de GBM después 72 h de tratamiento radioterápico. Las barras naranjas indican los porcentajes de viabilidad celular normalizados de cada una de las líneas celulares de GBM. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$).

Considerando estos datos, se decidió utilizar la tasa de 7 Gy en todos los experimentos de este trabajo, puesto que presentaba un efecto intermedio que permitiría analizar los fenómenos de potenciación y/o protección frente a la radioterapia que se contemplan en los objetivos.

A continuación, se estudió la viabilidad celular de los cultivos primarios 24 h post-irradiación, con objeto de determinar si el porcentaje de viabilidad celular era suficiente para establecer una clasificación de los cultivos primarios según su radiorresistencia. Los datos obtenidos mostraron que la viabilidad celular se mantenía cercana al 100% tras el tratamiento en todas las líneas celulares de GBM, lo que indicó que el valor de viabilidad celular a las 24 h no era el adecuado para realizar la clasificación de los cultivos.

Por ello, se realizó un ensayo para analizar el efecto de la radioterapia sobre el ciclo celular. Se trataron las líneas celulares con 7 Gy, y a las 24 h se tomaron muestras para analizar la distribución del ciclo celular en las muestras control (CTR) y tratadas (IR). En primer lugar, se compararon las distintas fases del ciclo celular de las muestras CTR e IR mediante la prueba estadística *U* de *Mann-Withney*, y se observó que 24 h post-irradiación todas líneas celulares de GBM sufrían cambios significativos en las fases G_1 , S, y G_2/M del ciclo celular, viéndose reducidas las dos primeras, y aumentada la tercera en las muestras IR con respecto a las muestras CTR. Sin embargo, la fase $SubG_1$, asociada con muerte celular, no experimentó cambios significativos causados por el tratamiento radioterápico (**Figura 4.10**), lo que también se había comprobado anteriormente mediante los estudios de viabilidad.

Una vez determinada la influencia de la radioterapia sobre el ciclo celular, se estableció el efecto de la radioterapia calculando la diferencia existente entre los porcentajes celulares de las muestras irradiadas, y las muestras sin irradiar en cada fase del ciclo (Δ_{IR-CTR}). Además, tras la realización de dicho cálculo, se comprobó que el sumatorio de las fases G_1 y S, era igual que el sumatorio de las fases $SubG_1$ y G_2/M , aunque con distinto signo. Por ello, la clasificación de las líneas celulares de GBM según su radiorresistencia se llevó a cabo comparando el valor de $SubG_1+G_2/M$ de las muestras IR con respecto a las muestras CTR (**Figura 4.11**).

Resultados

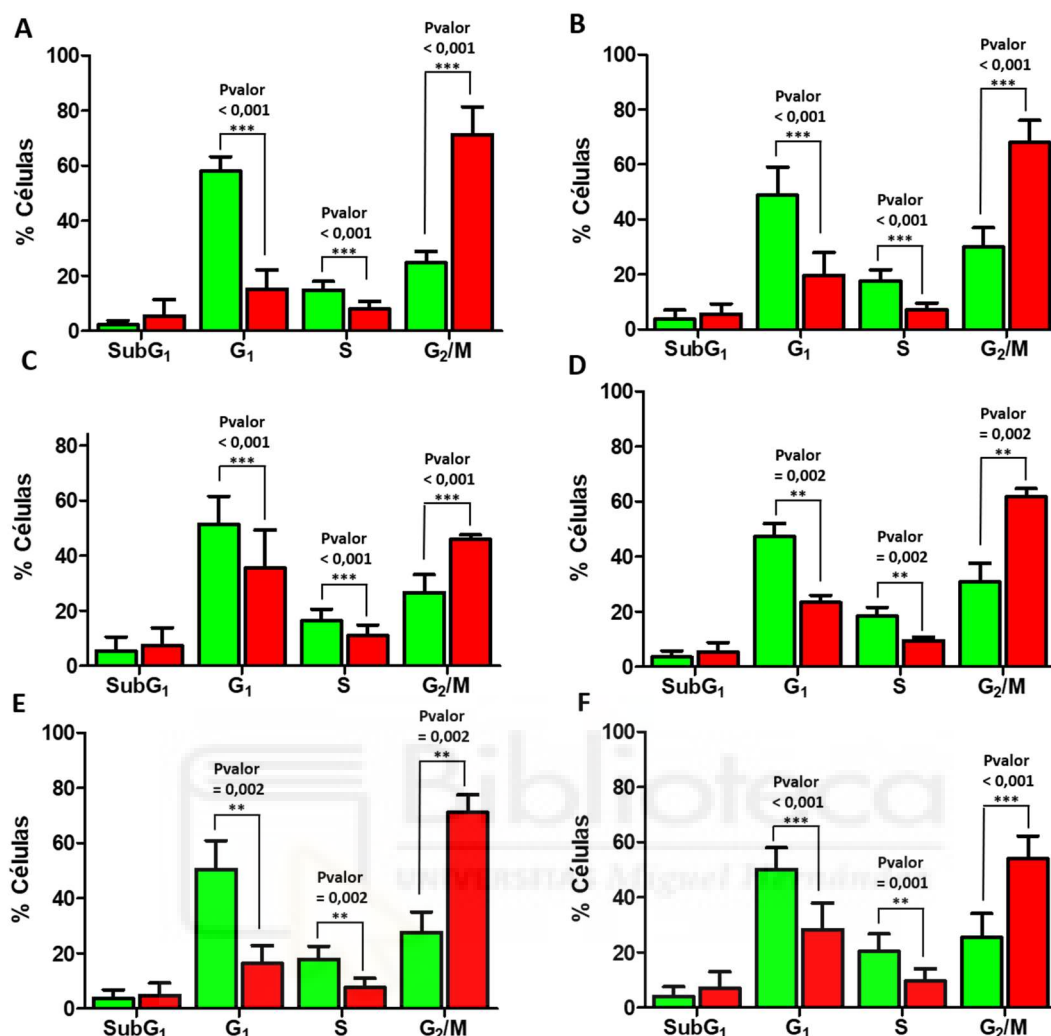


Figura 4.10: Efecto del tratamiento radioterápico sobre las distintas fases del ciclo celular en las líneas de GBM: HGUE GB 16 (A), HGUE GB 37 (B), HGUE GB 39 (C), HGUE GB 40 (D), HGUE GB 42 (E) y HGUE GB 48 (F). En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo, y en el eje de abscisas las fases SubG₁, G₁, S y G₂/M. Las barras verdes representan la media de las muestras CTR, y las barras rojas la media de las muestras IR. Los segmentos negros representan la desviación estándar (n ≥ 10). ** indica valores de p-valor < 0,01; *** indica un p-valor < 0,001.

$$\text{Efecto IR} = (\text{SubG1} + \text{G2/M})_{\text{IR}} - (\text{SubG1} + \text{G2/M})_{\text{CTR}}$$

Figura 4.11: Ecuación para el cálculo del efecto de la radioterapia.

Los datos obtenidos eran homocedásticos, y se ajustaron a una distribución normal, según las pruebas estadísticas de *Levene*, y *Shapiro-Wilk* respectivamente, excepto los de la línea celular HGUE GB 37, que se excluyeron de este primer análisis. Los

porcentajes medios de $\text{SubG}_1 + \text{G}_2/\text{M}$ de cada cultivo (**Tabla 4.1**) se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de un factor, arrojando éste un p-valor $< 0,001$, lo que indicó que existían diferencias significativas entre los valores de $\text{SubG}_1 + \text{G}_2/\text{M}$ de las líneas celulares de GBM. Para establecer entre qué cultivos existían estas variaciones, se realizó el test de contraste *post-hoc* de Bonferroni. Teniendo en cuenta los de p-valores de los contrastes de Bonferroni, y los valores medios de $\text{SubG}_1 + \text{G}_2/\text{M}$ de cada cultivo, se clasificaron las líneas celulares de GBM en 3 categorías según su resistencia a la radioterapia: Resistente-HGUE GB 39; Intermedio-HGUE GB 40 y HGUE GB48; Sensible: HGUE GB 16 y HGUE GB 42 (**Tabla 4.2**). Los datos de la línea HGUE GB 37 se compararon dos a dos con los de las demás líneas mediante la prueba *U* de *Mann Withney*, con el fin de incluirla en uno de estos grupos. Todos los p-valores resultantes fueron menores de 0,05, excepto el obtenido para la comparación de dicha línea con la línea HGUE GB 42. Por lo tanto, se clasificó esta línea celular como sensible. Así mismo, se determinó el valor relativo de sensibilidad de cada línea, fijando como 100% el valor de $\text{SubG}_1 + \text{G}_2/\text{M}$ de la línea celular más resistente, y calculando los demás valores con respecto a este (**Tabla 4.2**).

Por último y con el fin de validar esta clasificación, se procedió a calcular lo que se denominó “efecto neto de la radioterapia”, basándonos en la diferente sensibilidad que presentan las células dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren. Se sabe, que la mayoría de las células que se ven afectadas por la radioterapia son las que se encuentran en las fases S y G_2/M , ya que están en proceso de división, y por lo tanto su material genético está expuesto al efecto de la radiación ionizante [182]. Por esta razón, se realizó un ensayo en el que se tomaron muestras de las líneas celulares justo antes de administrar el tratamiento radioterápico, y a las 24 h post-irradiación. Después se analizó la distribución del ciclo celular de cada línea en ambas muestras, y se comparó el sumatorio de las fases S y G_2/M (células susceptibles) de las muestras obtenidas antes de la irradiación, con el sumatorio de las fases SubG_1 y G_2/M (células afectadas) de las muestras obtenidas post-irradiación. Así, se calculó el índice de las células afectadas, con respecto a las células que en el momento del tratamiento eran más susceptibles al mismo.

Resultados

Tabla 4.2: Clasificación de las líneas celulares de GBM según su sensibilidad a la radioterapia. Se marca en rojo la línea celular más resistente, en naranja las líneas que presentaron una resistencia intermedia, y en verde las líneas celulares más sensibles.

Cultivo	Grupo	$\Delta_{IR-CTR}(\text{SubG}_1+\text{G}_2/\text{M})$	Valor sensibilidad
HGUE GB 16	Sensible	49,8±2,0	2,4
HGUE GB 37*	Sensible	40,2±1,0	2
HGUE GB 39	Resistente	21,2±1,6	1
HGUE GB 40	Intermedio	32,7±2,5	1,5
HGUE GB 42	Sensible	44,6±1,2	2,1
HGUE GB 48	Intermedio	31,5±2,4	1,5

*Se excluyó del análisis estadístico porque no se ajustaba a una distribución normal.

Los resultados de este análisis corroboraron la clasificación anterior, ya que como refleja la **Figura 4.12**, la línea HGUE GB 39, que había sido clasificada como la más resistente, mostró un porcentaje de células afectadas claramente inferior al porcentaje de células susceptibles. Las líneas celulares que fueron clasificadas como sensibles, HGUE GB 16, HGUE GB 37 y HGUE GB 42, mostraron porcentajes similares de células afectadas y células susceptibles. Finalmente, las líneas celulares HGUE GB 40 y HGUE GB 48 presentaron un número de células susceptibles superior al número de células afectadas, pero la diferencia entre ambos grupos no fue tan elevada como en el caso del cultivo HGUE GB 39, así que de nuevo se volvió a establecer un grupo de líneas celulares con una resistencia intermedia a la radioterapia.

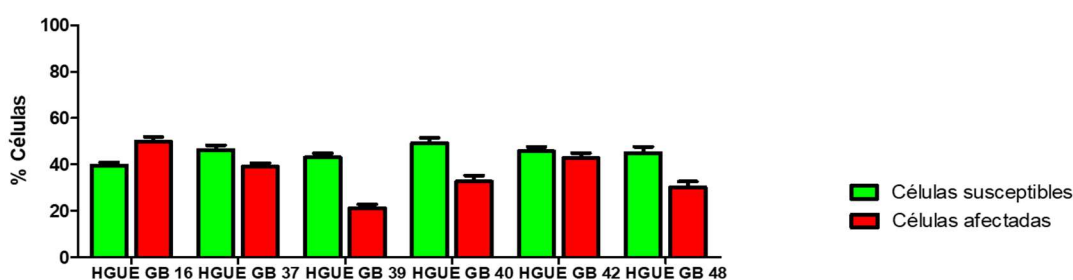


Figura 4.12: Efecto neto de la radioterapia sobre las líneas celulares de GBM establecidas. Las barras verdes representan el sumatorio del porcentaje de células en las fases S y G₂/M del ciclo de celular de las muestras antes del tratamiento. Las barras rojas indican el sumatorio del porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M del ciclo de celular de las muestras 24 h post-irradiación. Los segmentos negros indican la desviación estándar (n ≥ 3).

4.3.2 Estudio de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en las líneas celulares de GBM establecidas y su relación en la radiorresistencia

4.3.2.1 Metilación de los promotores de los genes *SOCS1* y *SOCS3*

El análisis de los electroferogramas mostró que las líneas celulares de GBM establecidas no presentaban metilado el promotor del gen *SOCS1*, siguiendo los criterios descritos en el [Capítulo 3 - apartado 3.4.2](#), a excepción de la línea HGUE GB 42 que presentó el promotor de dicho gen parcialmente metilado (**Figura 4.13**).

A continuación, se procedió a estudiar el estado de metilación de las islas CpG indicadas en el [Capítulo 3 - apartado 3.4.2](#) en los genes *SOCS1* y *SOCS3* mediante la técnica de MS-PCR.

En el caso del gen *SOCS1*, los cebadores que interrogaban la isla CpG localizada dentro del ORF [174] mostraron que las líneas celulares HGUE GB 16, HGUE GB 40, HGUE GB 42 y HGUE GB 37 presentaban hemimetilada esta isla CpG, ya que para ambos productos de PCR se obtuvo banda en el gel. Las líneas celulares HGUE GB 39 y HGUE GB 48, no tenían metilada dicha isla, porque en ellas únicamente se observó banda para el producto de PCR proveniente de la reacción llevada a cabo con los cebadores específicos de no metilación (**Figura 4.14-parte superior**). Los resultados obtenidos con los cebadores diseñados por nuestro grupo de investigación indicaron que ninguna de las líneas celulares de GBM establecidas poseían metilada la isla CpG interrogada, ya que como se muestra en la parte inferior de la **Figura 4.14**, solo se obtuvo banda cuando se realizó la reacción de PCR con los cebadores que hibridaban con la isla CpG no metilada. Estos cebadores estaban diseñados para interrogar una isla CpG situada en la región promotora del gen.

El análisis de la metilación del gen *SOCS3* con los cebadores diseñados por Kim y colaboradores en el año 2015 [170], indicó que las líneas celulares de GBM HGUE GB 39, HGUE GB 40, HGUE GB 42 y HGUE GB 48 tenían hemimetilada la isla CpG interrogada, ya que los productos de las reacciones de PCR realizadas con ambos cebadores mostraron banda en el gel de agarosa. En cambio, para las líneas celulares HGUE GB 16 y HGUE GB 37 solo se obtuvo banda en las reacciones de PCR realizadas con los cebadores específicos de no metilación, lo que indicó que la ausencia de metilación en

Resultados

esta isla (**Figura 4.15-parte superior**). Sin embargo, como se puede ver en la parte inferior de la **Figura 4.15**, todas las líneas de GBM estudiadas carecían de metilación en la isla CpG interrogada con los cebadores de diseño propio, ya que no se obtuvo banda en ningún caso para los productos de PCR de las reacciones llevadas a cabo con los cebadores específicos de metilación.

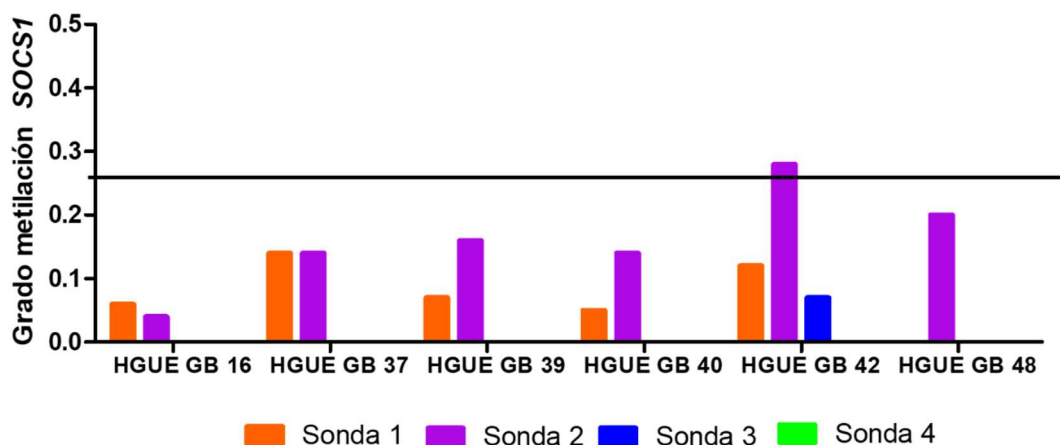


Figura 4.13: Gráfico que representa los valores de metilación del promotor del gen *SOCS1* obtenidos mediante la técnica MS-MLPA en las líneas celulares de GBM establecidas. Cada una de las barras representa el valor de metilación las 4 sondas del kit *SALSA MLPA ME042.B1 CIMP*. La línea horizontal negra indica el valor umbral por encima del cual se considera la isla metilada (0,25).

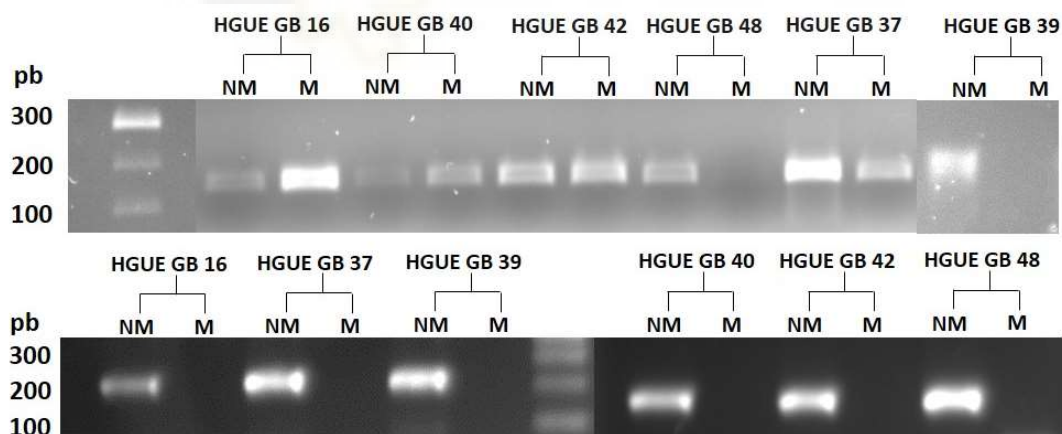


Figura 4.14: Análisis de la metilación de dos islas CpG del gen *SOCS1* mediante MS-PCR seguida de electroforesis en gel de agarosa. La imagen corresponde a las bandas obtenidas tras resolver los productos de las reacciones de PCR realizadas con los cebadores diseñados por Kim y colaboradores [174] (**parte superior**), y con los cebadores diseñados en este estudio (**parte inferior**) en el gel de agarosa. Las reacciones de PCR para cada uno de los cultivos celulares no se llevaron a cabo de forma simultánea. Por ello, la figura es el resultado de la unión de los diferentes geles realizados.

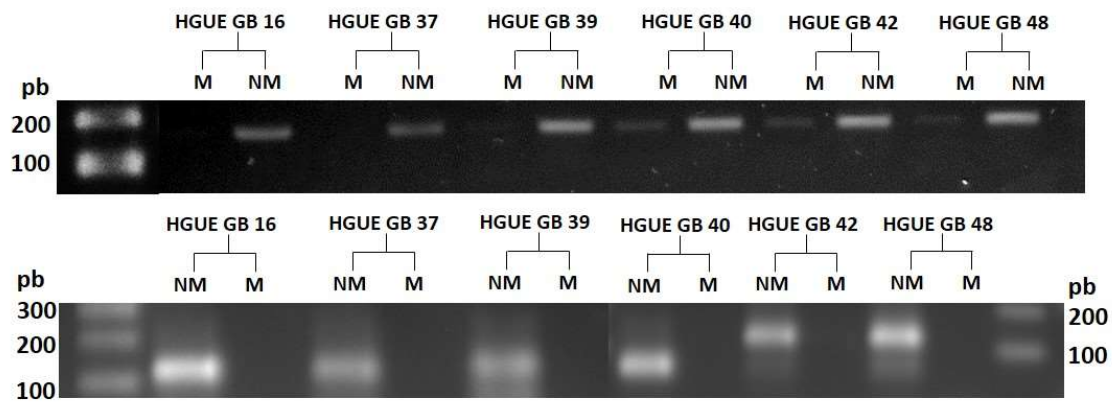


Figura 4.15: Análisis de la metilación de dos islas CpG del gen *SOCS3* mediante MS-PCR seguida de electroforesis en gel de agarosa. La imagen corresponde a las bandas obtenidas tras resolver los productos de las reacciones de PCR realizadas con los cebadores diseñados por Kim y colaboradores (**parte superior**), y con y con los cebadores diseñados en este estudio (**parte inferior**) en el gel de agarosa. Las reacciones de PCR para cada uno de los cultivos celulares no se llevaron a cabo de forma simultánea. Por ello, la figura es el resultado de la unión de los diferentes geles realizados.

4.3.2.2 Expresión basal a nivel de mRNA de los genes *SOCS1*, *SOCS3*

Tras establecer que los promotores de los genes *SOCS1* y *SOCS3* se encontraban no metilados, se estudiaron los valores de expresión de estos genes a nivel de ARNm mediante qRT-PCR, con el objeto de establecer si existía relación entre el estado de metilación de su promotor y la expresión de los mismos. El estudio de expresión basal de *SOCS1* y *SOCS3* en las líneas celulares de GBM establecidas, se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo utilizado para el gen *MGMT*. En el caso de la expresión a nivel de ARNm del gen *SOCS1*, los resultados mostraron que las líneas celulares de GBM sobreexpresaban el gen a nivel de ARNm entre 2 y 5 veces con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano. La línea celular que presentó una menor expresión de *SOCS1* fue HGUE GB 16 (FC=2). Los valores de FC de las demás líneas se mantuvieron entre 4 y 5 (**Figura 4.16-A**). El análisis de la expresión a nivel de ARNm del gen *SOCS3*, mostró que todas las líneas celulares de GBM sobreexpresaban entre 3,0 y 4,5 veces este gen con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano. La línea celular HGUE GB 42 fue la que mayor expresión mostró de *SOCS3* (FC= 4,5), y el resto de las líneas mostraron valores de FC alrededor de 3 (**Figura 4.16-B**).

Resultados

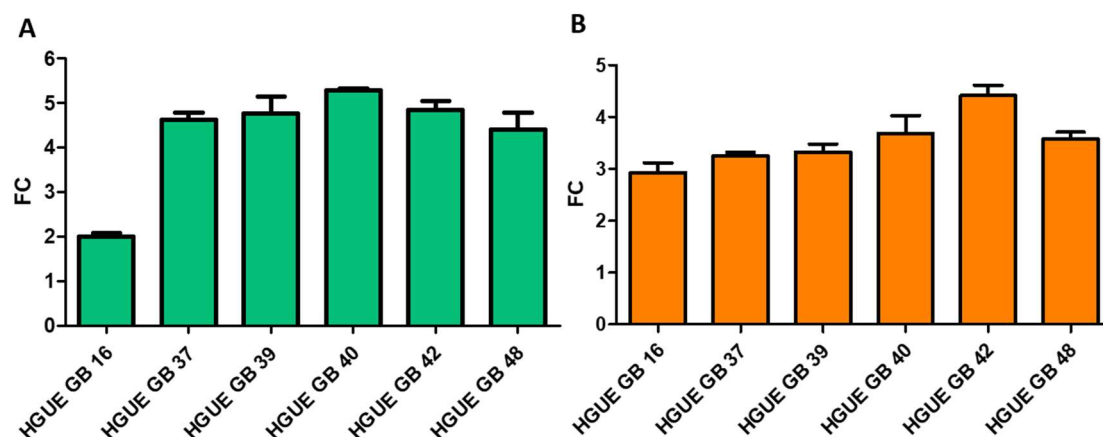


Figura 4.16: Estudio de la expresión del gen *SOCS1* (A) y *SOCS3* (B) a nivel de ARNm en las líneas celulares establecidas de GBM. Las barras verdes y naranjas representan los valores de FC de *SOCS1* y *SOCS3* respectivamente para cada cultivo. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 10$).

De nuevo, se pudo establecer una correlación directa entre la ausencia de metilación en los promotores de los genes *SOCS1* y *SOCS3* y su expresión a nivel de ARNm, ya que las seis líneas celulares de GBM estudiadas expresaban ambos genes y no presentaron metilados sus promotores. No obstante, al no haber encontrado ninguna línea celular totalmente metilada, y que no expresase los genes a nivel de ARNm, no se pudo confirmar que la metilación de *SOCS1* o *SOCS3* estuviese implicada en la regulación de la expresión de estos genes.

4.3.2.3 Expresión basal a nivel de proteína de los genes *SOCS1*, *SOCS3*

Con el fin de completar el estudio de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en las líneas celulares de GBM establecidas, se analizó su expresión a nivel de proteína, con el fin de confirmar que los datos obtenidos a nivel de ARNm se correspondían con la presencia de estas proteínas a nivel celular.

La expresión, la distribución y la posible colocalización de las proteínas *SOCS1* y *SOCS3* se analizó mediante técnicas inmunocitoquímicas acopladas a microscopía confocal. Para ello, se llevaron a cabo dobles inmunomarcajes combinando los anticuerpos específicos contra las proteínas *SOCS1* y *SOCS3*. Los resultados se muestran en la **Figura 4.17**.

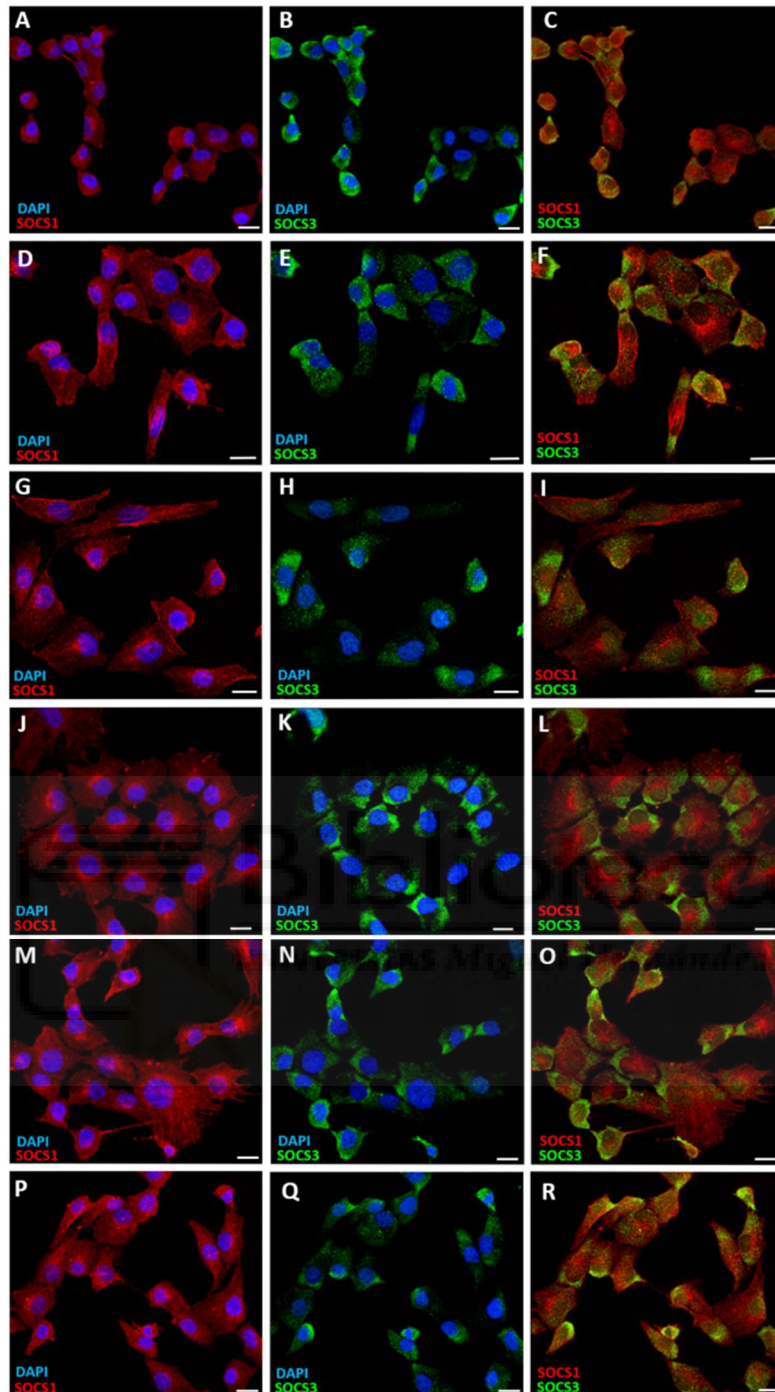


Figura 4.17: Inmunolocalización de las proteínas SOCS1 y SOCS3 en las líneas celulares establecidas de GBM. Las micrografías corresponden a las tinciones realizadas sobre las células de GBM. En rojo se muestra la proteína SOCS1 en las líneas celulares HGUE GB 16 (A), HGUE GB 37 (D), HGUE GB 39 (G), HGUE GB 40 (J), HGUE GB 42 (M), HGUE GB 48 (P). En verde la proteína SOCS3 en las líneas de GBM siguiendo el mismo orden que en la proteína anterior (B, E, H, K, N, y Q). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en azul. Las colocalizaciones de ambas proteínas se muestran en los paneles (C, F, I, L, O y R) dispuestos nuevamente respetando el orden de cada línea celular establecido para la proteína SOCS1. Barras de escala 20 μm .

Resultados

Todas las líneas celulares de GBM establecidas presentaron inmunotinciones positivas para ambas proteínas, lo que coincidió con la expresión obtenida a nivel de ARNm en dichas líneas. Las proteínas SOCS1 y SOCS3 se encontraron dispersas por el citoplasma, sin asociarse aparentemente a ningún orgánulo específico, ninguna de las dos presentó una localización nuclear. Los dobles inmunomarcajes revelaron que no existía colocalización entre ambas proteínas en el interior citoplasmático.

4.3.2.4 Correlación de los niveles basales de expresión de los genes SOCS1 y SOCS3 con el grado de radiorresistencia observado en las líneas celulares de GBM establecidas

En los apartados anteriores se comprobó que las 6 líneas celulares de GBM establecidas mostraron niveles similares de expresión a nivel de ARNm de los genes *SOCS1* y *SOCS3*. Así mismo, en el estudio inmunocitoquímico de ambas proteínas se observó que todas las líneas celulares presentaban la misma distribución celular de las proteínas SOCS1 y SOCS3. Al no encontrarse resultados diferenciales entre las distintas líneas celulares establecidas, no se pudo establecer una correlación entre el nivel de expresión basal de los genes *SOCS1* y *SOCS3* a nivel de ARNm, ni de proteína con los distintos grados de radiorresistencia observados en las líneas celulares de GBM establecidas.

La ausencia de correlación entre los niveles basales de expresión de estos genes a nivel de ARNm, y el grado de radiorresistencia de las líneas celulares se confirmó estadísticamente mediante el test de correlación de *Spearman*. Para ello, se categorizó el nivel de resistencia radioterápica en una escala de 1 a 3, dando el valor de 1 a la línea más resistente, el valor 2 a las que presentaron una resistencia intermedia, y el valor 3 a las líneas más sensibles. Después, se calcularon los coeficientes de *Spearman* para la radiorresistencia y la expresión basal de cada gen, y los valores de p-valor para identificar la existencia de relación entre ambas variables. En ambos genes el resultado de p-valor fue superior a 0,05: siendo de 0,107 para *SOCS1*, y 0,274 para *SOCS3*. Por lo tanto, no se pudieron asociar los niveles de expresión basal de los genes *SOCS1* o *SOCS3* con los grados de resistencia a la radioterapia presentada por las líneas celulares de GBM.

4.3.3 Efecto de la radioterapia sobre la expresión de *SOCS1* y *SOCS3*

Al no establecerse una relación entre la expresión basal de los genes *SOCS1* y *SOCS3* con la resistencia a la radioterapia, se abordó el efecto de esto último sobre la expresión a nivel de ARNm de los genes *SOCS1* y *SOCS3*. Para ello se siguieron dos estrategias distintas. La primera de ellas consistió en llevar a cabo experimentos de dosis respuesta y ciclos temporales estudiando los cambios de expresión en los genes *SOCS1* y *SOCS3*. La segunda se basó en la obtención de clones resistentes a la radioterapia mediante exposición continuada a la irradiación.

4.3.3.1 Estudio del efecto de la radioterapia a diferentes tiempos y dosis sobre la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3*

Los estudios de expresión en este ensayo se realizaron utilizando como muestra normalizadora el ARN extraído de la línea celular correspondiente no irradiada. En el caso de los ciclos temporales, se recogieron células tanto irradiadas como sin irradiar a los mismos tiempos, y el ARN de las células sin irradiar se utilizó como muestra normalizadora.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la radioterapia sobre la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* a las 24 h de haber sometido a las líneas celulares al tratamiento radioterápico. En este caso, la expresión de ambos genes no se vio alterada en ninguna de las líneas celulares de GBM establecidas (**Figura 4.18**).

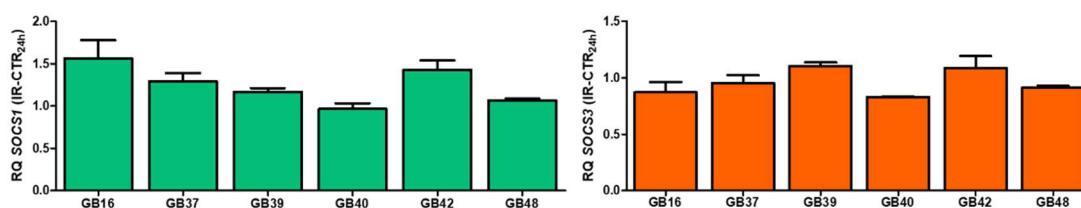


Figura 4.18: Valores de expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* 24 h post-irradiación en las líneas celulares de GBM. Las barras verdes representan los valores de RQ del gen *SOCS1*, y las barras naranjas los valores de RQ del gen *SOCS3*. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 6$).

Tras este resultado, se realizaron ciclos temporales post-irradiación en la línea celular más radorresistente (HGUE GB 39) y más radiosensible (HGUE GB 42), para comprobar la existencia de cambios de expresión en los genes *SOCS1* y *SOCS3* a tiempos más cortos.

Resultados

Asimismo, estas dos líneas celulares se sometieron a diferentes dosis de radioterapia, y se tomaron muestras de células para extraer ARN a las 24 h de la exposición a la radiación.

La expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* a nivel de ARNm no varió en las células irradiadas con respecto a las células control en la línea celular HGUE GB 39 (**Figura 4.19-A y 4.19-B**), ni en la línea celular HGUE GB 42 (**Figura 4.19-C y 4.19-D**) a ninguno de los 5 tiempos ensayados. En el caso del estudio dosis-respuesta, la expresión del gen *SOCS1* no se modificó significativamente en ninguna de las líneas celulares tras el tratamiento con diferentes dosis de radioterapia. No obstante, la línea celular HGUE GB 39 mostró una tendencia a disminuir la expresión de *SOCS1* a las dosis más altas, y en el caso de la línea HGUE GB 42 se observó la tendencia contraria (**Figura 4.19-E y 4.19-G**). La expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm disminuyó significativamente ($RQ < 0,5$) en la línea celular HGUE GB 39 cuando fue tratada con la dosis de 10 Gy (**Figura 4.19-F**).

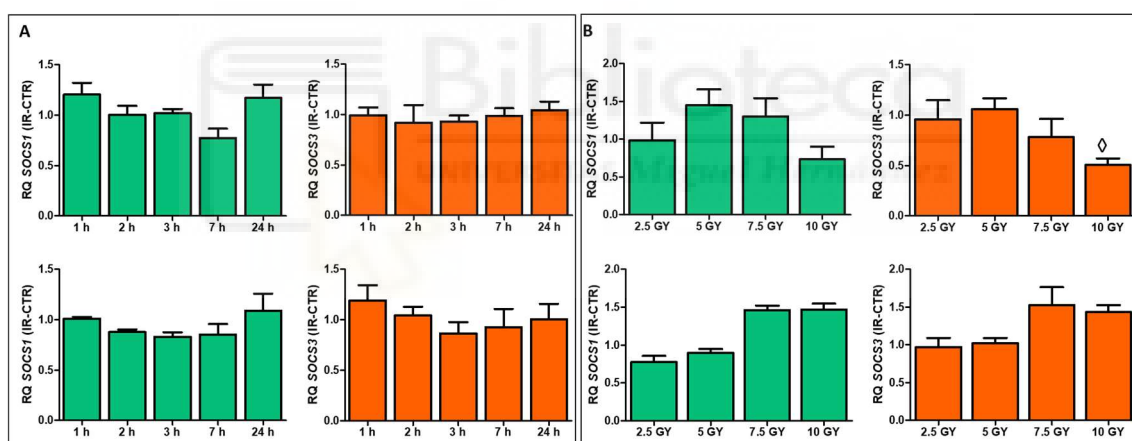


Figura 4.19: Valores de RQ de los genes *SOCS1* y *SOCS3* obtenidos a partir de los ciclos temporales post-irradiación (A) y de los estudios de exposición a diferentes dosis de radioterapia (B) en las líneas celulares HGUE GB 39 y HGUE GB 42. Las barras verdes indican los valores de expresión del gen *SOCS1*, y las naranjas los valores de expresión del gen *SOCS3*. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$). ◇ indica valores de $RQ \geq 2$ o $\leq 0,5$.

4.3.3.2 Creación de un modelo de radiorresistencia para estudiar el efecto la radioterapia sobre la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3*

Para este estudio se sembró la línea celular HGUE GB 39 en una placa de cultivo celular, y fue sometida a una sesión semanal de radioterapia en la que se le aplicó una dosis de 5 Gy durante 9 semanas. Se eligió la línea celular más radiorresistente y una dosis menor

a la habitual para intentar conseguir que algunas células fuesen capaces de adaptarse a la radioterapia, y adquirir resistencia a la misma. El tratamiento se concluyó a las 9 semanas, porque que en este momento la densidad celular era mínima, y únicamente quedaban células aisladas y dispersas por toda la placa. La dosis total que habían recibido dichas células fue de 45 Gy. Las células que habían sobrevivido al tratamiento continuado se mantuvieron en la misma placa de cultivo, realizándose cambios de medio de forma periódica, para comprobar si eran capaces de reponerse, dividirse y formar una población clonal. A los 10 días de haber cesado las sesiones de radioterapia, empezó a visualizarse el inicio de pequeñas poblaciones clonales que habían surgido a partir de estas células sobreexpuestas a la irradiación (**Figura 4.20**). En total se obtuvieron 10 comunidades clonales que se aislaron de la placa utilizando cilindros de clonación, y se sembraron en placas de 24 pocillos para favorecer su crecimiento. Cuando la confluencia celular en esta placa llegó al 90%, se duplicaron en una placa de 6 pocillos, y de nuevo al llegar a una confluencia del 90% estos duplicados se sembraron en frascos T25, donde se mantuvieron de la forma habitual. Únicamente, consiguieron completar todo el proceso 5 poblaciones de las 10 iniciales.



Figura 4.20: Poblaciones clonales obtenidas de la línea celular de GBM HGUE GB 39. Imágenes de las poblaciones clonales del HGUE GB 39 obtenidas tras el tratamiento radioterápico. Población clonal 3 (A), Población clonal 4 (B), Población clonal 6 (C). Las circunferencias rojas delimitan los márgenes de la población. Barra de escala: 20 μm .

A continuación, se sometieron estas 6 poblaciones clonales al tratamiento habitual de radioterapia para evaluar su radiorresistencia, y compararla con la línea celular de GBM de partida (HGUE GB 39). Los datos obtenidos de las poblaciones clonales y de la línea celular de partida fueron no paramétricos, por lo que las comparaciones se llevaron a cabo mediante la prueba estadística *U* de *Mann Whitney*. Todos los contrastes realizados entre las poblaciones clonales y la línea celular de la que provenían arrojaron

Resultados

un p-valor $< 0,05$, indicando que existían diferencias significativas en el porcentaje de células acumuladas en las fases SubG₁ y G₂/M tras el tratamiento radioterápico entre las poblaciones clonales y la línea celular HGUE GB 39. Como se puede observar en la **Figura 4.21**, este porcentaje fue menor en las poblaciones clonales con respecto a la línea celular de partida, por lo que se consideró que todas ellas habían adquirido un mayor grado de radiorresistencia como consecuencia de la exposición prolongada a la irradiación.

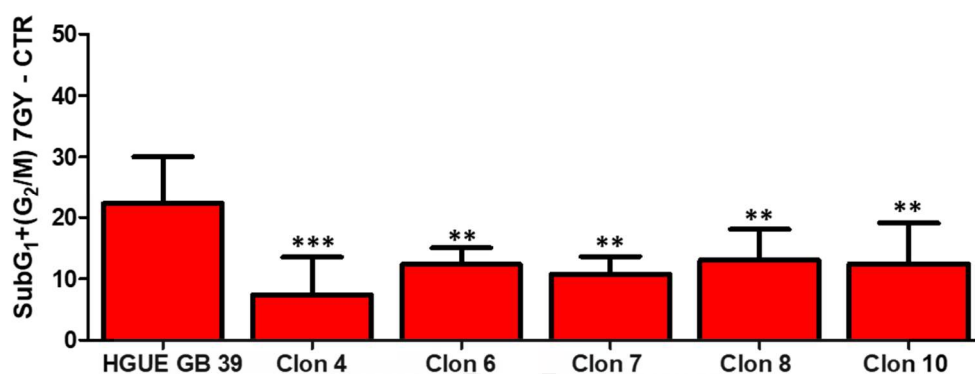


Figura 4.21: Efecto de la radioterapia sobre la línea celular HGUE GB 39 y las 5 poblaciones clonales obtenidas a partir de ella. Las barras rojas indican los porcentajes de células en las fases SubG₁ y G₂/M de la línea celular HGUE GB 39, y de las poblaciones clonales 3, 4, 6, 7 y 10. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$). ** indica valores de p-valor $< 0,01$; *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

Tras los resultados obtenidos, se evaluó la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* a nivel de ARNm en estos 5 clones, con el fin de comprobar si la adquisición de radiorresistencia conseguida estaba relacionada con sus niveles de expresión. En este caso, se calcularon los valores de RQ para la expresión de *SOCS1* y *SOCS3* en los clones utilizando como muestra normalizadora el cultivo HGUE GB 39. La expresión a nivel de ARNm del gen *SOCS1* se mantuvo en niveles similares a los observados en la línea celular HGUE GB 39 en todas las subpoblaciones clonales (**Figura 4.22-A**). En cuanto a la expresión del gen *SOCS3*, se redujo significativamente con respecto a la línea celular de origen en todas las poblaciones clonales (**Figura 4.22-B**).

Dado que en las poblaciones clonales obtenidas a partir de la exposición continuada a la irradiación había aumentado su radiorresistencia y, reducido significativamente la expresión del gen *SOCS3*, se realizó este mismo proceso en la línea celular más sensible, HGUE GB 42, con el fin de corroborar estos resultados. En este caso, se obtuvo una

población clonal, en la que también se vio aumentada de forma significativa su radiorresistencia (**Figura 4.23-A**), y a su vez reducida la expresión del gen *SOCS3* (**Figura 4.23-B**) con respecto a la línea celular HGUE GB 42. La expresión del gen *SOCS1*, de nuevo no sufrió variaciones por la exposición radioterápica (**Figura 4.23-C**).

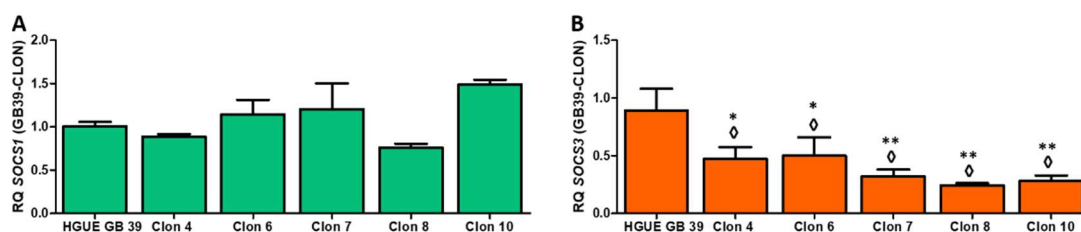


Figura 4.22: Expresión basal a nivel de ARNm de los genes *SOCS1* (A) y *SOCS3* (B), en la línea celular HGUE GB 39, y en las poblaciones clonales. Las barras verdes representan los valores de RQ del gen *SOCS1*, las naranjas los valores de RQ del gen *SOCS3*. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$). \diamond indica valores de $RQ \geq 2$ o $\leq 0,5$. ** indica valores de p-valor $< 0,01$; *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

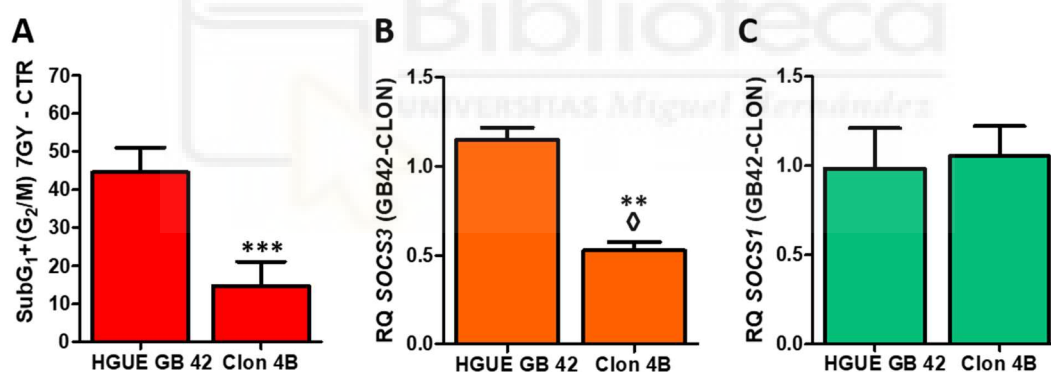


Figura 4.23: Efecto de la radioterapia y niveles de expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en la línea celular HGUE GB 42 y la población clonal 4B. Las barras rojas indican los porcentajes de células en las fases SubG₁/G₂M en la línea celular HGUE GB 42 y en el clon 4B tras el tratamiento (A). Las barras naranjas muestran los valores de RQ de *SOCS3* (B), y barras las verdes los valores de RQ del gen *SOCS1* (C) para línea celular HGUE GB 42 y la población clonal 4B. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$). \diamond indica valores de $RQ \geq 2$ o $\leq 0,5$. ** indica valores de p-valor $< 0,01$; *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

Por último, se analizó la estabilidad de los cambios observados en las poblaciones clonales con respecto a su respuesta frente a la radioterapia, con el objetivo de comprobar si la radiorresistencia que habían adquirido los clones se mantenía en el

Resultados

tiempo, sin aplicar de forma periódica el tratamiento radioterápico. Para ello, se mantuvieron las subpoblaciones clonales de la misma forma que el resto de las líneas celulares, y no se sometieron a sesiones radioterápicas. Transcurridos 15 días desde el cese del tratamiento radioterápico, se irradiaron los subcultivos clonales y la línea celular de origen de la forma habitual. Después, se determinó la distribución del ciclo celular en cada uno de ellos, y el nivel de expresión del gen *SOCS3*. El porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M tras la irradiación de los clones fue similar a la de la línea celular de origen (**Figura 4.24-A**), al igual que los niveles de expresión del gen *SOCS3*, que no presentaron diferencias significativas entre las poblaciones clonales y la línea celular HGUA GB 39 (**Figura 4.24-B**). Por lo tanto, se comprobó que la exposición prolongada y sistemática a la irradiación aumentó la resistencia a la radioterapia en las líneas celulares de GBM, y disminuyó su expresión del gen *SOCS3*. Sin embargo, la radorresistencia adquirida, así como las modificaciones de expresión génica observadas, no fueron estables en el tiempo y se perdieron tras el cese del tratamiento.

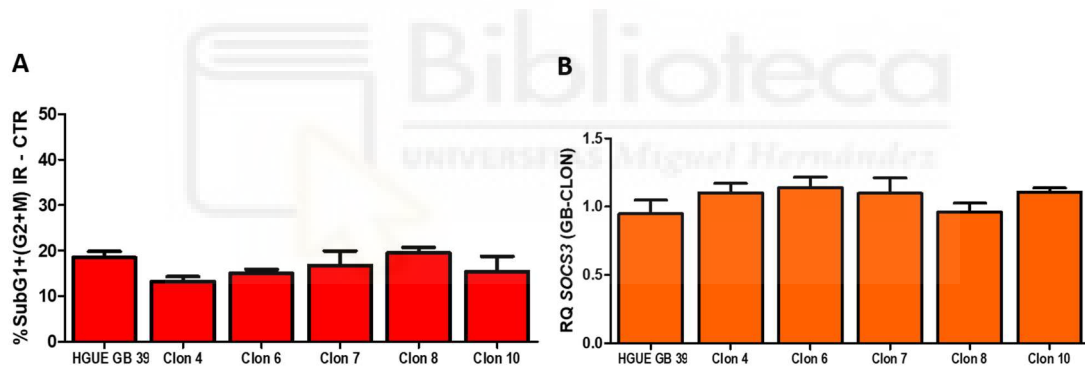


Figura 4.24: Efecto de la radioterapia sobre el ciclo celular (A) y la expresión del gen *SOCS3* (B) en la línea celular HGUE GB 39 y las poblaciones clonales. Las barras rojas indican los porcentajes de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las muestras del cultivo primario HGUE GB 39, y de las poblaciones clonales 4, 6, 7, 8 y 10 irradiadas menos las muestras de los mismos cultivos sin irradiar. Las barras naranjas representan los niveles de expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm en la línea celular de GBM y en los clones obtenidos a partir de ella. Los segmentos negros indican la desviación estándar (n ≥ 3).

4.3.4 Efecto de la alteración de la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* sobre la radorresistencia de las líneas celulares de GBM

Las tendencias de expresión en los genes *SOCS1* y *SOCS3* observadas en las líneas celulares HGUE GB 39 y HGUE GB 42 tras las dosis de radioterapia más altas, y la disminución en la expresión de *SOCS3* en las poblaciones clonales, llevó a plantear la

hipótesis de la relación entre la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* y la radiorresistencia en las líneas celulares de GBM. Para confirmar esta teoría se llevaron a cabo transfecciones con ARNsi en todas las líneas celulares de GBM, dirigidas a disminuir la expresión de ambos genes, y evaluar los cambios en la respuesta a la radioterapia de las diferentes líneas celulares.

4.3.4.1 Reducción de la expresión de *SOCS1* y *SOCS3* mediante ARNsi

El primer paso fue comparar una muestra de las células transfectadas con el ARNsi inespecífico (ARNsi.NS) frente a una muestra de las células control, con el fin de comprobar si la transfección conllevaba un efecto biológico *per se*. Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas entre ambas muestras (CTR VS ARNsi.NS) en la distribución del ciclo celular, y tampoco a nivel de expresión del gen estudiado, ya que los p-valores obtenidos para ambos genes fueron mayores que 0,05.

Tras esta comprobación, se continuó con los estudios de transfección en las líneas celulares de GBM. Se analizó la expresión de ambos genes antes del tratamiento radioterápico, y los cambios en el ciclo celular tras la irradiación. En estos experimentos, se comparó la expresión a nivel de ARNm entre la muestra transfectada con el ARNsi.NS y con el ARNsi del gen de interés, para comprobar que había disminuido la expresión. Además, se valoró el efecto de la radioterapia mediante estudio del ciclo celular en las dos muestras, con el fin de detectar cambios en la radiorresistencia de las líneas celulares debidos a la bajada de expresión producida.

La expresión a nivel de ARNm del gen *SOCS1* en las muestras transfectadas con el ARNsi específico del gen *SOCS1* (ARNsi.SOCS1) se redujo en un 70 % con respecto a las muestras transfectadas con el ARNsi.NS (**Figura 4.25-A**). El tratamiento radioterápico produjo el mismo efecto sobre el ciclo celular en ambas muestras (**Figura 4.25-B y 4.25-C**). Por lo tanto, no se pudo asociar la disminución en la expresión del gen *SOCS1* a nivel de ARNm con un cambio en el efecto de la radioterapia sobre las líneas celulares de GBM.

La transfección con el ARNsi específico del gen *SOCS3* (ARNsi.SOCS3) consiguió disminuir la expresión de dicho gen a nivel de ARNm en un 72% (**Figura 4.26-A**). El análisis de la

Resultados

distribución del ciclo celular mostró diferencias significativas en el efecto de la radioterapia sobre la línea celular transfectada con el ARNsi.SOCS3 con respecto a la línea transfectada con el ARNsi.NS. Las células en las que se había reducido la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm presentaron una mayor radorresistencia que aquellas en las que se habían mantenido sus niveles (transfectadas con ARNsi.NS) (Figura 4.26-B y 4.26-C). Por lo tanto, se comprobó que al disminuir la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm, las líneas celulares aumentaban su resistencia a la radioterapia.

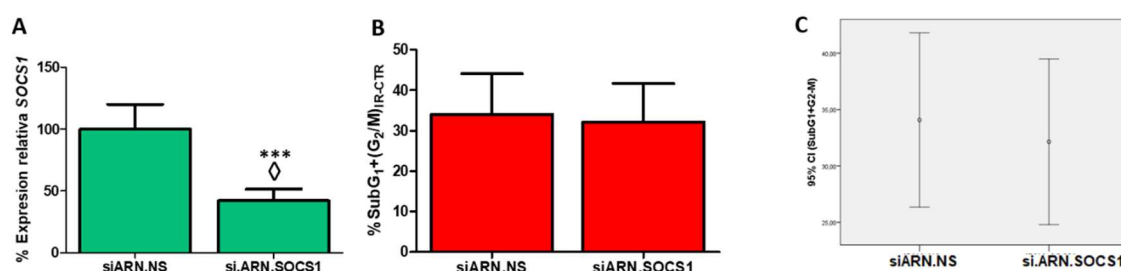


Figura 4.25: Efecto de la transfección del ARNsi.SOCS1 a nivel de ARNm (A), y sobre la distribución del ciclo celular (B y C). Las barras verdes muestran el porcentaje del valor de RQ de *SOCS1* en las muestras transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.SOCS1 (A). Las barras rojas muestran el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las líneas celulares transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.SOCS1 (B). Se muestra el intervalo de confianza obtenido para la comparación entre las células transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.SOCS1 (C). \diamond indica valores de RQ ≥ 2 o $\leq 0,5$. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 18$). *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

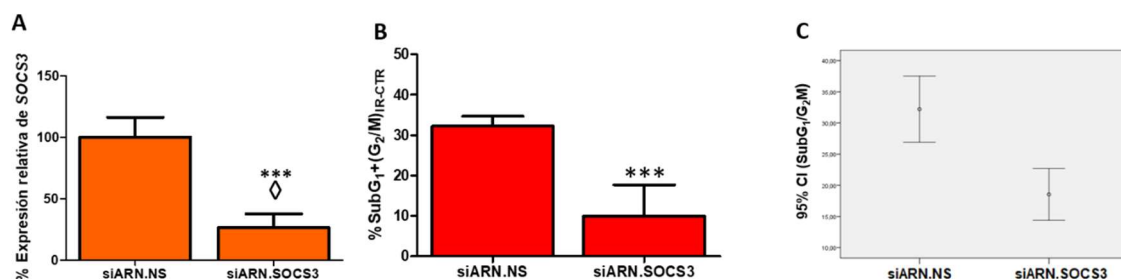


Figura 4.26: Efecto de la transfección del ARNsi.SOCS3 a nivel de ARNm (A), y sobre la distribución del ciclo celular (B y C). Las barras naranjas muestran el porcentaje del valor de RQ de *SOCS3* en las muestras transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.SOCS3 (A). Las barras rojas muestran el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las líneas celulares transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.SOCS3 (B). Se muestra el intervalo de confianza obtenido para la comparación entre las células transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.SOCS3 (C). Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 18$). \diamond indica valores de RQ ≥ 2 o $\leq 0,5$. *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

4.3.4.2 Regulación recíproca de la expresión de *SOCS1* y *SOCS3*

En el Capítulo 1 se señaló la controversia existente en la literatura científica sobre la regulación recíproca de los genes *SOCS1* y *SOCS3*, y su implicación en la resistencia a las radiaciones ionizantes [154]. Por ello, una vez realizados los experimentos de transfección con los ARNsi específicos para ambos genes, se estudió si la bajada de expresión en uno de ellos afectaba al nivel de expresión del otro. En nuestro caso, no se pudo demostrar que la disminución de la expresión de cada uno de ellos tuviera efecto sobre la expresión del otro, puesto que no se obtuvieron valores medios de RQ diferentes de 1 al reducir de cada uno de ellos (**Figura 4.27**).

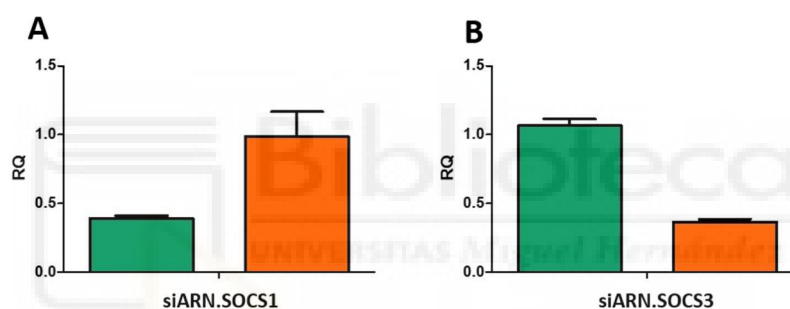


Figura 4.27: Resultado del estudio de relación entre los genes *SOCS1* y *SOCS3*. Valores medios de RQ de los genes *SOCS1* (verde) y *SOCS3* (naranja) para las muestras transfectadas con ARNsi.SOCS1 (**A**), y ARNsi.SOCS3 (**B**). Los segmentos negros representan los valores de desviación estándar ($n \geq 18$).

4.3.4.3 Efecto de la sobreexpresión del gen *SOCS3* sobre la radioterapia

La implicación del gen *SOCS3* en la adquisición de resistencia a la radioterapia en las líneas celulares de GBM, hizo que se plantease la hipótesis de que la sobreexpresión de este gen podría contribuir a sensibilizar los cultivos primarios de GBM frente al tratamiento radioterápico. Por ello se llevó a cabo una sobreexpresión exógena del gen *SOCS3* en la línea celular de GBM HGUE GB 39, elegida en base a su mayor radiorresistencia. Esta línea celular se transfectó con 15 ng o 25 ng de un plásmido sintético que contenía la ORF del gen *SOCS3* bajo el promotor del citomegalovirus humano, con un doble objetivo: determinar si la utilización de una mayor cantidad de plásmido sintético conllevaba un mayor aumento en la expresión del gen a *SOCS3* a nivel

Resultados

de ARNm, y establecer si el efecto de sensibilización buscado se correlacionaba con el aumento de expresión de este gen.

Los datos obtenidos a través de la qRT-PCR mostraron un aumento de 3-4 veces en la expresión de *SOCS3* tras la transfección con el plásmido sintético al compararlas con la expresión de la muestra transfectada con el plásmido control (**Figura 4.28-A**). En cuanto a la distribución del ciclo celular en las muestras transfectadas control e irradiadas, se observó un incremento de aproximadamente el doble en el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M en las muestras transfectadas con el plásmido sintético de *SOCS3*, al compararlas con las muestras transfectadas con el plásmido control (**Figura 4.28-B**). El aumento observado fue similar tanto en las muestras transfectadas con 15 ng como con 25 ng de plásmido sintético, esto indicó que existía una relación entre la sobreexpresión del gen *SOCS3*, a nivel de ARNm, y el efecto del tratamiento radioterápico en el cultivo HGUE GB 39.

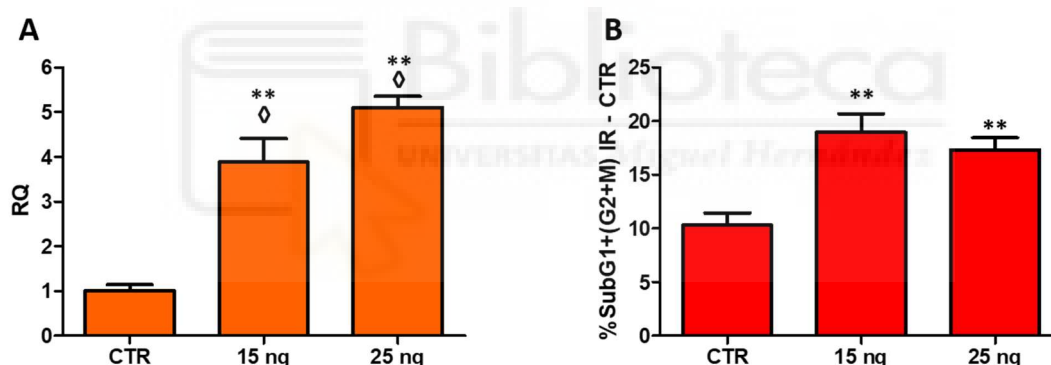


Figura 4.28: Efecto de la transfección con el plásmido sintético sobre la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm (A) y en el ciclo celular (B) en la línea celular HGUE GB 39. Las barras naranjas representan los valores de RQ, y las barras rojas indican los porcentajes de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las muestras irradiadas menos las muestras no irradiadas. CTR define a las muestras transfectadas con el plásmido control, 15 ng y 25 ng identifican las muestras transfectadas con 15 ng y 25 ng del plásmido sintético de *SOCS3* respectivamente. Los segmentos negros indican la desviación estándar (n ≥ 3). ◇ indica valores de RQ ≥ 2 o ≤ 0,5. ** indica valores de p-valor < 0,01.

4.4 Implicación de otros genes relacionados con *SOCS3* o con la respuesta a la radioterapia en la radiorresistencia de las líneas células de GBM establecidas

Dada la implicación directa de *SOCS3* en la adquisición de radiorresistencia en las líneas celulares de GBM, se decidió analizar si los genes *PTK6*, *MSK1* y *NRF2* estaban relacionados con la respuesta a la radioterapia y a su vez con *SOCS3*, ya que anteriormente en nuestro grupo de investigación se habían obtenido resultados preliminares en los que se indicaba que estos genes podían estar influyendo en la respuesta a la quimioterapia.

4.4.1 Expresión basal de los genes *PTK6*, *MSK1* y *NRF2* en las líneas celulares de GBM establecidas

En primer lugar, se comprobó si estos genes se expresaban de forma diferencial en las líneas celulares de GBM establecidas con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano. Para ello, se extrajo ARN de las líneas celulares establecidas en estado basal, y después se valoró la expresión de los genes *PTK6*, *MSK1* y *NRF2* a nivel de ARNm mediante q-PCR. La expresión del gen *PTK6* fue superior en las líneas celulares de GBM con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano. El cultivo HGUE GB 40 fue el que presentó una menor expresión a nivel de ARNm del gen *PTK6* (FC=3), los demás cultivos mostraron sobreexpresiones similares de dicho gen con valores de FC entre 4 y 5 (Figura 4.29).

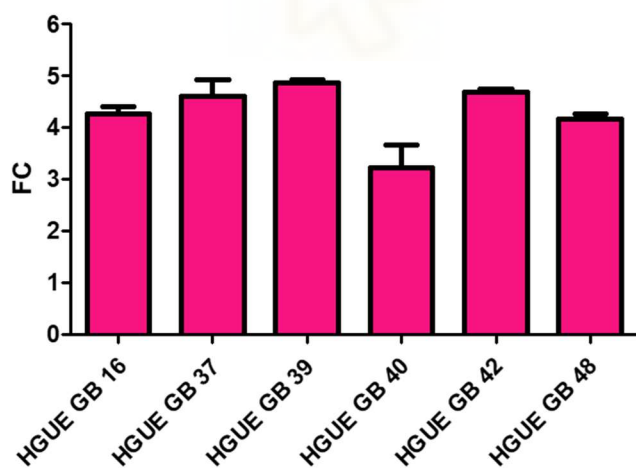


Figura 4.29: Estudio de la expresión del gen *PTK6* a nivel de ARNm en las líneas celulares de GBM establecidas. Las barras rosas representan los valores de FC del gen *PTK6* para cada línea celular. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$).

Los niveles de expresión del gen *NRF2* presentaron valores de FC cercanos a 0 en todas las líneas celulares de GBM establecidas, obteniéndose la mayor diferencia de expresión con la línea celular HGUE GB 40 que alcanzó un valor negativo de FC igual a -1 . Sin embargo, estos valores de FC no fueron suficientes para considerar la existencia de diferencias significativas entre la expresión de *NRF2* en las líneas celulares de GBM y el

Resultados

pool de ARN de cerebro sano (**Figura 4.30-A**). En cambio, el gen *MSK1* se encontró infraexpresado en las 6 líneas de GBM establecidas, puesto que todas ellas presentaron valores negativos de FC al compararlas con el ARN de cerebro sano. La línea celular que mostró un menor nivel de expresión de este gen fue HGUE GB 40, cuyo valor de FC fue de -4,5, el resto presentó valores negativos de FC cercanos a -3 (**Figura 4.30-B**).

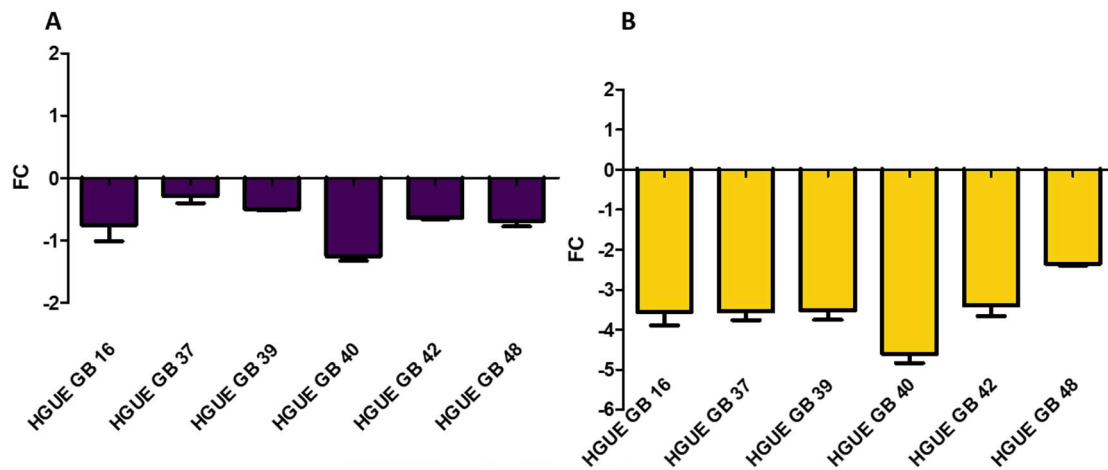


Figura 4.30: Estudio de la expresión de los genes *NRF2* (A) y *MSK1* (B) a nivel de ARNm en las líneas celulares de GBM. Las barras moradas representan los valores de FC del gen *NRF2* para cada línea celular (A), y las barras amarillas los valores de FC del gen *MSK1* (B). Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$).

4.4.2 Asociación de los genes *PTK6*, *NRF2* y *MSK1* con la resistencia a la radioterapia

Las diferencias de expresión de los genes estudiados en las seis líneas celulares de GBM con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano, indicaron que su expresión se encuentra alterada en este tipo de tumores. Además, se observó que la expresión de alguno de estos genes no era uniforme en todas líneas celulares estudiadas, al igual que no lo había sido su grado de resistencia a la radioterapia. Por ello, nos planteamos la hipótesis de que la expresión basal de estos genes pudiese estar relacionada con la radiorresistencia.

El grado de asociación entre los niveles basales de expresión de los genes *PTK6*, *NRF2* y *MSK1* y el grado de radiorresistencia de los cultivos primarios establecidos se analizó a través del cálculo del coeficiente de correlación de *Spearman*, siguiendo el mismo proceso que se empleó para los genes *SOCS1* y *SOCS3*. El p-valor de la correlación entre la resistencia a la radioterapia y *PTK6* fue igual a 0,926, en el caso de *NRF2* fue de 0,789,

y para *MSK1* fue de 0,333. Por lo tanto, al no obtener ningún p-valor significativo no se pudo asociar la expresión basal de ninguno de los genes estudiados con la radiorresistencia presentada por los cultivos primarios de GBM.

4.4.3 Efecto de la reducción de la expresión a nivel de ARNm de los genes *PTK6*, *NRF2* y *MSK1* en la resistencia a la radioterapia

Al no encontrar una asociación entre la expresión basal a nivel de ARNm de estos genes con la radiorresistencia presentada por las líneas celulares de GBM, se realizaron experimentos de interferencia dirigidos a disminuir la expresión de dichos genes para determinar su implicación en la resistencia a la radioterapia.

Se siguió el mismo protocolo que se había llevado a cabo en el caso de las transfecciones con los ARNsi de *SOCS1* y *SOCS3*, aunque en este caso se utilizaron ARNsi específicos de *PTK6*, *NRF2* y *MSK1*. De nuevo, se comparó la muestra transfectada con el ARNsi.NS, frente a la muestra CTR, y tampoco se obtuvieron diferencias significativas a nivel de expresión ni de ciclo celular entre ambas muestras. Por lo tanto, se prosiguió con los estudios de transfección en las líneas celulares de GBM.

La reducción de la expresión del gen *PTK6* a nivel de ARNm, como resultado de la transfección con el ARNsi específico del gen *PTK6* (ARNsi.PTK6) fue de un 89 % en todas las muestras con respecto a las muestras transfectadas con el ARNsi.NS (**Figura 4.31-A**). Esta bajada de expresión conllevó una disminución significativa del porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M tras el tratamiento radioterápico en las muestras transfectadas con ARNsi.PTK6, que no se produjo en las muestras transfectadas con el ARNsi.NS. Por lo tanto, la bajada en la expresión de *PTK6*, a nivel de ARNm, supuso un aumento en la radiorresistencia de las líneas celulares de GBM (**Figura 4.31-B y 4.31-C**).

En el caso del gen *NRF2*, la transfección con el ARNsi específico de este gen (ARNsi.NRF2) consiguió disminuir su expresión en un 92% con respecto a las muestras transfectadas con el ARNsi.NS en todas las líneas celulares de GBM (**Figura 4.32-A**). Las muestras transfectadas con el ARNsi.NRF2 de los cultivos irradiados, presentaron un porcentaje significativamente menor de células en las fases SubG₁ y G₂/M al compararlas con el mismo porcentaje de células de las muestras transfectadas con el ARNsi.NS en los cultivos igualmente irradiados (**Figura 4.32-B y 4.32-C**). Esto permitió asociar la

Resultados

disminución en la expresión del gen *NRF2* con la adquisición de radiorresistencia por parte de las líneas celulares de GBM.

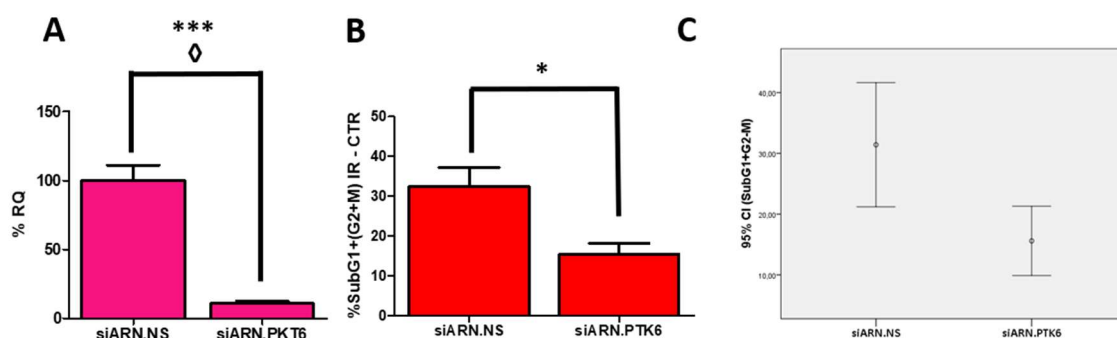


Figura 4.31: Efecto de la transfección del ARNsi.*PTK6* a nivel de ARNm, y sobre la distribución del ciclo celular. Las barras rosas muestran el porcentaje del valor de RQ de *PTK6* en las muestras transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.*PTK6* (A). Las barras rojas muestran el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las líneas celulares transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.*PTK6* (B). Se muestra el intervalo de confianza obtenido para la comparación entre las células transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.*PTK6* (C). Los segmentos negros indican la desviación estándar (n ≥ 3). ◊ indica valores de RQ ≥ 2 o ≤ 0,5. * indica valores de p-valor < 0,05; *** indica valores de p-valor < 0,001.

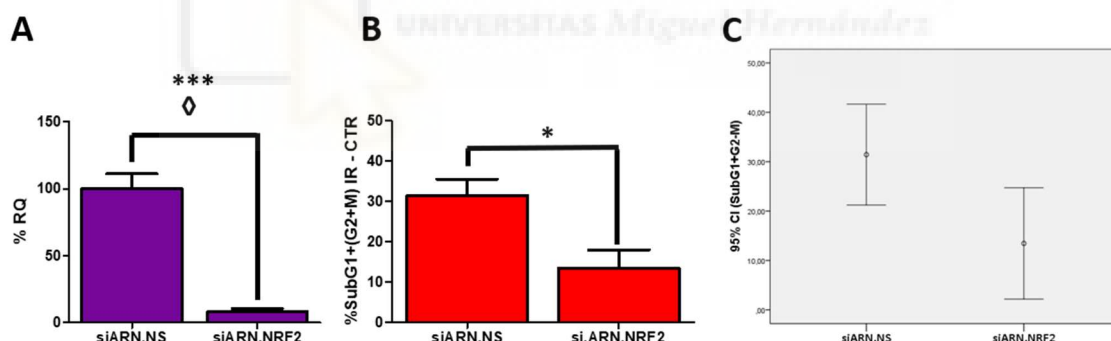


Figura 4.32: Efecto de la transfección del ARNsi.*NRF2* a nivel de ARNm, y sobre la distribución del ciclo celular. Las barras moradas muestran el porcentaje del valor de RQ de *NRF2* en las muestras transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.*NRF2* (A). Las barras rojas muestran el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las líneas celulares transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.*NRF2* (B). Se muestra el intervalo de confianza obtenido para la comparación entre las células transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.*NRF2* (C). Los segmentos negros indican la desviación estándar (n ≥ 3). ◊ indica valores de RQ ≥ 2 o ≤ 0,5. * indica valores de p-valor < 0,05; *** indica valores de p-valor < 0,001.

Por último, la disminución de expresión del gen *MSK1* que se produjo como resultado de la transfección de las muestras de las líneas celulares de GBM con el ARNsi específico

del gen *MSK1* (ARNsi.MSK1) fue de un 89% con respecto a las muestras transfectadas con el ARNsi.NS (**Figura 4.33-A**). Esta disminución provocó una reducción significativa del porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M en las muestras transfectadas con el ARNsi.MSK1 e irradiadas, con respecto a las muestras transfectadas con el ARNsi.NS (**Figura 4.33-B y 4.323C**), lo que indicó que la baja de expresión del gen *MSK1* a nivel de ARNm estuvo relacionada con la resistencia a la radioterapia en las líneas celulares de GBM.

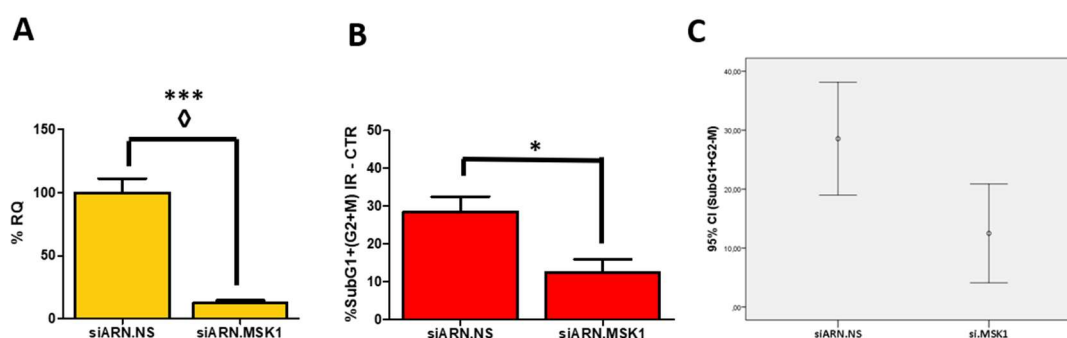


Figura 4.33: Efecto de la transfección del ARNsi.MSK1 a nivel de ARNm, y sobre la distribución del ciclo celular. Las barras amarillas muestran el valor de RQ, expresado en porcentaje, de la expresión de *MSK1* en las muestras transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.MSK1 (**A**). Las barras rojas muestran el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las líneas celulares transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.MSK1 (**B**). Se muestra el intervalo de confianza obtenido para la comparación entre las células transfectadas con el ARNsi.NS, y con el ARNsi.MSK1 (**C**). Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$). ◊ indica valores de RQ ≥ 2 o $\leq 0,5$. * indica valores de p-valor $< 0,05$; *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

4.4.4 Asociación entre los niveles de expresión a nivel de ARNm de los genes *SOCS3*, *PTK6*, *NRF2* y *MSK1*

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores demostraron que *SOCS3*, *PTK6*, *NRF2* y *MSK1* influyeron en la adquisición de radiorresistencia en las líneas celulares de GBM. Por ello, se estudiaron los efectos en la expresión de estos genes al disminuir la expresión de cada uno de ellos a través de los estudios de transfección de ARNsi llevados a cabo.

Para realizar este estudio, se calcularon los valores de RQ de estos genes en las muestras obtenidas en cada uno de los ensayos de interferencia. Por ejemplo, se halló la expresión de *PTK6*, *NRF2*, y *MSK1* en las muestras de ARN tomadas a partir de las líneas celulares

Resultados

transfectadas con el ARNsi.SOCS3. Después estos valores de RQ se compararon con el valor 1, ya que según la fórmula utilizada para el cálculo de RQ, este valor indica que no hay diferencias en la expresión. Por lo tanto, si al transfectar las muestras de los cultivos con ARNsi.SOCS3 los valores de expresión de los demás genes no difieren de 1, se puede decir que la disminución de la expresión de *SOCS3*, a nivel de ARNm, no afecta a la expresión del resto de genes. En este caso, se consideró que existían diferencias significativas cuando los valores de RQ fueron $\geq 1,5$ o $\leq 0,75$, ya que 2 de los 4 genes estudiados codifican proteínas de tipo quinasa (*PTK6* y *MSK1*), y ligeras modificaciones en su expresión pueden desencadenar un efecto biológico muy significativo. En las muestras transfectadas con ARNsi.SOCS1 no se realizó el estudio de la expresión de los demás genes, porque la bajada en su expresión no se correspondió con un efecto biológico a nivel de ciclo celular tras el tratamiento radioterápico.

La bajada de la expresión del gen *SOCS3*, a nivel de ARNm, a través del ensayo de transfección conllevó una subida de la expresión del gen *PTK6* (RQ=1,5), y una disminución del gen *MSK1* (RQ=0,65). Los demás genes estudiados no se vieron afectados (**Figura 4.34-A**). La transfección con el ARNsi.PTK6 no produjo alteraciones a nivel de ARNm en ninguno de los genes estudiados (**Figura 4.34-B**). La expresión a nivel de ARNm del gen *MSK1* disminuyó de forma significativa (RQ=0,5) al transfectar los cultivos con ARNsi.NRF2, y no se observaron cambios en los demás genes (**Figura 4.34-C**). Finalmente, la transfección de los cultivos con el ARNsi.MSK1 no originó diferencias de expresión en el resto de los genes estudiados (**Figura 4.34-D**). Estos resultados mostraron que *SOCS3* influye en la expresión de los genes *PTK6* y *MSK1*, y que el gen *NRF2* también está relacionado con la expresión del gen *MSK1*.

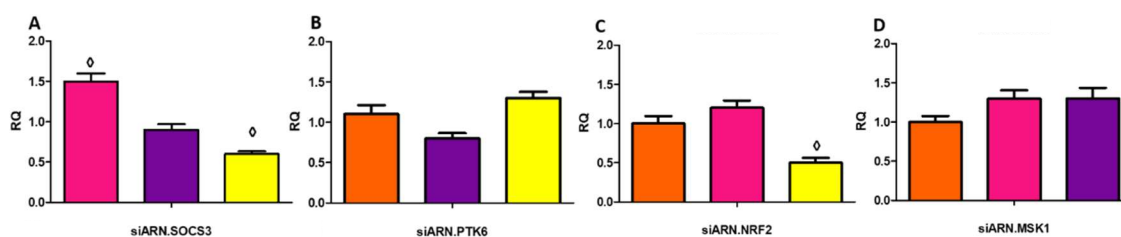


Figura 4.34: Relaciones de expresión entre los genes *SOCS3*, *PTK6*, *NRF2* y *MSK1*. Las barras indican los valores de RQ de los genes *SOCS3* (naranja), *PTK6* (rosa), *NRF2* (morado) y *MSK1* (amarillo) en las muestras transfectadas con ARNsi.SOCS3 (A), ARNsi.PTK6 (B), ARNsi.NRF2 (C), ARNsi.MSK1 (D). Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 6$). ◊ indica valores de RQ $\geq 1,5$ o $\leq 0,75$.

4.5 Uso del TSA como posible potenciador de la radioterapia

El TSA es un inhibidor de las HDAC, por lo que la administración de este compuesto, entre otros efectos, conlleva una acetilación constante de las histonas que conforman la cromatina. Esto puede implicar la activación de genes que se encuentren regulados por este mecanismo. El estudio de metilación de los promotores de *SOCS1* y *SOCS3* realizado en este trabajo, reveló que los cultivos primarios establecidos no poseían los promotores de estos genes metilados. Este hecho, unido al papel que juega el gen *SOCS3* en la resistencia a la radioterapia, hizo que se plantease el tratamiento del cultivo HGUE GB 39 con TSA con el fin de comprobar si ello implicaba un incremento endógeno en la expresión de *SOCS3* a nivel de ARNm, que además pudiera correlacionarse con una disminución en la radiorresistencia de dicho cultivo.

Para este estudio se llevaron a cabo pretratamientos de 16 h de la línea celular HGUE GG 39 con diferentes concentraciones de TSA. Transcurrido el tiempo de pre-tatamiento se extrajo el ARN de las muestras correspondientes para comprobar la subida de expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm, e inmediatamente se sometió al resto de células al tratamiento radioterápico habitual. Pasadas 24 h de la irradiación, se recogieron las muestras irradiadas y control para realizar el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

El pretratamiento con TSA produjo una subida de la expresión endógena del gen *SOCS3* directamente proporcional a la concentración utilizada (**Figura 4.35-A**). Así mismo, las células pretratadas con TSA mostraron una sensibilización frente al efecto de la radioterapia, que aumentó al aumentar las concentraciones de TSA utilizadas (**Figura 4.35-B**).

Por último, para determinar si la causa subyacente a la sensibilización a la radioterapia observada en el cultivo HGUE GB 39 al pretratar con TSA, fue el aumento en la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm, o el efecto *per se* del TSA, se realizó un experimento conjunto, utilizando de nuevo la línea celular HGUE GB 39, en la que se disminuyó la expresión del gen *SOCS3* con el ARNsi.*SOCS3*, y a la vez se pretrató dicho cultivo con TSA. El objetivo fue impedir el aumento de expresión de *SOCS3* causada por el TSA mediante

Resultados

el ARNsi, y comprobar si el cultivo seguía presentado una mayor radiosensibilidad independientemente de que no se hubiera elevado la expresión de *SOCS3*.

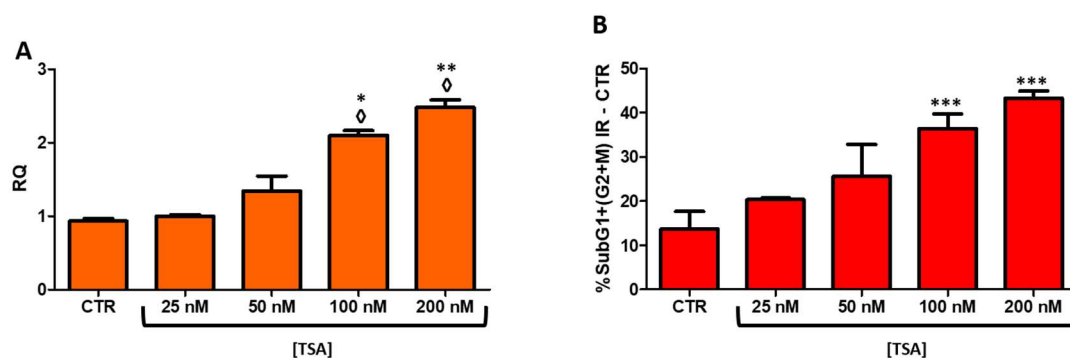


Figura 4.35: Efecto del pretratamiento con TSA sobre la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm (A) y sobre el ciclo celular (B). Las barras naranjas representan los valores de RQ de las muestras CTR y tratadas con TSA. Las barras rojas indican los porcentajes de células en las fases SubG₁ y G₂/M de las muestras irradiadas menos las muestras sin irradiar. CTR en el gráfico B define a las muestras irradiadas, pero no tratadas con TSA. Los segmentos negros indican la desviación estándar ($n \geq 3$). ◊ indica valores de RQ ≥ 2 o $\leq 0,5$. * indica valores de p-valor $< 0,05$; ** indica valores de p-valor $< 0,01$; *** indica valores de p-valor $< 0,001$.

Los resultados obtenidos confirmaron que al pretratar con TSA se aumentaba la expresión de *SOCS3*, y también la sensibilidad del cultivo a la radioterapia, y que al disminuir la expresión de dicho gen se disminuía a su vez la sensibilidad de la línea celular al tratamiento radioterápico, como ya se había demostrado anteriormente. Además, se comprobó que al impedir la subida de expresión de *SOCS3* con el ARNsi en las células pretratadas con TSA, éstas no mostraban una mayor sensibilidad a la radioterapia (Figura 4.36-A y 4.36-B). Por lo tanto, se pudo concluir que las concentraciones utilizadas de TSA no produjeron un efecto *per se* en el efecto de la radioterapia, si no que la sensibilización observada en el cultivo fue debida a la subida de la expresión de *SOCS3*. Este hecho confirmó que el TSA a concentraciones bajas puede utilizarse como un potenciador del efecto de la radioterapia, pero además puso de manifiesto que la resistencia a la radioterapia está estrechamente relacionada con los niveles de expresión de *SOCS3*, y por lo tanto con la ruta de transducción en la que participa.

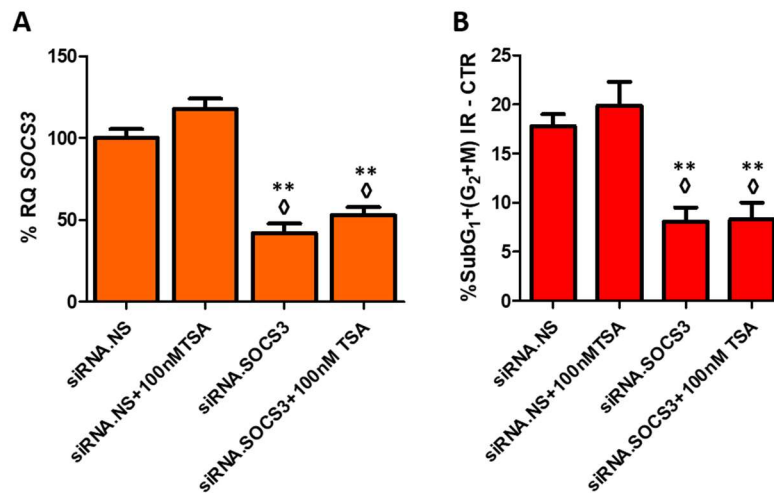


Figura 4.36: Modulación en la expresión de *SOCS3* causada por el pretratamiento con TSA y el ARNsi.*SOCS3* (A). Análisis del ciclo celular de las muestras de la línea celular HGUE GB 39 (B). Las barras naranjas del representan el porcentaje de los valores de RQ de *SOCS3*, las barras rojas indican el porcentaje de células en las fases SubG₁ y G₂/M del ciclo celular de las muestras transfectadas con el ARNsi.NS o con el ARNsi.*SOCS3* y/o pretratadas durante 16 h con TSA 100 nM. Los segmentos negros indican la desviación estándar (n ≥ 3). ◊ indica valores de RQ ≥ 2 o ≤ 0,5. ** indica valores de p-valor < 0,01.

Capítulo 5

Discusión



5.1 Establecimiento y caracterización de las líneas celulares obtenidas a partir de los cultivos primarios de GBM

El GBM es un tumor muy agresivo que presenta un desarrollo rápido y difícil de controlar [31]. Su letalidad se debe, principalmente, a la resistencia que presenta a los tratamientos convencionales, lo que conlleva que en muchas ocasiones el tratamiento aplicado fracase, y la esperanza de vida del paciente sea de unos pocos meses [183]. Este hecho hace que sea necesaria la búsqueda de nuevos modelos celulares que permitan conocer mejor este tipo de tumores. En especial, es relevante el estudio del grupo de los GBMs primarios o GBM IDH-nativos, puesto que son los que presentan un peor pronóstico clínico [56].

Con este propósito se han obtenido y comercializado numerosas líneas celulares que mimetizan el comportamiento de los GBMs, como son U87, LN229 y T98 (Colección Americana de Cultivos Tipo, o ATCC por sus siglas en inglés). Sin embargo, en numerosas ocasiones estas líneas celulares comerciales acumulan alteraciones en su material genético como consecuencia de su estado replicativo indefinido, y por ello se encuentran muy alejadas del estado nativo del tumor [184].

Las 6 nuevas líneas celulares de GBM establecidas en este trabajo reproducen fielmente el tumor desarrollado por el paciente, puesto que derivan directamente del mismo, no han sido sometidas a un gran número de ciclos de replicación y además, como se ha demostrado, siguen manteniendo su naturaleza glial. Otra ventaja de la utilización de estas nuevas líneas celulares es la posibilidad de recrear su progresión desde el cultivo primario, y estudiar así de forma retrospectiva su desarrollo, ya que de todas ellas se mantienen alícuotas, obtenidas en los diferentes países, de ADN, ARN y células criopreservadas.

Asimismo, los GBMs conforman un grupo de tumores muy heterogéneo con diferentes evoluciones clínicas y grados de respuesta frente a los tratamientos aplicados [58]. Por ello, la OMS en su última clasificación de los tumores del SNC ha dividido los GBMs en dos grupos claramente diferenciados en base a la presencia o ausencia de mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*. De esta forma, se establece el grupo de GBMs IDH-nativos, que se corresponde con los GBMs primarios, y el grupo de GBMs IDH-mutados, en el

Discusión

cual se engloban los GBMs secundarios [56]. Las líneas celulares de GBM establecidas en este trabajo no presentaron mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, y por lo tanto se clasificaron como GBMs IDH-nativos. La OMS en esta última clasificación también ha descrito marcadores moleculares adicionales que completan la caracterización de los GBMs. Dichos biomarcadores ayudan a establecer el pronóstico en estos pacientes, y son: a) mutaciones en el promotor del gen *TERT*, b) alteraciones en el gen *TP53* y c) pérdida de expresión del gen *PTEN* (**Tabla 1.1**). El estudio de estos rasgos moleculares en las líneas de GBM establecidas mostró que todas ellas presentaban mutaciones puntuales en el promotor de *TERT*, como se ha demostrado en el 72% de los GBMs IDH-nativos. También, portaban alteraciones en el gen *TP53*, como ocurre en un 27% de los GBMs primarios. Además, todas ellas mantuvieron la expresión del gen *PTEN* a nivel de proteína, que se conserva en un 76% de este tipo de GBMs [56]. Se ha demostrado que la presencia de mutaciones en el promotor del gen *TERT* y en el gen *TP53* están relacionadas con una peor respuesta a los tratamientos de quimio y radioterapia tanto en GBM como en otros tipos de cánceres [79,90,185–188]. Los resultados obtenidos en el análisis de las mutaciones del promotor del gen *TERT* y de las alteraciones de expresión a nivel de proteína del gen *TP53* corroboraron el mal pronóstico que se le atribuye a los GBM IDH-nativos, y reforzaron la clasificación de las nuevas líneas celulares de GBM establecidas dentro de este grupo de tumores. La implicación de la pérdida de expresión de la proteína PTEN en el pronóstico de los pacientes con cáncer genera cierta controversia, ya que en cánceres como el de endometrio se asocia con una mayor supervivencia [189], y con un peor pronóstico en cáncer de mama y lengua entre otros [93,190]. En GBM se ha postulado que las alteraciones en este gen ocurren en las fases tardías del proceso tumoral e implican una reducción en la esperanza de vida del paciente [191,192]. Contradictoriamente, también se ha descrito la ausencia de correlación entre la pérdida de expresión de PTEN y el pronóstico en pacientes con GBM [193,194]. Como ya se ha indicado, en las líneas de GBM establecidas en este trabajo no se detectó la pérdida de expresión de la proteína PTEN. Sin embargo, dos de las líneas celulares más sensibles a los tratamientos quimio y radioterápicos mostraron una mayor intensidad en la tinción inmunocitoquímica para dicha proteína, sugiriendo que ambas líneas poseen una mayor expresión de PTEN, lo que les conferiría una mejor respuesta al tratamiento y con ello un mejor pronóstico.

5.2 Respuesta de las líneas celulares de GBM establecidas a la quimioterapia y su relación con la metilación y expresión del gen *MGMT*

Numerosos estudios establecen una clara relación entre la resistencia a la TMZ, fármaco quimioterapéutico de primera línea, y la expresión del gen *MGMT*. Así como, una correlación entre el estado de metilación del promotor de dicho gen y el buen pronóstico en este tipo de tumores [115,195,196]. En este trabajo, las líneas celulares de GBM fueron tratadas con BCNU, un fármaco quimioterapéutico de segunda línea que al igual que la TMZ es un agente alquilante [84]. La razón de utilizar esta molécula fue comprobar si el mecanismo establecido de resistencia a la TMZ era válido para otro tipo de compuestos alquilantes también pautados en el tratamiento quimioterapéutico. Además, de forma preliminar se realizaron ensayos con TMZ, soluble en DMSO. Su baja solubilidad implica el uso de volúmenes muy altos de DMSO para conseguir concentraciones de TMZ que desencadenen un efecto fisiológico. Este hecho, conlleva un enmascaramiento del efecto propio del fármaco por la acción del DMSO, ya que se ha demostrado que este compuesto usado a altas concentraciones produce alteraciones en el ciclo celular [197–199].

El tratamiento con BCNU 50 μ M aplicado a las líneas celulares de GBM, en ningún caso consiguió superar el 50% de muerte celular en las células tratadas, poniendo de manifiesto un cierto grado de resistencia a la quimioterapia en estas líneas celulares, y reforzando así su clasificación como GBMs IDH-nativos. La línea celular más quimiorresistente fue HGUE GB 16, resultando afectadas únicamente el 12,6% \pm 2,3 de sus células. Los estudios epigenéticos determinaron que dicha línea celular era la única que no presentaba metilado el promotor del *MGMT*. Además, los análisis de expresión establecieron que sólo esta línea mantenía la expresión de este gen, incluso con valores de expresión superiores a los del *pool* de ARN de cerebro sano (RQ=2,7 \pm 0,15). Estos datos permitieron establecer una clara relación entre la ausencia de metilación del promotor del gen *MGMT* y su expresión, con la resistencia al BCNU, validando el mecanismo de resistencia a la TMZ en otro tipo de fármaco quimioterapéutico. El resto de las líneas celulares de GBM presentó metilado el promotor de *MGMT*, y su expresión

Discusión

a nivel de ARNm fue indetectable mediante qRT-PCR. Esto confirmó la correlación que se había postulado entre la metilación y la expresión de este gen en cánceres como el linfoma del SNC [200]. Sin embargo, la baja respuesta al tratamiento obtenida por las demás líneas celulares sugiere que la resistencia a los agentes alquilantes debe estar regulada por otros mecanismos celulares. En esta línea, se ha demostrado que existen células madre tumorales capaces de resistir el efecto de la quimioterapia y reemplazar las células muertas, aumentando así la resistencia del tumor al tratamiento aplicado [201,202]. También, se ha puesto de manifiesto la relación entre la sobreexpresión del gen *BCL3* (Célula B linfoma 3), considerado un proto-oncogén, y la resistencia a la quimioterapia [203–205], lo cual explicaría la teoría expuesta anteriormente sobre la implicación de otros mecanismos celulares en la respuesta a la quimioterapia, diferentes al mediado por la expresión de la proteína MGMT.

5.3 Genes *SOCS1* y *SOCS3* y radioterapia

5.3.1 Evaluación de la respuesta a la radioterapia en las líneas celulares de GBM establecidas

En muchas ocasiones, las sesiones de radioterapia pautadas clínicamente para el tratamiento del GBM no consiguen eliminarlo de forma completa, debido a la radiorresistencia existente en estos tumores [112]. En este sentido, el tratamiento radioterápico aplicado a las líneas celulares de GBM tampoco logró eliminar la totalidad de las células tumorales, alcanzando como máximo una muerte celular del 60% con la dosis de 10 Gy, a las 72 h de haber sido expuestas a la radiación. Este dato vuelve a reforzar la clasificación de las líneas celulares establecidas como parte del grupo de GBMs más agresivos.

Los estudios de viabilidad junto con los de ciclo celular mostraron que a las 24 h post-irradiación todavía no se había producido la muerte celular detectada a las 72 h, ya que sólo se observaron cambios mínimos en la fase SubG₁, asociada con muerte celular. En cambio, el resto de las fases del ciclo celular sí sufrieron modificaciones importantes, reduciéndose las fases G₁ y S, y aumentando la fase G₂/M. Este efecto de la radioterapia sobre el ciclo celular ya se había demostrado en líneas celulares de cáncer nasofaríngeo, colorrectal y de próstata, y a la vez la acumulación de células en las fases SubG₁ y G₂M

se había establecido como medida de cuantificación de la respuesta a la radioterapia [206,207]. De acuerdo con este parámetro, todas las líneas celulares de GBM establecidas presentaron un cierto grado de resistencia a la radioterapia, puesto que la acumulación de células en la fase SubG₁ y G₂/M nunca alcanzó el 50% a las 24 h del tratamiento. En este caso, la línea celular HGUE GB 39 fue la más radiorresistente, seguida de las líneas HGUE GB 40 y HGUE 48 que presentaron una resistencia intermedia, y por último las líneas celulares HGUE GB 16, HGUE GB 37 y HGUE GB 42 que se establecieron como las más radiosensibles.

5.3.2 Correlación entre la metilación y expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* y la radiorresistencia en las líneas celulares de GBM

Una vez establecido el grado de respuesta a la radioterapia en las líneas celulares de GBM, se estudió el grado de metilación de los promotores de los genes *SOCS1* y *SOCS3*, y su expresión a nivel de ARNm y proteína, puesto que ambos genes se han relacionado directamente con la carcinogénesis [147].

El estudio de la metilación del promotor del gen *SOCS1* se llevó a cabo utilizando dos técnicas distintas: MS-MLPA, en el que se estudian 4 islas CpG mediante un kit comercial diseñado para analizar la metilación de *SOCS1*, y MS-PCR. El resultado del MS-MLPA indicó que únicamente la línea celular HGUE GB 42 tenía parcialmente metilado el gen *SOCS1*, y el resto no presentaban metilado dicho gen. Los resultados obtenidos mediante la técnica de MS-PCR variaron en función de los cebadores utilizados, debido a que cada par de cebadores se diseñó para que analizaran específicamente una única isla CpG, distinta para cada uno de ellos. Los cebadores diseñados por Kim y colaboradores en el año 2015 [174] mostraron que las líneas celulares HGUE GB 16, HGUE GB 37, HGUE GB 40 y HGUE GB 42 poseían la isla CpG interrogada hemimetilada, no mostrando esta hemimetilación las líneas HGUE GB 39 y HGUEGB 48. En cambio, los cebadores diseñados en este trabajo, que analizaban una de las islas CpG aguas arriba del codón de iniciación, no mostraron signos de metilación en ninguna de las líneas de GBM establecidas. Los resultados globales de metilación obtenidos mediante MS-MLPA se ajustaron más a los obtenidos al realizar la técnica de MS-PCR con los cebadores diseñados por nuestro equipo, puesto que únicamente difieren en la metilación parcial

Discusión

detectada en la línea celular HGUE GB 42, coincidiendo la ausencia de metilación en el resto de las líneas de GBM establecidas. Sin embargo, la técnica de MS-MLPA también permite realizar un análisis de cada una de las 4 islas CpG por separado, y en este caso se comprueba que los resultados obtenidos utilizando ambas son similares. En el caso de los cebadores diseñados para este trabajo, la isla CpG interrogada se correspondió con la sonda 4 del kit comercial, y no apareció metilada en ninguna de las líneas de GBM aplicando cualquiera de las dos técnicas. La diferencia obtenida en las metilaciones parciales con cada una de las técnicas puede deberse a que la región analizada no es exactamente la misma, aunque en ambos casos se encuentra dentro de la ORF (**Figura 3.13**). Las metilaciones parciales se localizaron fuera de la región promotora, y únicamente se detectaron en las líneas más sensibles a la radioterapia. Esto sugeriría que es la metilación del promotor de este gen, y no su expresión, lo que podría estar implicado en la respuesta del GBM a la radioterapia, como ya se ha señalado en estudios previos de nuestro grupo de investigación sobre tumores gliales [87].

Por otro lado, diversos estudios han postulado la metilación del gen *SOCS3* como un biomarcador de mal pronóstico en GBM [167] y en modelos celulares de cáncer de próstata [208]. En esta tesis, se llevó a cabo el análisis de la metilación del gen *SOCS3* mediante la técnica de MS-PCR, ya que no se disponía de kit comercial para estudiar su metilación por MS-MLPA. De nuevo, los resultados obtenidos dependieron de los cebadores utilizados. Los cebadores descritos por Kim y colaboradores [174] detectaron metilaciones parciales en la línea celular más radiorresistente (HGUE GB 39), en las dos con resistencia intermedia (HGUE GB 40 y HGUE GB 48), y en una de las más sensibles (HGUE GB 42). El estudio de metilación llevado a cabo con los cebadores de diseño propio no detectó metilación en ninguna de las líneas celulares establecidas. Así, con estos resultados no se pudo asociar la metilación de gen *SOCS3* con el pronóstico en GBM.

Respecto a la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* y su estado en los procesos tumorales, varios estudios previos han demostrado que se encuentra alterada en cáncer de mama, gástrico y colorrectal [153,155,209]. Las líneas celulares de GBM establecidas mostraron una mayor expresión tanto *SOCS1* como *SOCS3* a nivel de ARNm con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano, apuntando a una posible implicación de ambos genes

en la carcinogénesis y la progresión tumoral en GBM, como ya se había propuesto en la literatura previa [147,156]. No obstante, los niveles de expresión de *SOCS1* y *SOCS3* fueron similares en todas las líneas celulares de GBM establecidas, no permitiendo asociar su nivel de expresión con los distintos grados de radiorresistencia observados. Es posible que esta ausencia de correlación se deba a que las diferencias de radiorresistencia observadas entre las líneas celulares establecidas no fueron muy pronunciadas, lo que unido al restringido número de muestras hace difícil realizar este tipo de estudios.

Además, cabe señalar que la ausencia de metilación a nivel de promotor en los genes *SOCS1* y *SOCS3*, se correlacionó con la expresión a nivel de ARNm, y a su vez con la presencia de ambas proteínas en el citoplasma de las células de las líneas de GBM establecidas, sin observarse colocalización entre ellas. Hasta la fecha, no se han publicado estudios que determinen la distribución celular de estas proteínas, aunque su localización citoplasmática es acorde con la función que desempeñan, puesto que ambas se encargan de inhibir la ruta de transducción de señal JAK/STAT en el citoplasma [138].

5.3.3 Análisis de las alteraciones ejercidas por la exposición al tratamiento radioterápico en los genes *SOCS1* y *SOCS3*

Los cambios de expresión producidos como respuesta a la radioterapia se han utilizado en cáncer de mama y cervical para establecer patrones génicos que ayuden a pronosticar la respuesta al tratamiento en estos tumores [210–212]. Como se ha indicado anteriormente, la expresión basal a nivel de ARNm no se pudo asociar con la resistencia a la radioterapia en las líneas celulares establecidas. Por ello, se evaluó el efecto de la radioterapia sobre la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3*, con el fin de comprobar si sus expresiones a nivel de ARNm se alteraban como consecuencia de la exposición a la radiación.

Los niveles de expresión de ambos genes se mantuvieron constantes a las 24 h del tratamiento radioterápico en las 6 líneas de GBM establecidas. En un estudio similar realizado en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, se comprobó que el daño en el ADN causado por la radiación alcanzaba su máximo en la primera hora tras el

Discusión

tratamiento, y a partir de ahí empezaba a disminuir. Además, el daño en el ADN era mayor cuanto mayores dosis de radioterapia se habían aplicado [213]. Por lo tanto, la ausencia de alteraciones obtenida en las líneas celulares de GBM pudo deberse a que el tiempo utilizado fue demasiado largo, o a que se aplicaron dosis de radiación insuficientes para desencadenar cambios de expresión detectables.

Además, existen estudios de dosis-respuesta y ciclos temporales realizados en células de cáncer de próstata y colorrectal, que han permitido identificar diversos genes que modifican su expresión como resultado de la exposición a radiaciones ionizantes [214]. Todo ello, motivó la realización de este tipo de ensayos en dos de las líneas de GBM establecidas: HGUE GB 39 (radiatorresistente) y HGUE GB 42 (radiosensible). Los genes *SOCS1* y *SOCS3* no mostraron alteraciones en su expresión a los tiempos establecidos, en ninguna de las dos líneas celulares. En los estudios de dosis-respuesta, tanto los niveles de expresión a nivel de ARNm de *SOCS1* como los de *SOCS3* mostraron una tendencia a aumentar en la línea sensible a las dosis más altas, y a disminuir en la línea más resistente, llegando incluso esta disminución a ser significativa con la dosis de 10 Gy en el caso de *SOCS3*. Estas ligeras variaciones en la expresión de ambos genes podrían indicar que su expresión está ligada a la respuesta a la radioterapia como ya se había postulado en estudios anteriores realizados en GBM y en cáncer cervical [154,174].

Con el fin de corroborar la implicación de estos dos genes en la resistencia a la radioterapia, se obtuvieron poblaciones clonales radiatorresistentes surgidas a partir de la exposición sistemática de las líneas celulares HGUE GB 39 y HGUE GB 42 a sesiones de irradiación, y se valoraron los niveles de expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* en dichas subpoblaciones tras haber adquirido su carácter radiatorresistente. La expresión del gen *SOCS1* a nivel de ARNm mantuvo valores similares tanto en las líneas celulares de origen como en los clones obtenidos a partir de ellas. Por el contrario, la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm disminuyó significativamente en las subpoblaciones clonales con respecto a las líneas celulares de partida; tanto en las obtenidas a partir de la línea celular HGUE GB 39, como en los clones procedentes de la línea celular HGUE GB 42. Este ensayo puso de manifiesto que la radiatorresistencia adquirida por los clones estaba ligada a una disminución de la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm, indicando de nuevo la posible relación de *SOCS3* con la radiatorresistencia, y relegando a

un segundo plano la implicación de la expresión de *SOCS1* en la respuesta a la radioterapia. Sin embargo, tanto la radiorresistencia adquirida por las sucesivas sesiones de radioterapia, como la disminución en la expresión del gen *SOCS3* a nivel de ARNm no se mantuvieron estables tras dejar de someter a las poblaciones clonales a las dosis periódicas de irradiación. Los clones recuperaron los valores de radiorresistencia y de expresión de *SOCS3* mostrados por las líneas celulares de origen, aportando una evidencia más de la relación del gen *SOCS3* con la adquisición de la radiorresistencia.

5.3.4 Adquisición de radiorresistencia mediada por los genes *SOCS1* y *SOCS3* en las líneas celulares de GBM

La mayoría de los estudios realizados sobre el papel que desarrollan los genes *SOCS1* y *SOCS3* en la carcinogénesis postulan que la baja expresión de ambos genes promueve la quimio y radiorresistencia, así como la progresión tumoral [155,157,166,208]. Este papel está estrechamente relacionado con la función reguladora que ejercen estos genes sobre la ruta JAK/STAT [133,152,157].

La disminución en la expresión a nivel de ARNm de *SOCS1* inducida mediante ARNsi no tuvo efecto sobre la radiorresistencia en las líneas celulares de GBM establecidas. Este resultado indicaría que la disminución de la expresión de este gen no conlleva la adquisición de radiorresistencia en estas líneas celulares, lo que contradice lo propuesto en un estudio anterior realizado en GBM [154]. En este caso el estudio se realizó sólo en una línea celular de GBM (U87), y la proteína *SOCS1* fue expresada de forma ectópica. Además, en este caso no se evaluó el aumento en la expresión del gen *SOCS1* mediante qRT-PCR, sino que detectaron la presencia de la proteína *SOCS1* mediante *Western blotting*.

Por otro lado, todas las líneas celulares de GBM establecidas aumentaron su radiorresistencia al interferir la expresión a nivel de ARNm del gen *SOCS3*, volviendo a poner de manifiesto el papel de *SOCS3* en la radiorresistencia. Estos resultados apoyan estudios previos en los que se establece la metilación del promotor del gen *SOCS3* o su expresión como un marcador de mal pronóstico en GBM y en otros cánceres con el gástrico y el colorrectal [155,161,163,167]. La adquisición de esta radiorresistencia mediada por la inhibición de la expresión de *SOCS3*, podría establecerse por el

Discusión

incremento en la activación de la ruta JAK/STAT que supone la ausencia de esta proteína, ya que la hiperactivación de esta ruta se ha postulado como un rasgo característico de la agresividad tumoral [133]. La sobreexpresión de *SOCS3* bajo un promotor heterólogo (pCMVh), confirmó la implicación de este gen en la adquisición de radiorresistencia en GBM, puesto que el aumento de expresión de este gen conllevó la radiosensibilización de la línea celular.

Por último, en el estudio realizado por Zhou y colaboradores en el año 2007 [154] se señalaba que la represión de la expresión de *SOCS1* mediante la metilación de su promotor podía estar ligada a la expresión constitutiva de *SOCS3*, lo que sugería la existencia de una regulación recíproca entre la expresión de ambos genes. Los resultados obtenidos a través de los experimentos con ARNsi no pusieron de manifiesto esta co-regulación, puesto que la expresión de *SOCS3* no varió al interferir *SOCS1* y viceversa. De nuevo esta diferencia entre sus resultados y los presentados en esta tesis puede deberse a que estos estudios se realizaron sobre líneas celulares de GBM que poseían el promotor de *SOCS1* metilado, hecho que no ocurrió en las líneas celulares de GBM estudiadas. Además, en el estudio de Zhou y colaboradores no se moduló directamente la expresión de ambos genes. La expresión exógena de *SOCS1* se llevó a cabo mediante una infección retroviral con un vector sintético que contenía la ORF de *SOCS1*. En el caso de la represión de la expresión de la proteína *SOCS3*, se consiguió de forma indirecta, transfectando la línea celular con un vector que codificaba un inhibidor del factor de transcripción STAT3.

5.4 Relación de otros genes con *SOCS3* y con la respuesta a la radioterapia

Los resultados obtenidos que asociaban directamente la expresión del gen *SOCS3* con la adquisición de radiorresistencia en las líneas celulares de GBM establecidas, fueron el punto de partida para analizar su relación con otros genes que podían estar relacionados con *SOCS3* o con la respuesta al tratamiento. Se seleccionaron los genes *PTK6*, *MSK1* y *NRF2*. La elección del gen *PTK6* fue motivada por dos razones: una de ellas fue la existencia de literatura que lo relacionaba directamente con *SOCS3* como un componente esencial de su ruta de autorregulación negativa [215,216]; y la otra, se basó

en resultados anteriores que se habían obtenido en nuestro equipo de investigación, y que asociaban la inhibición de esta proteína con la sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos en carcinoma de páncreas [168]. El análisis de *MSK1* se llevó a cabo por su implicación indirecta en la ruta JAK/STAT, cuya activación es inhibida por *SOCS3* [140], y por los datos obtenidos en nuestro equipo de investigación que relacionaban este gen con la potenciación del efecto de la quimioterapia mediada por TSA en líneas celulares de cáncer de páncreas. El gen *NRF2* se eligió por su implicación en la respuesta a estrés y a daño oxidativo [217], ya que como resultado del tratamiento radioterápico el cultivo celular es sometido a una situación de estrés, en la que se ve aumentada la producción de EOR [218].

5.4.1 Expresión e interferencia del gen *PTK6* a nivel de ARNm en GBM

La función oncogénica de la proteína PTK6 se ha estudiado fundamentalmente en cáncer de mama, donde ha quedado demostrado que el gen *PTK6* se encuentra sobreexpresado con respecto al epitelio sano [170]. Además, sus altos niveles transcripcionales se han relacionado con un peor pronóstico y un aumento de la invasividad tumoral [219,220]. Asimismo, la expresión de este gen se ha asociado a mal pronóstico en cánceres como el de vejiga, páncreas y próstata [221–223]. En relación con la expresión de esta proteína en los tumores del SNC, no existen estudios que aporten datos sobre su función en este tipo de tumores, y tampoco hay información de su papel en GBM. Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que el gen *PTK6* se encuentra sobreexpresado en las líneas celulares de GBM con respecto al *pool* de ARN de tejido sano, coincidiendo con los estudios publicados en cáncer de mama [170]. En nuestro caso no se pudo asociar su expresión con una mayor radiorresistencia, porque todas las líneas celulares presentaron niveles de expresión de *PTK6* similares. No obstante, las líneas celulares establecidas forman parte del grupo más agresivo de GBM, y es posible que, si se realizase esta comparación con GBMs secundarios, o con gliomas de mejor pronóstico, se pudiese establecer una relación entre la expresión de *PTK6* a nivel de ARNm y la agresividad tumoral. Por otro lado, los estudios previos de silenciamiento de este gen realizados en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo han conseguido inhibir de forma significativa el crecimiento tumoral, inducir apoptosis, y suprimir la metástasis; mientras que los estudios en los que se ha inducido la expresión

Discusión

de *PTK6* han resultado en un aumento de la proliferación celular [224–226]. En contraste con estos datos, las líneas celulares de GBM establecidas aumentaron su radiorresistencia al reducir la expresión de *PTK6*, indicando que es posible que este gen este desarrollando una función distinta en GBM. En línea con estos datos, un reciente estudio desarrollado en líneas celulares de cáncer de colon, ha demostrado que el papel desempeñado por *PTK6* en el crecimiento y la invasión tumoral puede no estar directamente relacionado con su actividad quinasa como se había postulado, sino que puede estar asociado a nueva función en la que podría estar actuando como andamio para otras proteínas asociadas con la tumorigénesis [227].

5.4.2 Expresión e interferencia del gen *NRF2* a nivel de ARNm en GBM

El gen *NRF2* se ha encontrado sobreexpresado en cáncer de pulmón, cabeza y cuello, mama y piel [119,120,228,229]. En cambio, el estudio de la expresión basal de este gen realizado en las líneas celulares de GBM establecidas no mostró esta sobreexpresión, sino que sus valores de expresión fueron similares a los del *pool* de ARN de cerebro sano. Además, en todos los estudios publicados, tanto en gliomas como en otro tipo de cánceres, describen que la inhibición de *NRF2* aumenta el efecto de la radio y la quimioterapia en las células tumorales, y que su activación protege frente a estos tratamientos, confiriendo a los tumores una mayor resistencia [230–234]. Sin embargo, en los estudios de interferencia realizados en las líneas celulares de GBM se observó un aumento de la radiorresistencia al disminuir la expresión de *NRF2*. Este dato, aunque contradice lo expuesto anteriormente en la literatura, podría deberse al efecto pro-oncogénico que genera la acumulación de ROS en el ambiente tumoral [235]. Al inhibir la expresión de *NRF2*, las ROS producidas por la irradiación no se neutralizarían a través del sistema de protección desencadenado por *NRF2*, y se acumularían de forma anormal en las células tumorales. En este sentido, los niveles altos de ROS en células tumorales se han relacionado con la activación de diversas rutas de transducción de señales que promueven la angiogénesis, el crecimiento, la progresión y la supervivencia tumoral [236] (**Figura 5.1**). Por otro lado, y apoyando esta hipótesis, en cáncer colorrectal se ha demostrado que las ROS son capaces de interferir en la regulación de la ruta JAK/STAT fosforilando al factor de transcripción STAT3 [237], lo que conlleva una

hiperactivación de esta ruta, que como se ha indicado anteriormente es un rasgo característico de malignidad tumoral.

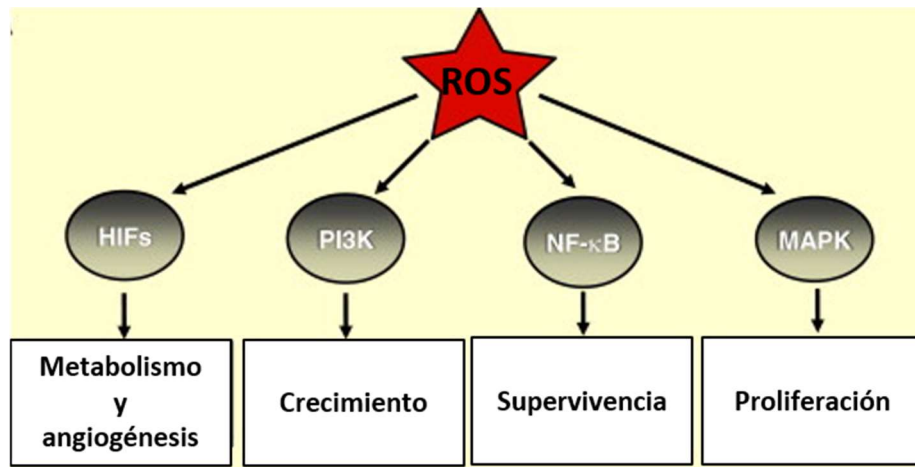


Figura 5.1: Interacciones de las EOR con las distintas vías de transducción de señal a través de las cuales promueven la tumorigénesis. Se detallan los procesos que se encuentran regulados por las EOR en las células tumorales [236].

5.4.3 Expresión e interferencia del gen *MSK1* a nivel de ARNm en GBM

La proteína MSK1 se activa como consecuencia de la acción de las proteínas, ERK1, ERK2 y p38, pertenecientes a la ruta de transducción de señales de las MAP quinasas. Esta activación conlleva la fosforilación de la histona 3, y del factor de transcripción CREB, que a su vez inician la transcripción de una serie de genes involucrados en la respuesta a mitógenos y estrés [238]. Recientemente, se ha postulado que MSK1 puede estar involucrada en la respuesta inmune, ya que se ha comprobado que es capaz de modular la expresión de diferentes citoquinas [239].

En las líneas celulares de GBM establecidas y caracterizadas en esta tesis, el gen *MSK1* se ha encontrado infraexpresado con respecto con el *pool* de ARN de cerebro normal. No existen estudios sobre los niveles de expresión del gen *MSK1* en GBM, y su papel en otros cánceres genera cierta controversia, ya que su sobreexpresión se ha relacionado tanto con un buen pronóstico en cáncer de mama [240], como con menores tasas de supervivencia en cáncer colorrectal [241]. Los valores de expresión de *MSK1* a nivel de ARNm fueron homogéneos en las 6 líneas de GBM establecidas, por lo que no se pudo correlacionar el grado de radiorresistencia de cada una de ellas con los niveles de expresión de dicho gen. Sin embargo, al disminuir la expresión de este gen mediante

Discusión

ARNsi, todas las líneas celulares de GBM aumentaron su radiorresistencia, sugiriendo un posible papel de *MSK1* en la resistencia a la radioterapia. Este dato apoya los estudios realizados en cáncer de mama que relacionan los niveles bajos de expresión de este gen con un peor pronóstico y con el desarrollo de metástasis [240,242].

5.4.4 Relaciones entre los genes *SOCS3*, *PTK6*, *MSK1* y *NRF2*

De forma general, la alteración dirigida de la expresión de un gen no solo produce cambios en el comportamiento de dicho gen, sino que afecta a la expresión de los genes que están relacionados con él, o con las rutas metabólicas en las que está involucrado [243,244]. Por ello, y al haber realizado ensayos de interferencia con diversos genes, que a su vez se habían relacionado con la resistencia a la radioterapia, se evaluó si la disminución de la expresión de alguno de ellos provocaba cambios en la expresión de los demás genes.

La disminución de la expresión de *SOCS3* a nivel de ARNm implicó un aumento significativo a nivel de ARNm del gen *PTK6*, resultado que era esperable puesto que *SOCS3* actúa como inhibidor de *PTK6* [169]. Con este ensayo se confirmó la relación existente entre la expresión de ambos genes en las líneas celulares de GBM. Además, la interferencia del gen *SOCS3* disminuyó significativamente la expresión a nivel de ARNm del gen *MSK1*, sugiriendo que la expresión de ambos está relacionada. No existen estudios que describan esta interacción, aunque sí se ha demostrado que la proteína *MSK1* interfiere en la regulación de la vía *JAK/STAT*, a la que pertenece la proteína *SOCS3*, fosforilando al factor de transcripción *STAT3* [141]. La regulación entre la expresión de *SOCS3* y de *MSK1* podría llevarse a cabo mediante esta relación. La interferencia del gen *PTK6*, no mostró efecto sobre los niveles de expresión del resto de genes estudiados.

Finalmente, al disminuir la expresión de *NRF2* mediante ARNsi los valores de expresión de los genes *PTK6* y *SOCS3* no se vieron afectados. En cambio, la expresión de *MSK1* disminuyó de forma significativa. Hay estudios que demuestran que *NRF2* es capaz de fosforilar y activar a la proteína *MSK1* [245], por lo que es posible que la disminución en los niveles de expresión *NRF2* pueda implicar también una reducción de la expresión de *MSK1* a nivel de ARNm, aunque no existen estudios que apoyen dicha hipótesis. En

cambio, el hecho de que la expresión de *MSK1* se reduzca al disminuir la expresión de *NRF2*, puede contribuir a explicar la radiorresistencia observada en los estudios de interferencia de *NRF2*, ya que en el apartado anterior se ha demostrado que la disminución de *MSK1* aumenta la resistencia a la radioterapia en las líneas celulares de GBM.

Estos resultados apuntan a una posible regulación del gen *MSK1* a través de la expresión de los genes *SOCS3* y *NRF2*, y a su vez a la existencia de un mecanismo de radiorresistencia en GBM mediado por la bajada de *MSK1* mediante la relación con dichos genes, ya que al disminuir cualquiera de los 3, todas las líneas de GBM aumentaron su radiorresistencia. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios para demostrar estas interacciones a nivel de proteína, y a su vez identificar otros genes que también formen parte de este posible mecanismo.

5.5 Potenciación de la radioterapia mediante el TSA

Los dos principales mecanismos epigenéticos a través de los cuales se regula la expresión génica son la modificación covalente de las bases del ADN mediante la metilación, y la acetilación de las histonas [246]. Este último mecanismo está controlado por dos grupos de proteínas: las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs), y su desregulación se ha asociado con la carcinogénesis [247]. Por esta razón, el uso de un iHDAC como el TSA, se ha propuesto como una posible terapia en el tratamiento del cáncer.

El pretratamiento con TSA de la línea celular de GBM con mayor radiorresistencia conllevó un aumento en su radiosensibilidad, siendo éste directamente proporcional a la dosis utilizada. El empleo de los iHDACs como potenciadores de la quimioterapia en GBM ya ha sido descrito en varios estudios [248,249], por lo que este dato complementa estos trabajos demostrando que el uso del TSA también consigue potenciar el efecto del tratamiento radioterápico.

Por otro lado, el análisis de metilación del promotor del gen *SOCS3* realizado en este trabajo reveló que las líneas celulares de GBM establecidas no poseían metilado el promotor de dicho gen, indicando que la metilación no forma parte de la regulación epigenética de su expresión. Como ya se ha indicado anteriormente, otro de los

Discusión

principales mecanismos epigenéticos a través de los cuales se regula la expresión génica es la acetilación de histonas. Por ello se evaluó también, el efecto del TSA sobre la expresión de *SOCS3*, y se comprobó que dicho compuesto aumentaba la expresión de *SOCS3* a nivel ARNm de forma directamente proporcional a la dosis suministrada. Esto indicó que la expresión de *SOCS3* puede estar regulada por la acetilación de histonas en las líneas celulares de GBM, como se ha demostrado que ocurre en líneas celulares de cáncer de cérvix [174].

Estos resultados sin embargo, no relacionaban inequívocamente la radiosensibilización de la línea celular con el aumento de expresión de *SOCS3*, puesto que la potenciación de la radioterapia podría estar causada por el efecto intrínseco del TSA. Por ello, se llevó a cabo un ensayo en el que se realizó un tratamiento con TSA en la línea celular más radorresistente (HGUE GB 39), y a la vez una inhibición de la expresión de *SOCS3* con ARNsi. Los datos obtenidos confirmaron que el aumento de la sensibilidad a la radioterapia observado en la línea HGUE GB 39 se debía directamente al incremento endógeno de la expresión de *SOCS3* causado por TSA, puesto que al inhibir la subida de *SOCS3*, aun estando presente el TSA, no se produjo la potenciación del efecto de la radioterapia.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el TSA aumenta la expresión de *MSK1* a nivel de ARNm, y la sensibilidad a la quimioterapia en líneas celulares de cáncer de colon y páncreas. El aumento en la expresión de *MSK1* podría ser una consecuencia del aumento en la expresión de *SOCS3* provocada por TSA, ya que como se ha demostrado en este trabajo la disminución de la expresión de *SOCS3* induce una disminución en la expresión de *MSK1*, y este hecho podría ocurrir también de forma inversa. Ello aportaría una nueva evidencia de la relación que se postula entre *SOCS3*, *MSK1* y la adquisición de radorresistencia.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo relacionan directamente la expresión de *SOCS3* con la radorresistencia en las líneas celulares de GBM establecidas, y lo proponen, junto a la ruta de traducción de señales en la que participa, como una nueva diana terapéutica frente a la resistencia a la radioterapia en GBM. Además, permiten postular la existencia de un mecanismo de adquisición de radorresistencia mediado por *MSK1*, que involucraría también a los genes *SOCS3* y *NRF2*.

5.6 Proyecciones futuras

La presente tesis doctoral ha puesto de manifiesto el importante papel que desempeña el gen *SOCS3* en la adquisición de radiorresistencia en GBM. Por ello, el próximo objetivo de nuestro equipo de investigación, en el que ya estamos trabajando, es la construcción de un modelo de radiorresistencia generado a través de la supresión estable de la expresión de *SOCS3* en una de las líneas celulares establecidas en este trabajo, mediante la técnica de edición genómica CRISPR-Cas. Este modelo permitirá profundizar en el estudio de la radiorresistencia producida por *SOCS3*, y de los efectos que conlleva su silenciamiento sobre las diferentes vías de transducción señal alteradas en cáncer. Además, se podrá utilizar para ensayar compuestos dirigidos a revertir su resistencia a la radioterapia, y a identificar posibles genes que puedan ser empleados como dianas terapéuticas o marcadores de radiorresistencia.

Por otra parte, y con el fin de esclarecer la utilidad de *SOCS1* y *SOCS3* como biomarcadores, sería interesante llevar a cabo un estudio de los niveles de expresión de ambos en una cohorte bien caracterizada de pacientes con GBM IDH-mutado e IDH-nativo, así como con gliomas de menor grado. Es importante incluir todos los tipos de gliomas ya que pueden encontrarse diferencias entre los distintos grados tumorales, que pongan de manifiesto el posible uso de algunos de estos genes como biomarcadores de pronóstico o diagnóstico.

En este trabajo, también se relaciona la expresión de los genes *PTK6*, *MSK1* y *NRF2* con la resistencia a la radioterapia. Aun así, es necesario seguir estudiando su implicación en la respuesta a la radioterapia mediante estudios de sobreexpresión génica, y análisis dosis-respuesta con el objeto de clarificar cuál es exactamente el rol que desempeñan en la radiorresistencia en GBM. Así mismo, es necesario profundizar en las relaciones encontradas entre la expresión de *SOCS3* y *NRF2* con *MSK1*, que deben ser demostradas a nivel de proteína, y comprobadas en otro tipo de líneas celulares y en tumores primarios. Además, también sería relevante determinar por qué ocurren y en qué situaciones tienen lugar, puesto que su estudio podría revelar nuevas funciones aún no descritas y que podrían estar relacionadas con la resistencia al tratamiento en GBM, o con la agresividad presentada por este tipo de tumores.

Discusión

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han contribuido a aumentar el conocimiento sobre el mecanismo mediante el cual los GBMs son capaces de adquirir resistencia a la radioterapia, y a la vez han abierto nuevas líneas de investigación, las cuales contribuirán a seguir investigando este mecanismo. Trabajando así en el objetivo de implementar nuevas terapias que ayuden a mejorar el tratamiento de este tipo de tumores tan agresivos, y con ello conseguir aumentar la esperanza y calidad de vida de los pacientes.



Capítulo 6

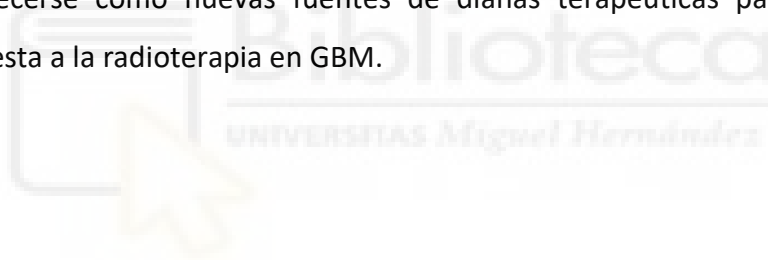
Conclusiones



1. Las 6 líneas celulares de GBM obtenidas en este trabajo representan un modelo adecuado para estudiar la resistencia a los tratamientos desarrollada por los GBM IDH-nativos o primarios, ya que conservan tanto su naturaleza glial como sus rasgos genéticos, y aportan la posibilidad del estudio retrospectivo de cualquier característica fisiológica o génica de interés. Las alteraciones observadas en la proteína p53 podrían considerarse un requisito inicial para el establecimiento de los cultivos primarios, puesto que estuvieron presentes en las 6 líneas estudiadas.
2. La ausencia de metilación en el promotor de *MGMT* se relaciona con la expresión de este gen a nivel de ARNm, y a su vez con la quimiorresistencia. El tratamiento quimioterapéutico produjo la muerte celular en todas las líneas de GBM establecidas siendo su efecto menor en la línea celular HGUE GB 16, la cual fue la única que mostró expresión de *MGMT*.
3. El tratamiento radioterápico disminuye de forma dosis-dependiente la viabilidad celular en todas las líneas de GBM establecidas a las 72 h post-irradiación. El efecto de la radioterapia a las 24 h tras el tratamiento es un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular.
4. Las líneas celulares de GBM no mostraron metilación en los promotores de los genes *SOCS1* y *SOCS3*. En cambio, se detectaron metilaciones parciales de regiones incluidas en la ORF de ambos genes. Todas las líneas celulares expresan los genes *SOCS1* y *SOCS3*, tanto a nivel ARNm como de proteína.
5. La radiorresistencia adquirida mediante presión selectiva por las poblaciones clonales conlleva una bajada en la expresión de *SOCS3* a nivel de ARNm, concomitante con el aumento de la resistencia a la radioterapia.
6. La radiorresistencia obtenida al inhibir la expresión de *SOCS3* mediante un ARNi específico, y la radiosensibilización mostrada por la línea celular HGUE GB 39 al sobreexpresar dicho gen bajo un promotor heterólogo, demuestran la implicación de *SOCS3* en la adquisición de radiorresistencia en las líneas celulares de GBM.

Conclusiones

7. El gen *PTK6* se encontró sobreexpresado en las líneas celulares de GBM con respecto al *pool* de ARN de cerebro sano, y su inhibición mediante un ARNsi específico indujo una mayor radiorresistencia. En las líneas celulares de GBM su expresión estuvo regulada por el gen *SOCS3*, señalando la posible implicación de *PTK6* en el mecanismo de adquisición de radiorresistencia mediado por *SOCS3*.
8. Los genes *NRF2* y *SOCS3* influyeron directamente sobre la expresión de *MSK1*, viéndose reducida ésta al interferir la expresión de ambos. La bajada de expresión a nivel de ARNm de cualquiera de los tres genes indujo radiorresistencia en las líneas celulares de GBM, sugiriendo la existencia de un nuevo mecanismo de radiorresistencia en GBM mediado por *MSK1* y bajo el control de los genes *NRF2* y *SOCS3*.
9. El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo demuestra que *SOCS3*, y la ruta de transducción de señal de JAK/STAT en la que participa, pueden establecerse como nuevas fuentes de dianas terapéuticas para mejorar la respuesta a la radioterapia en GBM.



Bibliografía



1. Instituto Nacional de Salud (Peru) O. Revista Peruana de medicina experimental y salud pública. [Internet]. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Instituto Nacional de Salud; 2002. Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100026
2. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014 [Internet]. ©International Agency for Research on Cancer World Health Organization. WHO Press; 2014. Available: [https://ebookshopdownloads.iarc.fr/ff5368d0be14d2758b1bd53c3ce15dc3c702e9f8e6c887c7bb56b232e016eb5f/World Cancer Report.pdf](https://ebookshopdownloads.iarc.fr/ff5368d0be14d2758b1bd53c3ce15dc3c702e9f8e6c887c7bb56b232e016eb5f/World%20Cancer%20Report.pdf)
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49: 1374–1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136: E359–E386. doi:10.1002/ijc.29210
5. M. Ervik, F. Lam, J. Ferlay, L. Mery, I. Soerjomataram FB. *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today*. Available from: <http://gco.iarc.fr/today> [Internet]. 2016.
6. REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer [Internet]. [cited 20 May 2018]. Available: <http://redecan.org/%0Aes/index.cfm>
7. Antoni S, Soerjomataram I, Møller B, Bray F, Ferlay J. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. *Bull World Health Organ*. 2016;94: 174–184. doi:10.2471/BLT.15.164384
8. Bray F, Ren J-S, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132: 1133–1145. doi:10.1002/ijc.27711
9. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388: 1659–1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. Elsevier; 2000;100: 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144: 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
12. Groten J, Borner C, Mertelsmann R. Understanding and Controlling Cancer: The Hallmark Concept Revisited – Chance, Evolution and Entropy. *J Sci Humanit Arts*. 2016; doi:10.17160/josha.3.7.252
13. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004;432: 332–337. doi:10.1038/nature03096

Bibliografía

14. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming Growth Factor- Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Mol Cancer Res.* 2008;6: 1521–1533. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2203
15. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.* Elsevier; 2000;102: 407–10. doi:10.1016/S0092-8674(00)00046-5
16. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008;8: 671–682. doi:10.1038/nrc2399
17. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* NIH Public Access; 2007;26: 1324–37. doi:10.1038/sj.onc.1210220
18. Juntila MR, Evan GI. p53 — a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer.* 2009;9: 821–829. doi:10.1038/nrc2728
19. Apel A, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer.* 2009;125: 991–995. doi:10.1002/ijc.24500
20. White E, DiPaola RS. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 5308–5316. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023
21. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 2010;140: 883–899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
22. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6: 611–622. doi:10.1038/nrg1656
23. Park J-I, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature.* 2009;460: 66–72. doi:10.1038/nature08137
24. Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, et al. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature.* 2009;461: 230–235. doi:10.1038/nature08283
25. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009;19: 329–337. doi:10.1016/j.semcancer.2009.05.003
26. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86: 353–64. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>
27. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* 2010;70: 5649–5669. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040
28. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW, et al. Cancer genome landscapes. *Science.* NIH Public Access; 2013;339: 1546–58. doi:10.1126/science.1235122
29. Contreras LE. EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES CEREBRALES. *Rev Médica Clínica Las Condes.* Elsevier; 2017;28: 332–338. doi:10.1016/j.rmcl.2017.05.001
30. Stelzer KJ. Epidemiology and prognosis of brain metastases. *Surg Neurol Int.*

- Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2013;4: S192-202. doi:10.4103/2152-7806.111296
31. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol.* 2016;18: v1–v75. doi:10.1093/neuonc/nov207
 32. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 1993;3: 255–68. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8293185>
 33. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised. Fourth Edition [Internet]. 4th ed. IARC; 2000. Available: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codch=24001>
 34. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007;114: 97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
 35. Braganza MZ, Kitahara CM, Berrington de Gonzalez A, Inskip PD, Johnson KJ, Rajaraman P. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol.* 2012;14: 1316–1324. doi:10.1093/neuonc/nos208
 36. Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, et al. New Primary Neoplasms of the Central Nervous System in Survivors of Childhood Cancer: a Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2006;98: 1528–1537. doi:10.1093/jnci/djj411
 37. Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, Stovall M, Modan B, Novikov I. Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res.* 2005;163: 424–32. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15799699>
 38. Yeh H, Matanoski GM, Wang Ny, Sandler DP, Comstock GW. Cancer incidence after childhood nasopharyngeal radium irradiation: a follow-up study in Washington County, Maryland. *Am J Epidemiol.* 2001;153: 749–56. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296146>
 39. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al. Preventable Exposures Associated With Human Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2011;103: 1827–1839. doi:10.1093/jnci/djr483
 40. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109: 93–108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y
 41. Hottinger AF, Khakoo Y. *Neurooncology of Familial Cancer Syndromes.* J Child Neurol. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2009;24: 1526–1535. doi:10.1177/0883073809337539
 42. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012;205:

Bibliografía

- 613–621. doi:10.1016/j.cancer.2012.10.009
43. Butowski NA. Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2015;21: 301–313. doi:10.1212/01.CON.0000464171.50638.f8
 44. Brenner A V., Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J Cancer.* 2002;99: 252–259. doi:10.1002/ijc.10320
 45. Schwartzbaum J, Jonsson F, Ahlbom A, Preston-Martin S, Lönn S, Söderberg KC, et al. Cohort studies of association between self-reported allergic conditions, immune-related diagnoses and glioma and meningioma risk. *Int J Cancer.* 2003;106: 423–428. doi:10.1002/ijc.11230
 46. Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Hepworth SJ, McKinney PA, van Tongeren M, Muir KR. History of allergies and risk of glioma in adults. *Int J Cancer.* 2006;119: 2165–2172. doi:10.1002/ijc.22091
 47. Wiemels JL, Wiencke JK, Sison JD, Miike R, McMillan A, Wrensch M. History of allergies among adults with glioma and controls. *Int J cancer.* 2002;98: 609–15. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920623>
 48. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol.* Oxford University Press; 2014;16: 896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087
 49. NBTS. National Brain Tumor Society [Internet]. 2008 [cited 3 Jun 2018]. Available: <http://www.braintumor.org/>
 50. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (80-).* 2014;344: 1396–1401. doi:10.1126/science.1254257
 51. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21: 2683–2710. doi:10.1101/gad.1596707
 52. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61: 215–25; discussion 226–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895036>
 53. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med.* 2004;82: 656–670. doi:10.1007/s00109-004-0564-x
 54. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19: 764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
 55. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* Elsevier; 2010;17: 98–110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
 56. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the

- Central Nervous System: a summary [Internet]. *Acta Neuropathol.* 2016. pp. 803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
57. McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, M. Mastrogiannakis G, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* Nature Publishing Group; 2008;455: 1061–1068. doi:10.1038/nature07385
 58. Watts C, Piccirillo SG. Clonal diversity in glioblastoma: is it clinically relevant? *Futur Oncol. Future Medicine Ltd London, UK ;* 2015;11: 1703–1706. doi:10.2217/fon.15.73
 59. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (80-).* 2008;321: 1807–1812. doi:10.1126/science.1164382
 60. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med. NIH Public Access;* 2009;360: 765–73. doi:10.1056/NEJMoa0808710
 61. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11: 85–95. doi:10.1038/nrc2981
 62. M. Gagné L, Boulay K, Topisirovic I, Huot M-É, Mallette FA. Oncogenic Activities of IDH1/2 Mutations: From Epigenetics to Cellular Signaling. *Trends Cell Biol.* 2017;27: 738–752. doi:10.1016/j.tcb.2017.06.002
 63. Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden CJF. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2018;37: 1949–1960. doi:10.1038/s41388-017-0077-z
 64. Yang H, Ye D, Guan K-L, Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res. American Association for Cancer Research;* 2012;18: 5562–71. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1773
 65. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. DNA Methylation, Isocitrate Dehydrogenase Mutation, and Survival in Glioma. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2011;103: 143–153. doi:10.1093/jnci/djq497
 66. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, et al. Molecular Markers in Low-Grade Gliomas: Predictive or Prognostic? *Clin Cancer Res.* 2011;17: 4588–4599. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3194
 67. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010;120: 707–718. doi:10.1007/s00401-010-0781-z
 68. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillemin R, Laffaire J, et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology.* 2010;75: 1560–1566. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f96282

Bibliografía

69. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *J Clin Oncol*. 2009;27: 4150–4154. doi:10.1200/JCO.2009.21.9832
70. Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The Next Generation of Glioma Biomarkers: MGMT Methylation, BRAF Fusions and IDH1 Mutations. *Brain Pathol*. 2011;21: 74–87. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00454.x
71. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*. 2007;8: 299–309. doi:10.1038/nrg2047
72. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4: 2185. doi:10.1038/ncomms3185
73. Pestana A, Vinagre J, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *J Mol Endocrinol*. BioScientifica; 2017;58: R129–R146. doi:10.1530/JME-16-0195
74. Allory Y, Beukers W, Sagrera A, Flández M, Marqués M, Márquez M, et al. Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Bladder Cancer: High Frequency Across Stages, Detection in Urine, and Lack of Association with Outcome. *Eur Urol*. 2014;65: 360–366. doi:10.1016/j.eururo.2013.08.052
75. Quaas A, Oldopp T, Tharun L, Klingensfeld C, Krech T, Sauter G, et al. Frequency of TERT promoter mutations in primary tumors of the liver. *Virchows Arch*. 2014;465: 673–677. doi:10.1007/s00428-014-1658-7
76. Andrés-Lencina JJ, Rachakonda S, García-Casado Z, Srinivas N, Skorokhod A, Requena C, et al. *TERT* promoter mutation subtypes and survival in stage I and II melanoma patients. *Int J Cancer*. Wiley-Blackwell; 2018; doi:10.1002/ijc.31780
77. Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA, et al. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC; 2014;5: 1515. doi:10.18632/ONCOTARGET.1765
78. Bell RJA, Rube HT, Xavier-Magalhães A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res*. NIH Public Access; 2016;14: 315–23. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0003
79. Wang K, Liu T, Ge N, Liu L, Yuan X, Liu J, et al. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in upper tract urothelial carcinomas and serve as urinary biomarkers detected by a sensitive castPCR. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC; 2014;5: 12428–39. doi:10.18632/oncotarget.2660
80. Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, Kryzstofiak A, Hallbeck M, Milos P, et al. <i>TERT</i> promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*. 2015;6: 16663–73. doi:10.18632/oncotarget.4389
81. Hotta T, Saito Y, Fujita H, Mikami T, Kurisu K, Kiya K, et al. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity of human malignant glioma and its clinical implications. *J*

- Neurooncol. 1994;21: 135–40. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7861189>
82. Chen Y, Hu F, Zhou Y, Chen W, Shao H, Zhang Y. MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma Prognosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res. Elsevier*; 2013;44: 281–290. doi:10.1016/j.arcmed.2013.04.004
 83. Martínez-Cardús A, Vizoso M, Moran S, Manzano JL. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. *Ann Transl Med.* 2015;3: 209. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.20
 84. Gutenberg A, Bock HC, Brück W, Doerner L, Mehdorn HM, Roggendorf W, et al. MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. *Br J Neurosurg. Taylor & Francis*; 2013;27: 772–778. doi:10.3109/02688697.2013.791664
 85. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. Alonso MM, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2015;10: e0140131. doi:10.1371/journal.pone.0140131
 86. Zhao Y-H, Wang Z-F, Cao C-J, Weng H, Xu C-S, Li K, et al. The Clinical Significance of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation Status in Adult Patients With Glioblastoma: A Meta-analysis. *Front Neurol. Frontiers Media SA*; 2018;9: 127. doi:10.3389/fneur.2018.00127
 87. Vidal EI, Alenda C, Egoavil C, García-Martínez A, Hernández-Illán E, Martínez-Canto A, et al. 572 SOCS1 Methylation is Associated to MGMT Methylation and IDH1 Mutation in Gliomas. *Eur J Cancer. Elsevier*; 2012;48: S136. doi:10.1016/S0959-8049(12)71230-3
 88. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14: 359–370. doi:10.1038/nrc3711
 89. Liu L, Li XD, Chen HY, Cui JS, Xu DY. Significance of Ebp1 and p53 protein expression in cervical cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14: 11860–11866. doi:10.4238/2015.October.2.19
 90. Ham SW, Jeon H-Y, Jin X, Kim E-J, Kim J-K, Shin YJ, et al. TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. *Cell Death Differ. Nature Publishing Group*; 2018; 1. doi:10.1038/s41418-018-0126-3
 91. Huszno J, Grzybowska E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. *Oncol Lett. Spandidos Publications*; 2018;16: 34–40. doi:10.3892/ol.2018.8627
 92. Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med. EMBO Press*; 2014;6: 1359–70. doi:10.15252/emmm.201302627
 93. Li Y, Guessous F, Kwon S, Kumar M, Ibadapo O, Fuller L, et al. PTEN has tumor-promoting properties in the setting of gain-of-function p53 mutations. *Cancer Res. NIH Public Access*; 2008;68: 1723–31. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1963
 94. Idoate MA, Echeveste J, Díez-Valle R, Lozano MD, Aristu J. Biological and clinical

Bibliografía

- significance of the intratumour heterogeneity of PTEN protein expression and the corresponding molecular abnormalities of the *PTEN* gene in glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40: 736–746. doi:10.1111/nan.12117
95. Ortega-Molina A, Serrano M. PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24: 184–189. doi:10.1016/j.tem.2012.11.002
 96. Omuro A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *JAMA*. 2013;310: 1842. doi:10.1001/jama.2013.280319
 97. Bohman L-E, Swanson KR, Moore JL, Rockne R, Mandigo C, Hankinson T, et al. Magnetic Resonance Imaging Characteristics of Glioblastoma Multiforme: Implications for Understanding Glioma Ontogeny. *Neurosurgery*. 2010;67: 1319–1328. doi:10.1227/NEU.0b013e3181f556ab
 98. Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, et al. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13: 701–718. doi:10.1517/14728220902942348
 99. Zhang J, Liu H, Tong H, Wang S, Yang Y, Liu G, et al. Clinical Applications of Contrast-Enhanced Perfusion MRI Techniques in Gliomas: Recent Advances and Current Challenges. *Contrast Media Mol Imaging*. Hindawi Limited; 2017;2017: 7064120. doi:10.1155/2017/7064120
 100. HU X, MIAO W, ZOU Y, ZHANG W, ZHANG Y, LIU H. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. *Oncol Lett*. Spandidos Publications; 2013;6: 130–134. doi:10.3892/ol.2013.1317
 101. Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol*. NIH Public Access; 2014;232: 165–77. doi:10.1002/path.4282
 102. Juratli TA, Schackert G, Krex D. Current status of local therapy in malignant gliomas — A clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther*. 2013;139: 341–358. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.05.003
 103. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. Elsevier; 2006;7: 392–401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9
 104. Sanai N, Mirzadeh Z, Berger MS. Functional Outcome after Language Mapping for Glioma Resection. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society ; 2008;358: 18–27. doi:10.1056/NEJMoa067819
 105. Wolbers JG. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chin J Cancer*. BioMed Central; 2014;33: 8–15. doi:10.5732/cjc.013.10219
 106. Dimitri P, Agamanolis MD. Tumors of the central nervous system [Internet]. 2017 [cited 25 Jun 2018]. Available: <http://neuropathology-web.org/chapter7/chapter7bGliomas.html#astro>
 107. Wang Z, Yang G, Zhang Y-Y, Yao Y, Dong L-H. A comparison between oral

- chemotherapy combined with radiotherapy and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. Wolters Kluwer Health; 2017;96: e8444. doi:10.1097/MD.00000000000008444
108. Barker CA, Chang M, Chou JF, Zhang Z, Beal K, Gutin PH, et al. Radiotherapy and concomitant temozolomide may improve survival of elderly patients with glioblastoma. *J Neurooncol*. NIH Public Access; 2012;109: 391–7. doi:10.1007/s11060-012-0906-4
 109. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society ; 2005;352: 987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330
 110. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*. 2015;152: 63–82. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005
 111. Chowdhary SA, Ryken T, Newton HB. Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis. *J Neurooncol*. Springer; 2015;122: 367–82. doi:10.1007/s11060-015-1724-2
 112. Minniti G, Filippi AR, Osti MF, Ricardi U. Radiation therapy for older patients with brain tumors. *Radiat Oncol*. BioMed Central; 2017;12: 101. doi:10.1186/s13014-017-0841-9
 113. Mangum R, Nakano I. Carcinogenesis & Mutagenesis Glioma Stem Cells and their Therapy Resistance. *J Carcinog Mutagen*. 2011;1. doi:10.4172/2157-2518.S1-002
 114. Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT, Ross AH. Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals*. 2013;6: 1475–1506. doi:10.3390/ph6121475
 115. ABE H, NATSUMEDA M, KANEMARU Y, WATANABE J, TSUKAMOTO Y, OKADA M, et al. MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas and MGMT Silencing to Temozolomide Sensitivity in IDH-Mutant Gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018; doi:10.2176/nmc.ra.2018-0044
 116. Rinaldi M, Caffo M, Minutoli L, Marini H, Abbritti RV, Squadrito F, et al. ROS and brain gliomas: An overview of potential and innovative therapeutic strategies [Internet]. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. pp. 17, 984. doi:10.3390/ijms17060984
 117. Powell S, McMillan TJ. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother Oncol*. 1990;19: 95–108. doi:10.1016/0167-8140(90)90123-E
 118. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, et al. Dysfunctional KEAP1–NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. Meyerson M, editor. *PLoS Med*. 2006;3: e420. doi:10.1371/journal.pmed.0030420
 119. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, et al. Loss of

Bibliografía

- Keap1 Function Activates Nrf2 and Provides Advantages for Lung Cancer Cell Growth. *Cancer Res.* 2008;68: 1303–1309. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5003
120. Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* Academic Press; 2007;362: 816–821. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X07017433?via%3Dihub>
121. Zhang P, Singh A, Yegnasubramanian S, Esopi D, Kombairaju P, Bodas M, et al. Loss of Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 Function in Prostate Cancer Cells Causes Chemoresistance and Radioresistance and Promotes Tumor Growth. *Mol Cancer Ther.* 2010;9: 336–346. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0589
122. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Fountzilias E, Francoeur N, Sanisetty S, Grammatikos AP, et al. Keap1 Mutations and Nrf2 Pathway Activation in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2011;71: 5081–5089. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4668
123. Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2012;12: 66. doi:10.1186/1471-2407-12-66
124. Huang Y, Li W, Su Z, Kong A-NT. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem.* NIH Public Access; 2015;26: 1401–13. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.001
125. Zhou S, Ye W, Shao Q, Zhang M, Liang J. Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;88: 706–715. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.09.001
126. Zhou S, Ye W, Shao Q, Zhang M, Liang J. Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer. Elsevier; 2013;88. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.09.001
127. Zhang J, Jiao Q, Kong L, Yu J, Fang A, Li M, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in esophageal squamous cell carcinoma and association with the effect of chemoradiotherapy. *Thorac Cancer.* 2018;9: 726–735. doi:10.1111/1759-7714.12640
128. Lee S, Lim M-J, Kim M-H, Yu C-H, Yun Y-S, Ahn J, et al. An effective strategy for increasing the radiosensitivity of Human lung Cancer cells by blocking Nrf2-dependent antioxidant responses. *Free Radic Biol Med.* 2012;53: 807–816. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.038
129. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell.* 2018;34: 21–43. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.022
130. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006;444: 756–760. doi:10.1038/nature05236
131. Castellino RC, Durden DL. Mechanisms of Disease: the PI3K–Akt–PTEN signaling node—an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin*

- Pract Neurol. 2007;3: 682–693. doi:10.1038/ncpneuro0661
132. Hambardzumyan D, Squatrito M, Carbajal E, Holland EC. Glioma Formation, Cancer Stem Cells, and Akt Signaling. *Stem Cell Rev.* 2008;4: 203–210. doi:10.1007/s12015-008-9021-5
 133. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer. Nature Publishing Group;* 2015;113: 365–71. doi:10.1038/bjc.2015.233
 134. Fayard E, Moncayo G, Hemmings BA, Hollander GA. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Thymocytes: The Need for Stringent Control. *Sci Signal.* 2010;3: re5-re5. doi:10.1126/scisignal.3135re5
 135. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science. American Association for the Advancement of Science;* 2002;296: 1655–7. doi:10.1126/science.296.5573.1655
 136. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal J. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008;8: 187–198. doi:10.2174/156800908784293659
 137. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol. Frontiers;* 2014;3: 326. doi:10.3389/fonc.2013.00326
 138. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004;117: 1281–1283. doi:10.1242/jcs.00963
 139. Carballo M, Conde M, El Bekay R, Martín-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirín J, et al. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem.* 1999;274: 17580–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364193>
 140. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene. Nature Publishing Group;* 2000;19: 2628–2637. doi:10.1038/sj.onc.1203481
 141. Wierenga ATJ, Vogelzang I, Eggen BJJ, Vellenga E. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol. Elsevier;* 2003;31: 398–405. doi:10.1016/S0301-472X(03)00045-6
 142. Zhang Y, Liu G, Dong Z. MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology;* 2001;276: 42534–42. doi:10.1074/jbc.M106044200
 143. Leonard WJ, O’Shea JJ. JAKS AND STATS: Biological Implications. *Annu Rev Immunol. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA ; 1998;16: 293–322. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.293
 144. Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C. Mining for JAK–STAT mutations in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2008;33: 122–131. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.002
 145. Trengove MC, Ward AC. SOCS proteins in development and disease. *Am J Clin Exp Immunol. e-Century Publishing Corporation;* 2013;2: 1–29. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885323>

Bibliografia

146. Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol.* NIH Public Access; 2009;30: 392–400. doi:10.1016/j.it.2009.07.001
147. Culig Z. Suppressors of cytokine signalling-3 and -1 in human carcinogenesis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013;5: 277–283. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277051>
148. Lennerz JK, Hoffmann K, Bubolz A-M, Lessel D, Welke C, R  ther N, et al. <i>Suppressor of cytokine signaling 1</i> gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6: 29097–110. doi:10.18632/oncotarget.4829
149. Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2: 410–416. doi:10.1038/nri818
150. Yan Z, Gibson SA, Buckley JA, Qin H, Benveniste EN. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clin Immunol*. 2018;189: 4–13. doi:10.1016/j.clim.2016.09.014
151. Wormald S, Zhang J-G, Krebs DL, Mielke LA, Silver J, Alexander WS, et al. The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2006;281: 11135–43. doi:10.1074/jbc.M509595200
152. Jiang M, Zhang W-W, Liu P, Yu W, Liu T, Yu J. Dysregulation of SOCS-Mediated Negative Feedback of Cytokine Signaling in Carcinogenesis and Its Significance in Cancer Treatment. *Front Immunol. Frontiers Media SA*; 2017;8: 70. doi:10.3389/fimmu.2017.00070
153. Evans MK, Yu C-R, Lohani A, Mahdi RM, Liu X, Trzeciak AR, et al. Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals. *Oncogene. Nature Publishing Group*; 2007;26: 1941–1948. doi:10.1038/sj.onc.1209993
154. Zhou H, Miki R, Eeva M, Fike FM, Seligson D, Yang L, et al. Reciprocal Regulation of SOCS 1 and SOCS3 Enhances Resistance to Ionizing Radiation in Glioblastoma Multiforme. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 2344–2353. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2303
155. Li G, Xu J, Wang Z, Yuan Y, Li Y, Cai S, et al. Low expression of SOCS-1 and SOCS-3 is a poor prognostic indicator for gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141: 443–452. doi:10.1007/s00432-014-1838-5
156. Zhang J, Li H, Yu J-P, Wang SE, Ren X-B. Role of SOCS1 in tumor progression and therapeutic application. *Int J Cancer*. 2012;130: 1971–1980. doi:10.1002/ijc.27318
157. Yoshikawa H, Matsubara K, Qian G-S, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*. 2001;28: 29–35. doi:10.1038/88225

158. Raccurt M, Tam SP, Lau P, Mertani HC, Lambert A, Garcia-Caballero T, et al. Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma. *Br J Cancer. Nature Publishing Group*; 2003;89: 524–32. doi:10.1038/sj.bjc.6601115
159. Laner-Plamberger S, Wolff F, Kaser-Eichberger A, Swierczynski S, Hauser-Kronberger C, Frischauf A-M, et al. Hedgehog/GLI Signaling Activates Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) in Epidermal and Neural Tumor Cells. Xie J, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2013;8: e75317. doi:10.1371/journal.pone.0075317
160. Beaurivage C, Champagne A, Tobelaim WS, Pomerleau V, Menendez A, Saucier C. SOCS1 in cancer: An oncogene and a tumor suppressor. *Cytokine*. 2016;82: 87–94. doi:10.1016/j.cyto.2016.01.005
161. Yu H, Liu Y, McFarland BC, Deshane JS, Hurst DR, Ponnazhagan S, et al. SOCS3 Deficiency in Myeloid Cells Promotes Tumor Development: Involvement of STAT3 Activation and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res. NIH Public Access*; 2015;3: 727–40. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0004
162. Huang L, Hu B, Ni J, Wu J, Jiang W, Chen C, et al. Transcriptional repression of SOCS3 mediated by IL-6/STAT3 signaling via DNMT1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis. 2016; doi:10.1186/s13046-016-0301-7
163. Chu Q, Shen D, He L, Wang H, Liu C, Zhang W. Prognostic significance of SOCS3 and its biological function in colorectal cancer. *Gene*. 2017;627: 114–122. doi:10.1016/j.gene.2017.06.013
164. Kim G, Ouzounova M, Quraishi AA, Davis A, Tawakkol N, Clouthier SG, et al. SOCS3-mediated regulation of inflammatory cytokines in PTEN and p53 inactivated triple negative breast cancer model. *Oncogene*. 2015;34: 671–680. doi:10.1038/onc.2014.4
165. Neuwirt H, Pühr M, Santer FR, Susani M, Doppler W, Marcias G, et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 is expressed in human prostate cancer and exerts growth-inhibitory function through down-regulation of cyclins and cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2009;174: 1921–30. doi:10.2353/ajpath.2009.080751
166. He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, et al. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*; 2003;100: 14133–8. doi:10.1073/pnas.2232790100
167. Martini M, Pallini R, Luongo G, Cenci T, Lucantoni C, Larocca LM. Prognostic relevance of SOCS3 hypermethylation in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Cancer. Wiley-Blackwell*; 2008;123: 2955–2960. doi:10.1002/ijc.23805
168. Saceda M, Fernandez-Ballester G, Encinar-Hidalgo JA, Caruana P, Poveda-Delltel M, Lucero-Calabuig P, et al. 158 PTK6 inhibition potentiates the effects of the EGFR antibody cetuximab and the small tyrosine kinase inhibitors on pancreatic carcinoma cell lines proliferation. *Eur J Cancer. Elsevier*; 2015;51: S16–S17. doi:10.1016/S0959-8049(16)30055-7

Bibliografia

169. Brauer PM, Tyner AL. Building a better understanding of the intracellular tyrosine kinase PTK6 — BRK by BRK. 2010; doi:10.1016/j.bbcan.2010.02.003
170. Ludyga N, Anastasov N, Gonzalez-Vasconcellos I, Ram M, Höfler H, Aubele M. Impact of protein tyrosine kinase 6 (PTK6) on human epidermal growth factor receptor (HER) signalling in breast cancer. *Mol Biosyst.* 2011;7: 1603. doi:10.1039/c0mb00286k
171. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJB, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendrogial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res. American Association for Cancer Research;* 2010;16: 1597–604. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2902
172. Jeuken JWM, Cornelissen SJB, Vriezen M, Dekkers MMG, Errami A, Sijben A, et al. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest.* 2007;87: 1055–1065. doi:10.1038/labinvest.3700664
173. Li L-C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002;18: 1427–31. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424112>
174. Kim M-H, Kim M-S, Kim W, Kang MA, Cacalano NA, Kang S-B, et al. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Genes Are Silenced by DNA Hypermethylation and Histone Deacetylation and Regulate Response to Radiotherapy in Cervical Cancer Cells. Scott RJ, editor. *PLoS One.* 2015;10: e0123133. doi:10.1371/journal.pone.0123133
175. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3: 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
176. Stevenson M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol.* 2003;3: 851–858. doi:10.1038/nri1227
177. Kim H-J, Bae S-C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res.* e-Century Publishing Corporation; 2011;3: 166–79. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21416059>
178. Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, et al. Histone deacetylation in epigenetics: An attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev.* 2005;25: 261–309. doi:10.1002/med.20024
179. Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. 2002. pp. 41–65. doi:10.1016/S0065-230X(02)86002-X
180. Xu W, Parmigiani R, Marks P. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007;26: 5541–5552. doi:10.1038/sj.onc.1210620
181. Goyal R, Mathur SK, Gupta S, Goyal R, Kumar S, Batra A, et al.

- Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system. *J Neurosci Rural Pract*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2015;6: 499–503. doi:10.4103/0976-3147.168426
182. Otani K, Naito Y, Sakaguchi Y, Seo Y, Takahashi Y, Kikuta J, et al. Cell-cycle-controlled radiation therapy was effective for treating a murine malignant melanoma cell line in vitro and in vivo. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6: 30689. doi:10.1038/srep30689
 183. Mirimanoff R-O, Gorlia T, Mason W, Van Den Bent MJ, Kortmann R-D, Fisher B, et al. Radiotherapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: Recursive Partitioning Analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 Phase III Randomized Trial. *J Clin Oncol*. 2006;24: 2563–2569. doi:10.1200/JCO.2005.04.5963
 184. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2009;8: 443–50. doi:10.1074/mcp.M800258-MCP200
 185. Alsner J, Sørensen SB, Overgaard J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*. 2001;59: 179–85. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325447>
 186. Gao K, Li G, Qu Y, Wang M, Cui B, Ji M, et al. TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC; 2016;7: 8712–25. doi:10.18632/oncotarget.6007
 187. Jung S-J, Kim D-S, Park W-J, Lee H, Choi I-J, Park J-Y, et al. Mutation of the TERT promoter leads to poor prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. Spandidos Publications; 2017;14: 1609–1614. doi:10.3892/ol.2017.6284
 188. Wang X, Chen J, Liu J, You C, Liu Y, Mao Q. Gain of Function of Mutant TP53 in Glioblastoma: Prognosis and Response to Temozolomide. *Ann Surg Oncol*. 2014;21: 1337–1344. doi:10.1245/s10434-013-3380-0
 189. Akiyama-Abe A, Minaguchi T, Nakamura Y, Michikami H, Shikama A, Nakao S, et al. Loss of PTEN expression is an independent predictor of favourable survival in endometrial carcinomas. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2013;109: 1703–10. doi:10.1038/bjc.2013.455
 190. Lee JI, Soria J-C, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, et al. Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. American Medical Association; 2001;127: 1441. doi:10.1001/archotol.127.12.1441
 191. Yang Y, Shao N, Luo G, Li L, Zheng L, Nilsson-Ehle P, et al. Mutations of PTEN gene in gliomas correlate to tumor differentiation and short-term survival rate. *Anticancer Res*. International Institute of Anticancer Research; 2010;30: 981–5.

Bibliografía

- Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393024>
192. Han F, Hu R, Yang H, Liu J, Sui J, Xiang X, et al. PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* Dove Press; 2016;9: 3485–92. doi:10.2147/OTT.S99942
 193. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, et al. Impact of Genotype and Morphology on the Prognosis of Glioblastoma [Internet]. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 2002. Available: <https://academic.oup.com/jnen/article-abstract/61/4/321/2916289>
 194. Carico C, Nuño M, Mukherjee D, Elramsisy A, Dantis J, Hu J, et al. Loss of PTEN Is Not Associated with Poor Survival in Newly Diagnosed Glioblastoma Patients of the Temozolomide Era. Lo AWI, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2012;7: e33684. doi:10.1371/journal.pone.0033684
 195. Qiu Z-K, Shen D, Chen Y-S, Yang Q-Y, Guo C-C, Feng B-H, et al. Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. *Chin J Cancer.* 2014;33: 115–122. doi:10.5732/cjc.012.10236
 196. Kim HS, Kwon MJ, Song JH, Kim ES, Kim HY, Min K-W. Clinical implications of TERT promoter mutation on IDH mutation and MGMT promoter methylation in diffuse gliomas. *Pathol - Res Pract.* 2018;214: 881–888. doi:10.1016/j.prp.2018.04.002
 197. Fiore M, Degrassi F. Dimethyl Sulfoxide Restores Contact Inhibition-Induced Growth Arrest and Inhibits Cell Density-Dependent Apoptosis in Hamster Cells. *Exp Cell Res.* 1999;251: 102–110. doi:10.1006/excr.1999.4542
 198. Ponzio G, Loubat A, Rochet N, Turchi L, Rezzonico R, Far DF, et al. Early G1 growth arrest of hybridoma B cells by DMSO involves cyclin D2 inhibition and p21[CIP1] induction. *Oncogene.* 1998;17: 1159–1166. doi:10.1038/sj.onc.1202040
 199. Trubiani O, Ciancarelli M, Rapino M, Di Primio R. Dimethyl sulfoxide induces programmed cell death and reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid pre-T cell line. *Immunol Lett.* 1996;50: 51–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793559>
 200. Toffolatti L, Scquizzato E, Cavallin S, Canal F, Scarpa M, Stefani PM, et al. MGMT promoter methylation and correlation with protein expression in primary central nervous system lymphoma. *Virchows Arch.* 2014;465: 579–586. doi:10.1007/s00428-014-1622-6
 201. Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol Cancer.* BioMed Central; 2011;10: 128. doi:10.1186/1476-4598-10-128
 202. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133 + cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* BioMed Central; 2006;5: 67. doi:10.1186/1476-4598-5-67
 203. Chang T-P, Vancurova I. Bcl3 regulates pro-survival and pro-inflammatory gene expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843: 2620–2630. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.07.012
 204. Wu J, Li L, Jiang G, Zhan H, Wang N. B-cell CLL/lymphoma 3 promotes glioma cell

- proliferation and inhibits apoptosis through the oncogenic STAT3 pathway. *Int J Oncol.* 2016;49: 2471–2479. doi:10.3892/ijo.2016.3729
205. Wu L, Bernal GM, Cahill KE, Pytel P, Fitzpatrick CA, Mashek H, et al. *BCL3* expression promotes resistance to alkylating chemotherapy in gliomas. *Sci Transl Med.* 2018;10: eaar2238. doi:10.1126/scitranslmed.aar2238
206. Suetens A, Konings K, Moreels M, Quintens R, Verslegers M, Soors E, et al. Higher Initial DNA Damage and Persistent Cell Cycle Arrest after Carbon Ion Irradiation Compared to X-irradiation in Prostate and Colon Cancer Cells. *Front Oncol. Frontiers Media SA;* 2016;6: 87. doi:10.3389/fonc.2016.00087
207. Li M-Y, Liu J-Q, Chen D-P, Li Z-Y, Qi B, He L, et al. Radiotherapy induces cell cycle arrest and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma via the ATM and Smad pathways. *Cancer Biol Ther. Taylor & Francis;* 2017;18: 681–693. doi:10.1080/15384047.2017.1360442
208. Handle F, Erb HHH, Luef B, Hoefler J, Dietrich D, Parson W, et al. SOCS3 Modulates the Response to Enzalutamide and Is Regulated by Androgen Receptor Signaling and CpG Methylation in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 2016;14: 574–85. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0495
209. Chevrier M, Bobbala D, Villalobos-Hernandez A, Gulam Musawwir Khan M, Ramanathan S, Saucier C, et al. Expression of SOCS1 and the downstream targets of its putative tumor suppressor functions in prostate cancer. *BMC Cancer.* 2018;17: 157. doi:10.1186/s12885-017-3141-8
210. Dumur CI, Ladd AC, Wright H V, Penberthy LT, Wilkinson DS, Powers CN, et al. Genes involved in radiation therapy response in head and neck cancers. *Laryngoscope. NIH Public Access;* 2009;119: 91–101. doi:10.1002/lary.20005
211. Wong YF, Sahota DS, Cheung TH, Lo KWK, Yim SF, Chung TKH, et al. Gene Expression Pattern Associated with Radiotherapy Sensitivity in Cervical Cancer. *Cancer J.* 2006;12: 189–193. doi:10.1097/00130404-200605000-00006
212. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences;* 2001;98: 10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098
213. Bravatà V, Minafra L, Russo G, Forte GI, Cammarata FP, Ripamonti M, et al. High-dose Ionizing Radiation Regulates Gene Expression Changes in the MCF7 Breast Cancer Cell Line. *Anticancer Res. International Institute of Anticancer Research;* 2015;35: 2577–91. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25964533>
214. Suetens A, Moreels M, Quintens R, Soors E, Buset J, Chiriotti S, et al. Dose- and time-dependent gene expression alterations in prostate and colon cancer cells after in vitro exposure to carbon ion and X-irradiation. *J Radiat Res. Oxford University Press;* 2015;56: 11–21. doi:10.1093/jrr/rru070
215. Gao Y, Cimica V, Reich NC. Suppressor of Cytokine Signaling 3 Inhibits Breast Tumor Kinase Activation of STAT3. *J Biol Chem.* 2012;287: 20904–20912. doi:10.1074/jbc.M111.334144

Bibliografía

216. Liu L, Gao Y, Qiu H, Miller WT, Poli V, Reich NC. Identification of STAT3 as a specific substrate of breast tumor kinase. *Oncogene*. 2006;25: 4904–4912. doi:10.1038/sj.onc.1209501
217. McDonald JT, Kim K, Norris AJ, Vlashi E, Phillips TM, Lagadec C, et al. Ionizing Radiation Activates the Nrf2 Antioxidant Response. *Cancer Res*. 2010;70: 8886–8895. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0171
218. Jamal M, Rath BH, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ. Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clin Cancer Res*. NIH Public Access; 2010;16: 6049–59. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2435
219. Aubele M, Vidojkovic S, Braselmann H, Ritterswürden D, Auer G, Atkinson MJ, et al. Overexpression of PTK6 (breast tumor kinase) protein—a prognostic factor for long-term breast cancer survival—is not due to gene amplification. *Virchows Arch*. 2009;455: 117–123. doi:10.1007/s00428-009-0809-8
220. Ito K, Park SH, Katsyv I, Zhang W, De Angelis C, Schiff R, et al. PTK6 regulates growth and survival of endocrine therapy-resistant ER+ breast cancer cells. *npj Breast Cancer*. Nature Publishing Group; 2017;3: 45. doi:10.1038/s41523-017-0047-1
221. Ono H, Basson MD, Ito H. PTK6 Promotes Cancer Migration and Invasion in Pancreatic Cancer Cells Dependent on ERK Signaling. Gotoh N, editor. *PLoS One*. 2014;9: e96060. doi:10.1371/journal.pone.0096060
222. Wozniak DJ, Kajdacsy-Balla A, Macias V, Ball-Kell S, Zenner ML, Bie W, et al. PTEN is a protein phosphatase that targets active PTK6 and inhibits PTK6 oncogenic signaling in prostate cancer. *Nat Commun*. 2017;8: 1508. doi:10.1038/s41467-017-01574-5
223. Xu X, Ye Y-L, Wu Z-M, He Q-M, Tan L, Xiao K-H, et al. Overexpression of PTK6 predicts poor prognosis in bladder cancer patients. *J Cancer*. 2017;8: 3464–3473. doi:10.7150/jca.21318
224. Irie HY, Shrestha Y, Selfors LM, Frye F, Iida N, Wang Z, et al. PTK6 Regulates IGF-1-Induced Anchorage-Independent Survival. Cordes N, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2010;5: e11729. doi:10.1371/journal.pone.0011729
225. Park SH, Ito K, Olcott W, Katsyv I, Halstead-Nussloch G, Irie HY. PTK6 inhibition promotes apoptosis of Lapatinib-resistant Her2+ breast cancer cells by inducing Bim. *Breast Cancer Res*. BioMed Central; 2015;17: 86. doi:10.1186/s13058-015-0594-z
226. Harvey AJ, Crompton MR. Use of RNA interference to validate Brk as a novel therapeutic target in breast cancer: Brk promotes breast carcinoma cell proliferation. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2003;22: 5006–5010. doi:10.1038/sj.onc.1206577
227. Qiu L, Levine K, Gajiwala KS, Cronin CN, Nagata A, Johnson E, et al. Small molecule inhibitors reveal PTK6 kinase is not an oncogenic driver in breast cancers. Lebedeva I V., editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2018;13: e0198374. doi:10.1371/journal.pone.0198374

228. Stacy DR, Ely K, Massion PP, Yarbrough WG, Hallahan DE, Sekhar KR, et al. Increased expression of nuclear factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2006;28: 813–818. doi:10.1002/hed.20430
229. Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, et al. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol*. 2010;220: 446–451. doi:10.1002/path.2653
230. Cong Z-X, wang H-D, Zhou Y, Wang J-W, Pan H, Zhang D-D, et al. Temozolomide and irradiation combined treatment-induced Nrf2 activation increases chemoradiation sensitivity in human glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2014;116: 41–48. doi:10.1007/s11060-013-1260-x
231. Ji X, Wang H, Zhu J, Zhu L, Pan H, Li W, et al. Knockdown of Nrf2 suppresses glioblastoma angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α . *Int J Cancer*. 2014;135: 574–584. doi:10.1002/ijc.28699
232. Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, et al. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol*. Oxford University Press; 2015;17: 555–565. doi:10.1093/neuonc/nou282
233. Ma X, Zhang J, Liu S, Huang Y, Chen B, Wang D. Nrf2 knockdown by shRNA inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy in cervical cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69: 485–494. doi:10.1007/s00280-011-1722-9
234. Yoshino H, Murakami K, Nawamaki M, Kashiwakura I. Effects of Nrf2 knockdown on the properties of irradiated cell conditioned medium from A549 human lung cancer cells. *Biomed Reports*. 2018;8: 461–465. doi:10.3892/br.2018.1073
235. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal*. Mary Ann Liebert, Inc.; 2012;16: 1295–322. doi:10.1089/ars.2011.4414
236. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. Elsevier; 2014;24: R453-62. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034
237. Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, et al. Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *J Cancer*. 2017;8: 1586–1597. doi:10.7150/jca.18735
238. Arthur JSC. MSK activation and physiological roles. *Front Biosci*. 2008;13: 5866–79. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508628>
239. Reyskens KMSE, Arthur JSC. Emerging Roles of the Mitogen and Stress Activated Kinases MSK1 and MSK2. *Front cell Dev Biol*. Frontiers Media SA; 2016;4: 56. doi:10.3389/fcell.2016.00056
240. Pu X, Storr SJ, Ahmad NS, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. High nuclear MSK1 is associated with longer survival in breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. Springer; 2018;144: 509–517. doi:10.1007/s00432-018-2579-7
241. Fu X, Fan X, Hu J, Zou H, Chen Z, Liu Q, et al. Overexpression of MSK1 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in colorectal cancer. *Dig Liver Dis*.

Bibliografía

- Elsevier; 2017;49: 683–691. doi:10.1016/j.dld.2017.02.009
242. Gawrzak S, Rinaldi L, Gregorio S, Arenas EJ, Salvador F, Urosevic J, et al. MSK1 regulates luminal cell differentiation and metastatic dormancy in ER+ breast cancer. *Nat Cell Biol.* 2018;20: 211–221. doi:10.1038/s41556-017-0021-z
243. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 2000;24: 227–235. doi:10.1038/73432
244. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270: 467–70. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569999>
245. Sun Z, Huang Z, Zhang DD. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One.* Public Library of Science; 2009;4: e6588. doi:10.1371/journal.pone.0006588
246. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* NIH Public Access; 2009;27: 351–7. doi:10.1055/s-0029-1237423
247. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14: 1008–1016. doi:10.1038/nsmb1337
248. Cuperlovic-Culf M, Touaibia M, St-Coeur P-D, Poitras J, Morin P, Culf A. Metabolic Effects of Known and Novel HDAC and SIRT Inhibitors in Glioblastomas Independently or Combined with Temozolomide. *Metabolites.* 2014;4: 807–830. doi:10.3390/metabo4030807
249. Staberg M, Michaelsen SR, Rasmussen RD, Villingshøj M, Poulsen HS, Hamerlik P. Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. *Cell Oncol.* 2017;40: 21–32. doi:10.1007/s13402-016-0301-9



Anexo I

Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of *SOCS1* and *SOCS3*

Maria Paz Ventero^{1,4}, Maria Fuentes-Baile², Cristina Quereda³, Elizabeth Perez-Valeciano⁴, Cristina Alenda², Pilar Garcia-Morales⁴, Danilo Esposito⁵, Pilar Dorado⁵,

Victor Manuel Barbera^{1,3*}, Miguel Saceda^{1*}

1 Hospital General Universitario de Elche, FISABIO, Cami´ de l'Almazara, Elx (Alicante), Spain, **2** Instituto de Investigacio´n Biome´dica y Sanitaria de Alicante (ISABIAL), Hospital General Universitario de Alicante, C/ Maestro Alonso, Alicante (Alicante), Spain, **3** Departamento de Fisiolog´ıa, Gene´tica y Microbiolog´ıa, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante (Alicante), Spain, **4** Instituto de Biolog´ıa Molecular y Celular, Ed. Torregaitan, Universidad Miguel Herna´ndez, Elche (Alicante), Spain, **5** Unidad de Oncolog´ıa Radioterap´ıca, ERESA, Hospital General Universitario de Elche, Cami´ de l'Almazara, Elx (Alicante), Spain

* barbera_vicjua@gva.es (VMB); msaceda@umh.es (MS)

Citation: Ventero MP, Fuentes-Baile M, Quereda C, Perez-Valeciano E, Alenda C, Garcia-Morales P, et al. (2019) Radiotherapy resistance acquisition in

Glioblastoma. Role of *SOCS1* and *SOCS3*. PLoS ONE 14(2): e0212581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581>

Editor: Gabriel F. Calvo, Universidad de Castilla-La Mancha, SPAIN

Received: October 29, 2018

Accepted: February 5, 2019

Published: February 27, 2019

Copyright:© 2019 Ventero et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This article has been funded by a grant from "Instituto de Salud Carlos III" (Grant PI012/ 02025), co-supported by FEDER funds, to M. Saceda; "Fundacio´n ERESA" small project to M. Saceda, FISABIO grant (UGP-15-237) to V. M. Barbera, and a donation from AFECANCER to M. Saceda.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is a poor prognosis type of tumour due to its resistance to chemo and radiotherapy. *SOCS1* and *SOCS3* have been associated with tumour progression and response to treatments in different kinds of cancers, including GBM. In this study, cell lines of *IDH*-wildtype GBM from primary cultures were obtained, and the role of *SOCS1* and *SOCS3* in the radiotherapy response was analysed. Fifty-two brain aspirates from GBM patients were processed, and six new cell lines of *IDH*-wildtype GBM were established. These new cell lines were characterized according to the WHO classification of CNS tumours. *SOCS1* and *SOCS3* expression levels were determined, at mRNA level by QPCR, at protein level by immunocytochemistry, and Western blot analysis. The results showed that *SOCS1* and *SOCS3* are overexpressed in GBM, as compared to a non-tumoral brain RNA pool. *SOCS1* and *SOCS3* expression were reduced by siRNA, and it was found that *SOCS3* inhibition increases radioresistance in GBM cell lines, suggesting a key role of *SOCS3* in radioresistant acquisition. In addition, radioresistant clonal populations obtained by selective pressure on these cell cultures also showed a significant decrease in *SOCS3* expression, while *SOCS1* remained unchanged. Furthermore, the induction of *SOCS3* expression, under a heterologous promoter, in a radiotherapy resistant GBM cell line increased its radiosensitivity, supporting an important implication of *SOCS3* in radiotherapy resistance acquisition. Finally, the treatment with TSA in the most radioresistant established cell line produced an increase in the effect of radiotherapy, that correlated with an increase in the expression of *SOCS3*. These effects of TSA disappeared if the increase in the expression of *SOCS3* prevented with an siRNA against *SOCS3*. Thus, *SOCS3* signal transduction pathway (JAK/STAT) could be useful to unmask new putative targets to improve radiotherapy response in GBM

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignant tumour of the central nervous system (CNS) in the adult population, its incidence being around 2–3 people per 100.000 in USA and Europe. It is considered a very aggressive and lethal tumour, because there is not an effective therapy to date, thereby, being an incurable type of cancer [1,2].

GBM is usually divided in two groups, depending on their origin: primary GBM's which are developed "*de novo*", and low-grade gliomas that become GBM, denominated secondary GBM. Both are histologically identical, but primary GBM has worse prognostic than secondary GBM [3,4].

Recently, the World Human Organization (WHO) has updated the classification of CNS tumours, and has included molecular marks, which enable to identify the gliomas, and also distinguish between primary and secondary GBM. This classification has established *IDH* wildtype GBM and *IDH*-mutant GBM; *IDH*-wildtype GBM has a worse prognosis, with a survival rate around 10 to 15 months, it often has mutations in the *TERT* promoter (76%), and sometimes harbours alterations in *TP53* (27%) and *PTEN* (24%). *IDH*-mutant GBM has a better prognosis and the survival rate is increased to 31 months. In this type of tumours, the mutations of *TERT* promoter are rare (26%) and *TP53* and *PTEN* alterations are also present in a low percentage [5].

The current therapy for GBM includes resection surgery, followed by radio and chemotherapy, frequently given together to obtain a synergistic effect. The radiotherapy treatment consists of five consecutive sessions of 2Gy at a 6Gy/min dose rate per week for six weeks, the total treatment being 60Gy [6]. The most common drug used in chemotherapy in GBM is Temozolomide (TMZ), which is administered concomitant with radiotherapy [7]. Additionally, sometimes, during resection surgery, wafers impregnated with Carmustine (BCNU) are implanted in the environment of the tumour [8].

Despite of these aggressive treatments, the survival rate is only increased in a few months, because GBM has different ways to acquire resistance to chemo and radiotherapy, either activating DNA repair system or producing alterations in the cell cycle and apoptosis regulation [9,10]. Resistance to chemotherapy has been extensively studied, and it is mainly due to *MGMT* (O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase) gene expression. *MGMT* is a protein involved in the DNA repair system, which is able to avoid DNA damage caused by TMZ or BCNU [11,12]. However, there is no much knowledge about the mechanisms related to radiotherapy resistance in GBM, and the basic mechanism of its acquisition remains unclear.

SOCS1 and SOCS3 proteins are members of the Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) family. Both are implicated in the signal regulation of JAK/STAT pathway, which is involved in cell proliferation and apoptosis [13].

Commonly, the constitutive activation of this pathway has been considered a hallmark of several cancers [14,15]. On the other hand, SOCS proteins alterations have been associated to different diseases, including cancer [16]. In this sense, the methylation status of *SOCS3* has been proposed as a malignant prognostic biomarker [17], and the differential expression of *SOCS1* and *SOCS3* in GBM has been studied as putative factors involved in radiotherapy resistance [18]. Likewise, the expression of these genes has been related with radiotherapy response in other types of cancer, such as a gastric or cervix cancer [19,20].

On the other hand, histone deacetylases inhibitors (iHDACs) have been proposed as new anti-cancer agents [21], due to their capability to decrease the tumour progression and to increase the radio and chemosensitivity in different tumour cell lines [22–24]. Moreover, the iHDACs have been related to JAK-STAT pathway and *SOCS1* and *SOCS3* expression [25].

In this study, six human cell lines of *IDH*-wildtype GBM, established from primary cultures of GBM patients, have been obtained and characterized according to the current WHO classification. In addition, they have been tested for their chemo and radiotherapy sensitivity. The results showed that *SOCS1* and *SOCS3* are overexpressed in primary GBM, and also demonstrate a relationship between *SOCS3* expression and radiotherapy resistance acquisition, suggesting the utility of *SOCS3* and its signal transduction pathway as a new source of therapeutic targets.

Materials and methods

Cell culture

GBM primary cell cultures were obtained from brain aspirates of patients who have been diagnosed with GBM. These brain aspirates came from resection surgery of patients older than 18 years old, which had signed the informed consent. The procedures for obtaining the tissue samples were developed in accordance with the national ethical and legal standards, and following the guidelines established in the Declaration of Helsinki (2000). The research project was conducted under the written approval of the Ethic Committee of Clinical Research (CEIC) of the “Hospital General Universitario de Elche (Spain)”, and in collaboration with the Hospital Biobank, which are included in the Valencian Network of Biobanks.

The brain aspirates were centrifuged at 1.000 rpm, 10 min. The pellets obtained were resuspended in 3 volumes of Erythrocyte Lysis buffer (Qiagen), and incubated for 30 min, at 4°C. Then, they were again centrifuged in the same conditions, and the final pellets were resuspended in 10 ml of Dulbecco’s modified Eagle’s medium: Nutrient Mixture F-12 (Gibco) containing 10% Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated (Gibco), and 1% of streptomycin and penicillium mixture (Biowest). This media was denominated completed DMEM F12. These cellular suspensions were sieved using the Sieve tissue grinder kit (Sigma Aldrich).

The sieved solution was centrifuged at 1.000 rpm, 5 min. Then, it was performed an enzymatic digestion with hyaluronidase (4.5 U/ml), and collagenase II (0.09 mg/ml) for 30 min, at 37°C. Finally, cellular suspensions were centrifuged at 1.000 rpm, 5 min and resuspended with complete DMEM F12 media. The cell suspension was placed in a T25 flask and kept into an incubator with a controlled atmosphere (37°C, high humidity and 5% CO₂). Maintenance of cell cultures consisted in regular passes, and media replacement until they reach a growth rate similar to cell lines.

Immunocytochemistry of GFAP, SOCS1 and SOCS3

Cells were plated in a 24 well plates at a density of 75.000 cells per well, and kept for 24 hours into an incubator with controlled atmosphere. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Gibco) during 10 min, and they were permeabilized using 0.2% TRITON X-100 in DPBS for 10 min. In order to avoid unspecific unions blocking was carried out with a solution of 1% Bovine Serum Albumin in DPBS for 1 hour. At that point, cells were incubated with antibodies: anti-GFAP (AB5804, Millipore), anti-SOCS1 (ab9870, Abcam), or anti-SOCS3 (ab6030, Abcam) into a humidify chamber overnight, at 4°C. Primary antibodies were used to a 1/250 dilution. Next day, cells were incubated with a secondary antibody (Molecular Probes) used to a 1/1.000 dilution, and with DAPI for 2 hours, at room temperature. In parallel, the same protocol was performed for negative controls, but in this case, these cells were incubated only with the secondary antibody, without primary antibody. The immunostained cells were visualized by a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems).

Immunocytochemistry of P53 and PTEN

Cell lines were fixed using neutral formalin and included into paraffin to build TMA (Tissue Microarrays) sections. Then, sections were deparaffined, rehydrated and incubated with primary antibodies anti-P53 (DO-7, Dako) or anti-PTEN (6H2.1, Dako). Subsequently, the immunocytochemistry assay was performed with streptavidin-biotin technique, using the Immunostainer Techmate 500 (Dako), and the results were visualized by Envision System (DakoCytomation).

Isolation of nucleic acids

DNA isolation was performed from frozen dry pellets of each cell line, using the DNAeasy

Blood & Tissue kit (Qiagen). To carry out the ARN isolation, cells were stored in RNAeasy Lysis Buffer (Qiagen) plus 1% β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich), then the kit RNAeasy Plus (Qiagen) was used to isolate RNA, according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Protein extracts were obtained and Western blot analysis was performed following protocols previously describe [26]. For this analysis, 100 µg of proteins per lane were resolved on 5–20% polyacrylamide-gradient gels. SOCS3 protein was detected using a 1:500 dilution of the same antibody used in the immunocytochemistry studies mentioned above (ab6030, Abcam). GAPDH, was detected using a 1:5.000 dilution of a specific antibody against to this protein (60004-1-IG. Proteintech). The secondary antibody used was a 1:10.000 dilution of a peroxidase-conjugated anti-immunoglobulin (anti-IgG). For this study, three protein extracts pool from non-tumoral tissue (P1234051, BioChain; NB820-59177, Novus Biologicals; 635318, Takara) were used as a control.

Molecular characterization of IDH1, IDH2 and TERT

The single nucleotide polymorphism of *IDH1*, *IDH2* and *TERT* genes were detected by PCR, following the protocol previously described [27,28]. In all cases, PCR was performed using 250 ng of DNA with AmpliTaq Gold 360 Master Mix (ThermoFisher Scientific). PCR products were resolved by capillary electrophoresis in the ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Electropherograms were analysed by Sequencing Analysis V 5.4 Software (Applied Biosystem).

Methylation status of MGMT

The methylation status of *MGMT* promotor in the cell lines was performed using SALSA MS-MLPA ME011.B1 Mismatch Repair Genes kit (MRC-Holland) according to the protocol provided by the manufacturer. The quantity of DNA used was 200 ng, the PCR products were resolved in ABI-PRISM 3500 Genetic analyser (Applied Biosystem). The data from the electrophoretic separation were analysed using GeneScan Software (Applied Biosystems), and Microsoft Excel spreadsheet templates provided by the manufacture. To determine the methylation status, the criteria proposed by Jeuken *et al* [29] have been used.

Expression studies

Retrotranscription of RNA to cDNA was made with 1 µg of RNA, using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher Scientific), according to the protocol provided by manufacturer.

Q-PCR was carried out in 96 wells plates, with a master mix containing 1µl of specific gene assay: *MGMT* (Hs01037698_M1), *SOCS1* (Hs00705164_s1) or *SOCS3* (Hs02330328_s1), 10 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (all of them from ThermoFisher Scientific) and 4 µl of cDNA obtained by retrotranscription. Endogenous control used was *GAPDH-VIC* (ThermoFisher Scientific). As a reference sample, an RNA pool from normal brain (temporal lobe) tissue from 5 human adults was used. (BioChain). For all studies, 3 technical replicates were performed, and negative controls were carried out with water. Q-PCR assays were performed in the 7.300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Chemo and radiotherapy

The drug used for chemotherapy was BCNU. Cells were plated, treated with 50 μ M BCNU for 24 hours and harvested for cellular viabilities studies.

Radiotherapy was performed in the Radiotherapy Oncology Unit of the "Hospital General Universitario de Elche", using a VARIANT 2100C linear accelerator. The dose was 7Gy, with a dose rate of 6Gy/min.

For both assays, cells were plated in 6 well plates and kept into an incubator with controlled atmosphere, for 24 hours. The radio or chemotherapy treatment was supplied, and cells were incubated again in the same conditions for an additional period of 24 hours.

To assess the drug effect, viability studies were performed using the Muse Count & Viability Assay Kit; radiation effect was determined by Muse Cell Cycle Assay Kit (MERK). The results were visualized by a MUSE Cell Analyzer (MERK).

Obtain of clonal radioresistant populations

The GB39 and G242 cell lines were plated in 100 mm cell culture plates. Weekly, they were irradiated with a 5Gy dose until reach an accumulated dose of 45Gy. Only few isolated cells survived to this process. Each isolated cell was recovered using the Cloning cylinders glass (Sigma Aldrich) and plated in a 96 wells plate. When these cells started to proliferate, they were transferred to a 24 wells plate, and then to a 6 wells plates. Finally, clonal radioresistant populations were obtained from the isolated cells.

Small interfering RNA assay

SOCS1 and SOCS3 expression inhibition was carried out by transfection with specific small interfering RNA (siRNA). The transfection was made with specific siRNA of SOCS1 (siRNA. SOCS1, Invitrogen) and SOCS3 (siRNA.SOCS3, Invitrogen) to a 10 μ M concentration, mixed with 5 μ l of Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) diluted in OPTI-MEN (Gibco). As a negative control, the same solution was used with non-specific siRNA (siRNA.NS, Invitrogen). Transfected cells lines were maintained in this solution plus complete DMEM F12 media without antibiotic for 48 hours at 37°C in a humified 5% CO₂/air atmosphere.

Upregulation of SOCS3 mRNA expression

In order to upregulated SOCS3 expression, we used a synthetic plasmid which had the SOCS3 Open Reading Frame (ORF) and a resistance cassette of Hygromycin under a heterologous promoter provided by Sinobiological (HG11315-UT). Transfection with a control plasmid was also performed to assess whether the transfection has an intrinsic effect. Cells were transfected with 15 ng or 25 ng of the plasmid using Lipofectamine 2.000 (Invitrogen) diluted in OPTI-MEN (Gibco) and grown in culture media plus Hygromycin to select only the transfected cells.

Then, the culture was divided into 3 aliquots, one for the *SOCS3* expression studies, and the other two for cell cycle distribution studies one of them was irradiated, while the other was not. To induce the increase in the expression of the endogenous levels of *SOCS3*, the cells were pre-treated for 16 h with different doses of TSA (25–200 nM) before proceeding to irradiation.

Statistical analysis

Mean and SD values were calculated for *SOCS1* and *SOCS3* expression and cell cycle distribution data. Normal distribution of the data was tested by Shapiro-Wilk test and homoscedasticity was tested by Levene Test. Data from cell cycle distribution and percentages of SubG1/ G2M showed a non-normal distribution. Data from expression studies showed a normal distribution, and homogeneity of variances. Parametric and non-parametric comparison test were used as required.

To paired comparisons between irradiated and non-irradiated phases of cell cycle, and between the percentages of SubG1/G2M of irradiated and non-irradiated cells Mann Whitney test was performed.

In the expression analysis, the followed criteria to consider alterations of expression were the proposed by Schmittgen & colls [30]. They established that the alterations in expression are significative when the RQ value is over 2, or under 0.5, corresponding to FC +/- 2 values respectively. In the figures, the expression changes are indicated by a diamond. In order to test the significance level of the expression changes, T- student test was performed.

P-Values <0.05 were considered to be statistically significant. The software used to carry out the statistical analysis was SPSS 24.0 (IBM Software).

Results

Generation of six new human cell lines of GBM

Fifty-two brain aspirates were collected during this study. All of them were diagnosed as GBM by the Anatomy Pathology Unit. The brain aspirates were processed, and primary cultures were established from them. RNA, DNA and cryopreserved cells were obtained systematically from different passages. Finally, six of these primary cultures which had a quickly and stable growth rate and kept their molecular features, were selected for this study. The behaviour of these six primary cultures was similar to those of a cell line. These new cell lines were named HGUE ("Hospital General Universitario de Elche")-GB (Glioblastoma)-number of culture, for example: HGUE-GB-16. However, for this article they have been named GB+number of culture; for example, GB16, to facilitate easy understanding of Figures and Figures legends.

To confirm whether these six new cell lines had preserved their glial origin, immunocytochemistry assays were performed to detect the expression of glial fibrillar acidic protein (GFAP), since this protein is considered a glial marker, and particularly of astrocytes [31]. Immunolabeling analysis of these cell lines was carried out using a specific antibody antiGFAP, and subsequently, stained cells were visualized by confocal microscopy. All cell lines studied showed a positive immunoreactivity against GFAP antigen (Fig 1), and it was confirmed that all established cell lines had preserved their glial origin.

The GBM cell lines established belonged to IDH-wildtype GBM

These new GBM cell lines were classified according to the guidelines proposed by WHO in their 2016 CNS tumours classification [5], the “Hotspot” mutation region sequences of *IDH1*, *IDH2* and *TERT* were determined by Sanger sequencing, and the electropherograms obtained were studied to detect the described mutations: in *IDH1* R132, in *IDH2* R172, and the C225T

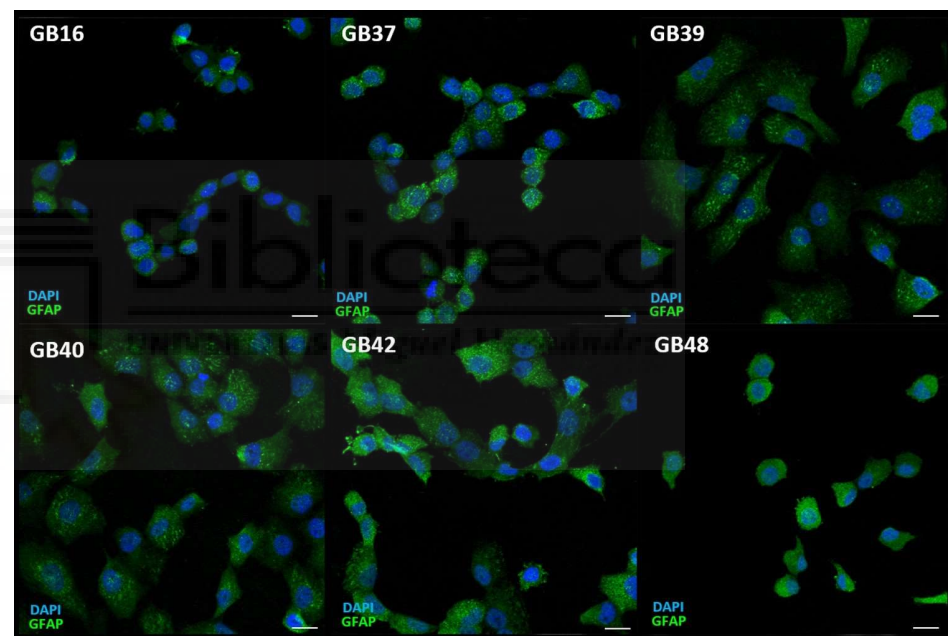


Fig 1. Immunodetection of astrocyte marker (GFAP) in GBM cell lines. Images corresponding to immunolabeling of GFAP (green) in GBM cell lines. Nuclei stained with DAPI are shown in blue. Each bar equals 20 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g001>

or C250T *TERT* promoter region [28,32]. No mutations of *IDH1* or *IDH2* were found in the six GBM cell lines (Fig 2A, 2F, 2K, 2P, 2U, 2AA, 2B, 2G, 2L, 2Q, 2W and 2AB, respectively). However, all of them harbour a C250T mutation in the *TERT* promoter (Fig 2C, 2H, 2M, 2R, 2X and 2AC). The GB16 cell line showed this mutation in heterozygosis.

P53 modifications were also analysed by immunocytochemistry, and all established GBM cell lines had alterations in this protein, showed by P53 staining in their nuclei ([Fig 2D](#), [2I](#), [2N](#), [2S](#), [2Y](#) and [2AD](#)). Nevertheless, the cell lines showed positive immunoreactivity to PTEN antigen ([Fig 2E](#), [2J](#), [2O](#), [2T](#), [2Z](#) and [2AE](#)), indicating that *PTEN* expression was conserved. These results confirm that the established human cell lines are *IDH*-wildtype GBM.

Methylation status of MGMT promoter, expression of MGMT mRNA and chemotherapy response

The methylation status of the *MGMT* promoter and its expression have been established as a prognostic and response marker in GBM [33], so both features were determined in these GBM cell lines. Methylation status was studied by MS-MLPA, and the results showed that all the cell lines had methylated the *MGMT* promoter, except the GB16 cell line, which had unmethylated all its CpG islands ([S1 Fig](#)). Furthermore, the expression of *MGMT* was studied by Q-PCR to associate the methylation status with its expression level. As expected, only the GB16 cell line showed expression of *MGMT* mRNA by Q-PCR, taking into consideration the *MGMT* promoter methylation status. GB16 also exhibited overexpression of *MGMT* mRNA, compared to RNA pool from non-tumoral brain tissue (Fold Change (FC) = 1.7 ± 0.15).

Finally, we characterized the response of these GBM cell lines to BCNU, a drug used in chemotherapy. The most chemosensitive cell line was GB42, as BCNU induced a $49.9\% \pm 3.7$ cell death, followed by the cell lines GB39, GB40 and GB48, which were slightly affected, their viability being reduced by $25.2\% \pm 1.8$, $19.5\% \pm 1.1$ and $27.9\% \pm 2.1$, respectively. The higher rate

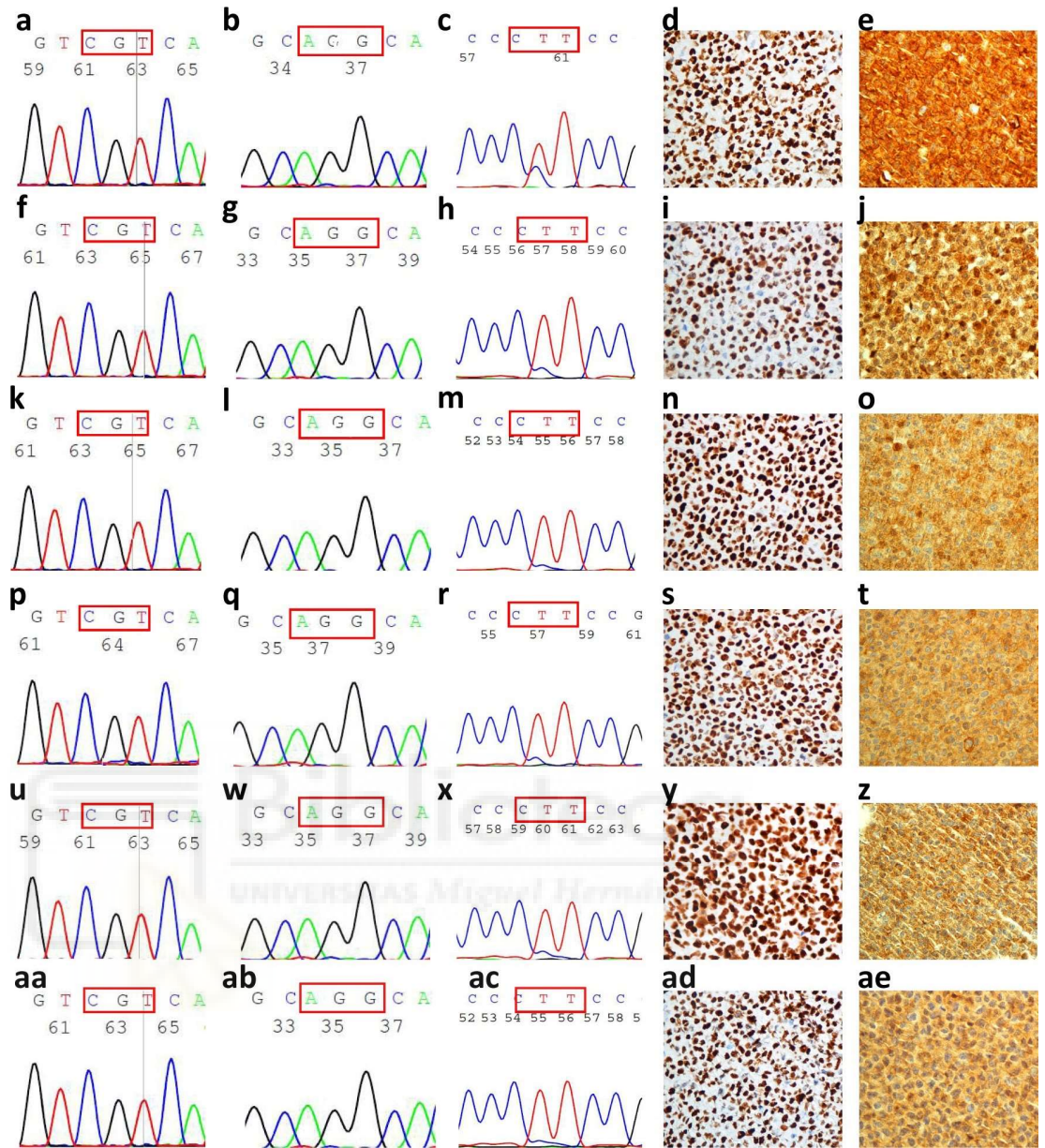


Fig 2. Molecular features of established GBM cell lines. Electropherograms of *IDH1* (a, f, k, p, u, aa), *IDH2* (b, g, l, q, w, ab), and *TERT* (c, h, m, r, x, ac), and immunocytochemistry images of P53 (d, i, n, s, y, ad) and PTEN (e, j, o, t, z, ae) of all cell lines are shown. The first line corresponds to GB16, the second line to GB37, the third line to GB39, the fourth line to GB40, the fifth line to GB42 and the sixth line to GB48. Red rectangles show the codon which harbours the mutation. The images were made to 40.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g002>

of survival was achieved by GB16, as only the $12.6\% \pm 2.3$ of its cells were affected by BCNU, so it was considered a GBM resistant cell line to chemotherapy (S2 Fig).

Response to radiotherapy in primary GBM cell lines

To evaluate the radiotherapy effect, the cell lines were irradiated to a 7Gy dose (6Gy/min rate). Then, 24 hours after treatment, the cell cycle distribution of different cells (control and

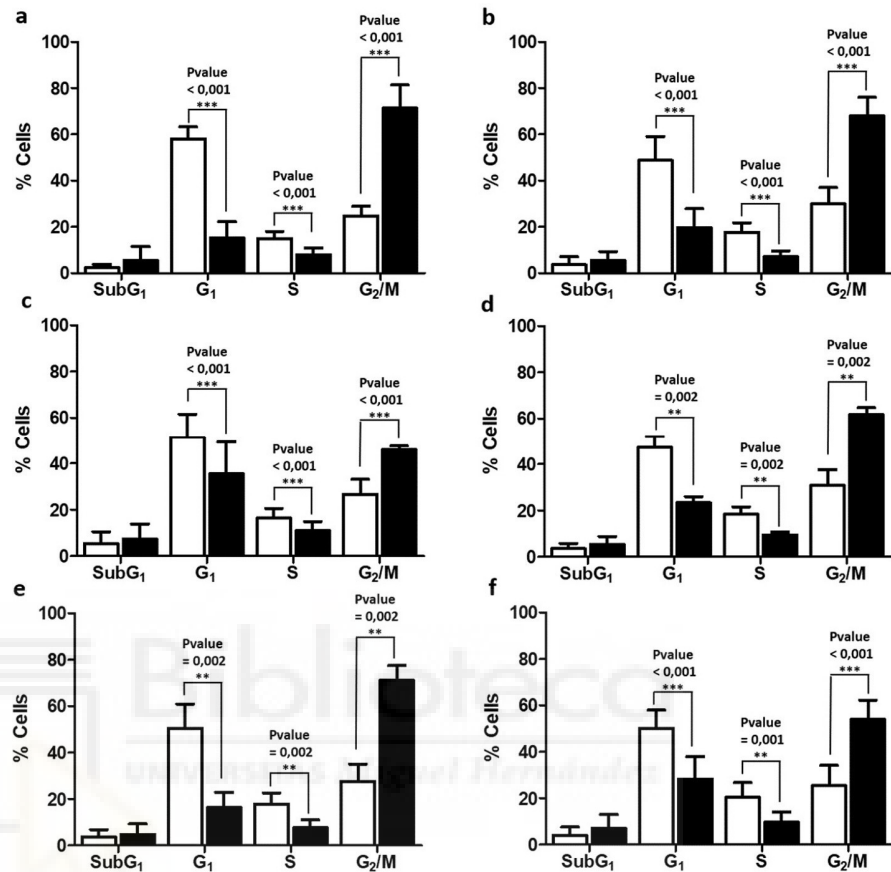


Fig 3. Cell cycle distribution of GB16 (a), GB 37 (b), GB39 (c), GB40 (d), GB 42 (e) and GB48 (f). The percentage of cells in each phase of the cell cycle is represented as the average of several experiments (mean ± SD), with the Pvalue obtained from the non-parametric Mann the Whitney Test (n10) superimposed (P-value < 0.01, Pvalue < 0.001). White bars represented control cells, and black bars irradiated cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g003>

irradiated) were compared to determine the response to radiotherapy. Significant changes in the G₁, S and G₂/M phases were detected on each cell line due to irradiation. G₁ and S phases were reduced, and G₂/M was increased, while SubG₁ did not show any significant changes (Fig 3), suggesting that the first effect of radiotherapy is to arrest cell cycle in the G₂/M phase of the cell cycle, in GBM cell lines. To determine the fate of cells blocked in phase G₂/M, viability studies were performed 72h after irradiation. The results showed an increase in the percentage of dead cells similar to the percentage of cells blocked in phase G₂/M, 24h after irradiation, suggesting that the initially blocked cells end up dying later on (S3 Fig).

From the data showed above, the effect of radiotherapy was calculated as the increase of arrested cells in the G₂/M phase, due to irradiation, plus the increase of cells in SubG₁, since this phase is associated to cell death (Δ (SubG₁ + G₂/M)_{IR-CTR}). Any cell line reached a radiotherapy response higher than 50%, the most affected being the GB42 cell line (49.8% ± 1.2 affected cells), and the most radioresistant being the GB39 cell line (21.2% ± 1.6 affected cells).

The rest of cell lines showed middle percentages of response.

The radiosensitivity of cell lines was also tested after grew up the cells in serum-free media, and the value of (Δ (SubG₁ + G₂/M)_{IR-CTR}) for each cell line was similar to the percentages indicated above for the same cell line growing with 10% fetal bovine serum ([S4 Fig](#)).

SOCS1 and SOCS3 expression in primary GBM

To study the expression profile of *SOCS1* and *SOCS3* in GBM cell lines, RNA from the cell lines in basal state (confluence level 75%, adequate quantity of nutrients and controlled atmosphere) was isolated. Then, a retrotranscription and Q-PCR assay were carried out. FC values were calculated to evaluate the expression differences between GBM and non-tumoral brain tissue.

The GBM cell lines overexpressed *SOCS1* and *SOCS3*, when compared to an RNA pool from non-tumoral brain tissue. The *SOCS1* expression was between 2 and 5 times higher, and the *SOCS3* expression increased in GBM cell lines between 3 and 4.5 times ([S5A Fig](#)).

Furthermore, a Western blott analysis was carried out to confirm the overexpression of *SOCS3* in the GBM cell lines. In this case, total protein extracts from the cell lines were obtained, and then a Western blotting was performed using antibodies to *SOCS3* and GAPDH (as endogenous control). All cell lines overexpressed *SOCS3* when compared to a protein pool from non-tumoral brain tissue ([S5B Fig](#)).

Immunocytochemistry studies of SOCS1 and SOCS3 proteins

To confirm the expression data of *SOCS1* and *SOCS3* obtained by Q-PCR, immunocytochemistry assays to detect the presence of *SOCS1* and *SOCS3* proteins were performed in GBM cell lines. Double immunolabeling was carried out using anti-*SOCS1* and anti-*SOCS3* antibodies. The six GBM cell lines showed positive immunostaining for both proteins, which indicates that mRNA expression was correlated with protein presence. *SOCS1* and *SOCS3* proteins appeared in the cytoplasm, without apparently association to any organelle and no presence in the nuclei. The double immunolabeling did not show colocalization of these proteins in the cytoplasm ([Fig 4](#)).

Effect of the radiotherapy exposure on the SOCS1 and SOCS3 expression at mRNA level

In order to study the effect of radiotherapy on *SOCS1* and *SOCS3* mRNA expression, GBM cell lines were exposed to 7Gy, and 24 hours after irradiation cells were harvested, and total RNA was isolated. In parallel, control non-irradiated cells were collected to be used as an expression control. No significant changes were observed in *SOCS1* and *SOCS3* mRNA levels after irradiation ([Fig 5A](#)).

To determine whether *SOCS1* and *SOCS3* mRNA expression was significantly affected after exposure to radiotherapy, time-course and dose-response experiments were performed. In this case, the study was carried out in the most radioresistant cell line (GB39), and in the most radiosensitive one (GB42). Non-treated cell lines were used as expression control, and RQ values were calculated from them. Changes in *SOCS1* and *SOCS3* mRNA expression were not detected in GB39 nor GB42 at different times ([Fig 5B](#)). Moreover, changes on *SOCS1* and *SOCS3* expression were undetected in dose-response experiments ([Fig 5C](#)), with the only exception of the GB39 cell line, where its expression was reduced by half, in comparison with the control ($RQ = 0.5 \pm 0.03$) at the highest radiotherapy dose.

Reduction of SOCS1 and SOCS3 mRNA expression by small interfering RNA (siRNA) and its effect on radiotherapy resistance

To determine whether *SOCS1* and/or *SOCS3* play a role in GBM radioresistance, *SOCS1* and *SOCS3* expression was inhibited using siRNA. First, we studied that transfection with non-specific siRNA (siRNA.NS) did not alter *SOCS1* and *SOCS3* expression, nor cell cycle

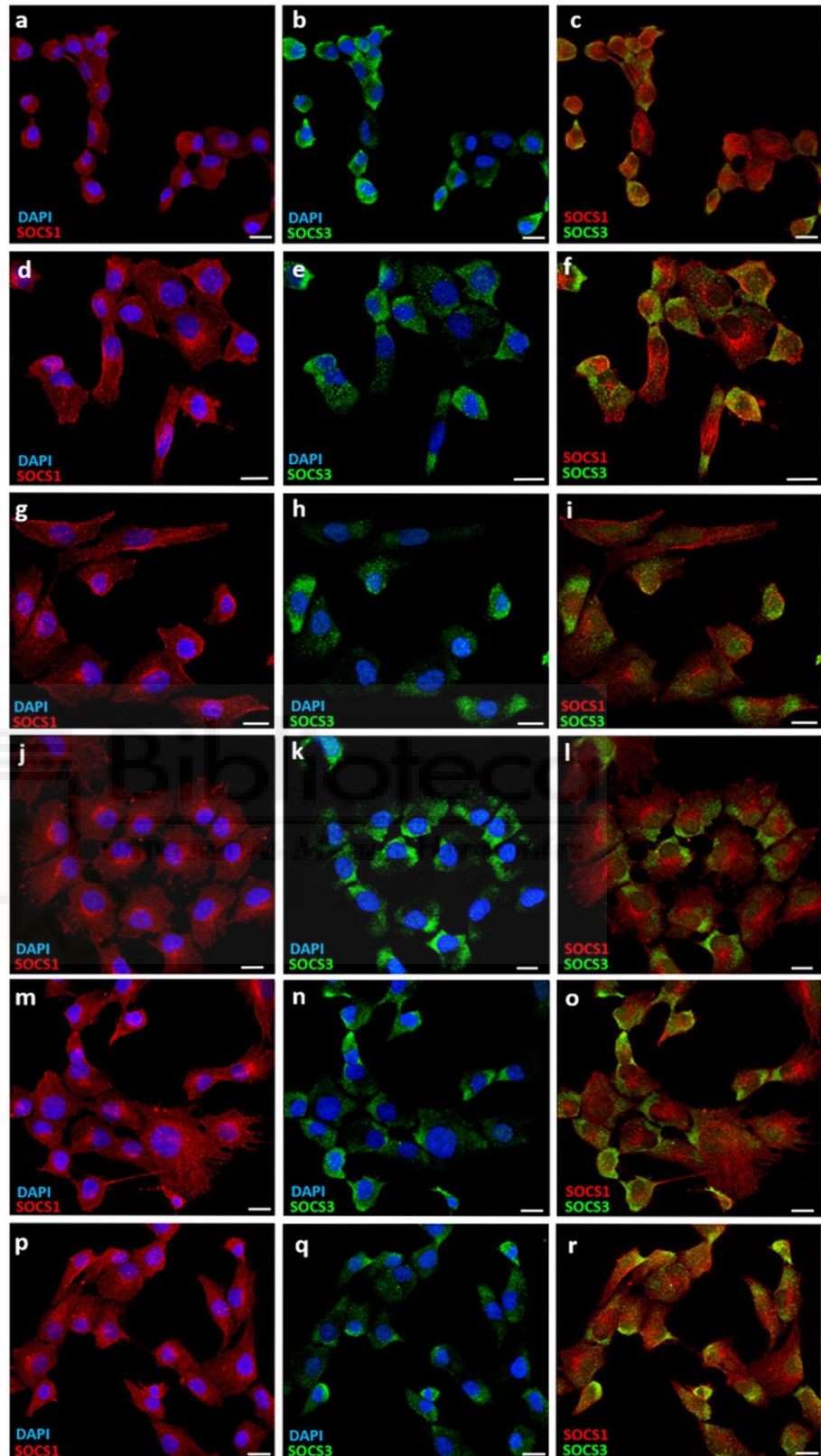


Fig 4. Immunolocalization of SOCS1 and SOCS3 in GBM cell lines. Images show immunolabeling of SOCS1 (red) and SOCS3 (green) of GBM cell lines: GB16 (a, b, c), GB37 (d, e, f), GB39 (g, h, i), GB40 (j, k, l), GB42 (m, n, o), GB48 (p, q, r). Nuclei stained with DAPI are shown in blue. Each bar equals 20 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g004>

distribution. The results did not show significant differences between control and siRNA.NS transfected cells in any cases (S6 Fig).

Subsequently, parallel assays of expression pre-irradiation and cell cycle post-irradiation were carried out. In this case, we compared the mRNA expression between siRNA.NS transfected cells and siRNA.SOCS1 or siRNA.SOCS3 transfected cells, which demonstrated that expression of *SOCS1* and *SOCS3* was significantly reduced. Cell cycle distribution was also studied in each sample (siRNA.NS, siSOCS1, siSOCS3) in order to evaluate the effect of radiotherapy (Fig 6).

The mRNA expression of *SOCS1* was reduced by 70% in siRNA.SOCS1 transfected cells when compared to siRNA.NS (Fig 6A). However, the effect of irradiation was the same on siRNA.NS and siRNA.SOCS1 cells (Fig 6B and 6C). Therefore, the radiotherapy response was not affected by *SOCS1* expression reduction.

The expression of *SOCS3* was reduced by 73% in siRNA.SOCS3 transfected cells (Fig 6D). Furthermore, the irradiation caused a significant differential effect in siRNA.NS and siRNA. SOCS3 transfected cells (Pvalue < 0.001). The siRNA.SOCS3 transfected cells were more radioresistant than the cells transfected with siRNA.NS, since their percentage of cells in the SubG₁ and G₂/M phases post-irradiation was smaller than the number of cells in these phases in the siRNA.NS transfected cells (Fig 6E and 6F). These data reveal that *SOCS3* expression inhibition provides resistance to radiotherapy in GBM cell lines.

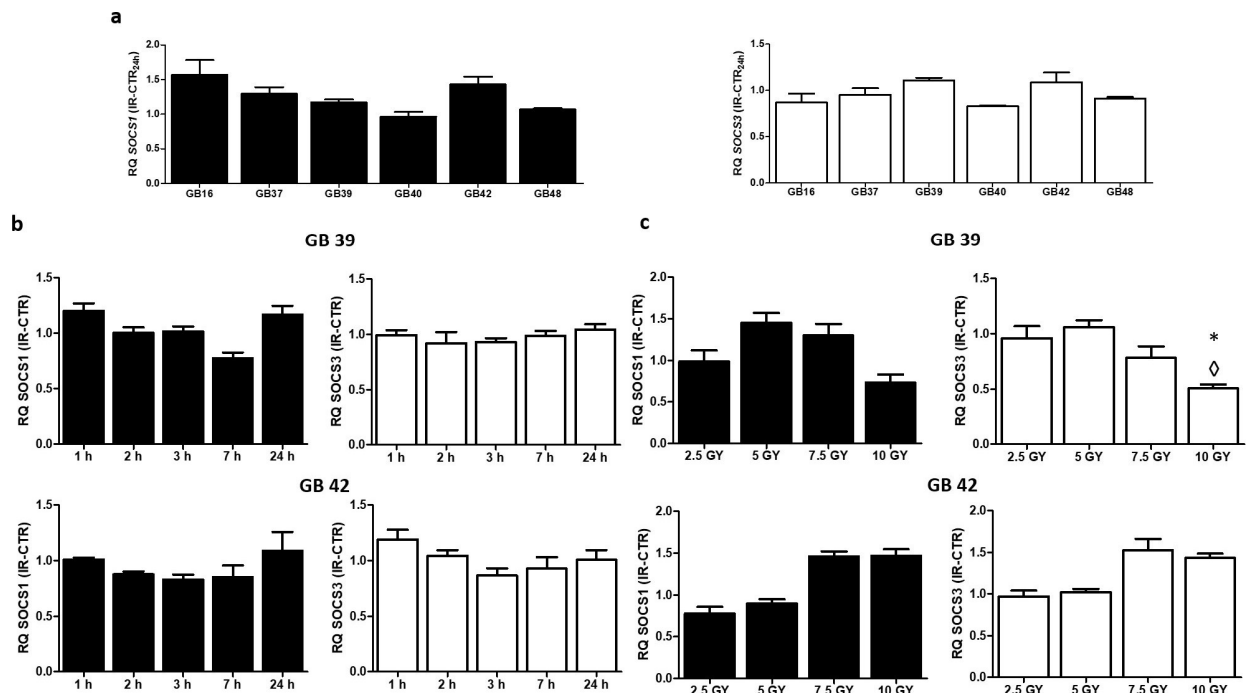


Fig 5. Expression of *SOCS1* and *SOCS3* after radiotherapy in GBM cell lines. Values of RQ ± SD 24 hours post-irradiation of *SOCS1* and *SOCS3* in all cell lines (a), and values of RQ ± SD obtained by time course (b) and dose-response (c) studies in GB 39 and in GB42. Black bars correspond to *SOCS1* RQ values, and white bars to *SOCS3* RQ values. ^ means changes in expression. Indicate a P-value < 0.05 (n3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g005>

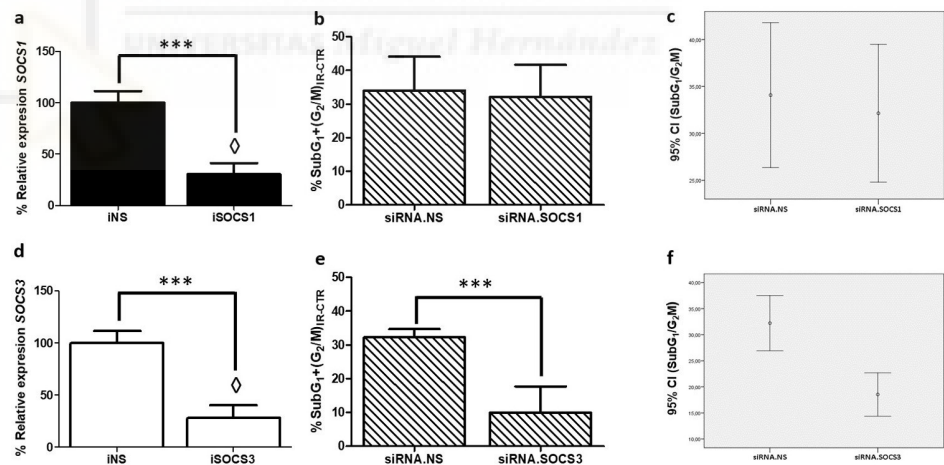


Fig 6. *SOCS1* and *SOCS3* interfering assay and its biological effect on radiotherapy response. Mean ± SD of relative mRNA expression of *SOCS1* (a) and *SOCS3* (d) in siRNA.NS, siRNA.SOCS1 and siRNA.SOCS3 transfected cells. Mean Percentage of arrested cells in SubG₁ and G₂/M phases due to radiotherapy in siRNA.NS and siRNA.SOCS1 (b), and in siRNA.NS and siRNA.SOCS3 (e). Representation of 95% confidence interval of radiotherapy response in siRNA.NS and siRNA.SOCS1 (c), and in siRNA.NS and siRNA.SOCS3 transfected cells (f). ^ means changes in expression. Indicate P-value < 0.001 (n3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g006>

SOCS1 and SOCS3 mRNA expression in clonal radioresistant populations

Clonal radioresistant populations were obtained from the most radioresistant cell line (GB39), and from the most radiosensitive cell line (GB42). After an accumulated 45Gy (5Gy/week) dose treatment, 10 clonal survival populations were isolated from GB39, and 6 from GB42.

Finally, 6 clonal survival populations from GB39, and 1 from GB42 were obtained.

As expected, cell cycle analysis showed that the isolated clonal populations were more radioresistant than their parental cell line ([Fig 7A and 7D](#)). The expression of *SOCS1* and *SOCS3* at mRNA level was determined in all of them. While the expression of *SOCS1* was unmodified ([Fig 7B and 7E](#)), the expression of *SOCS3* was significantly lower in all clonal

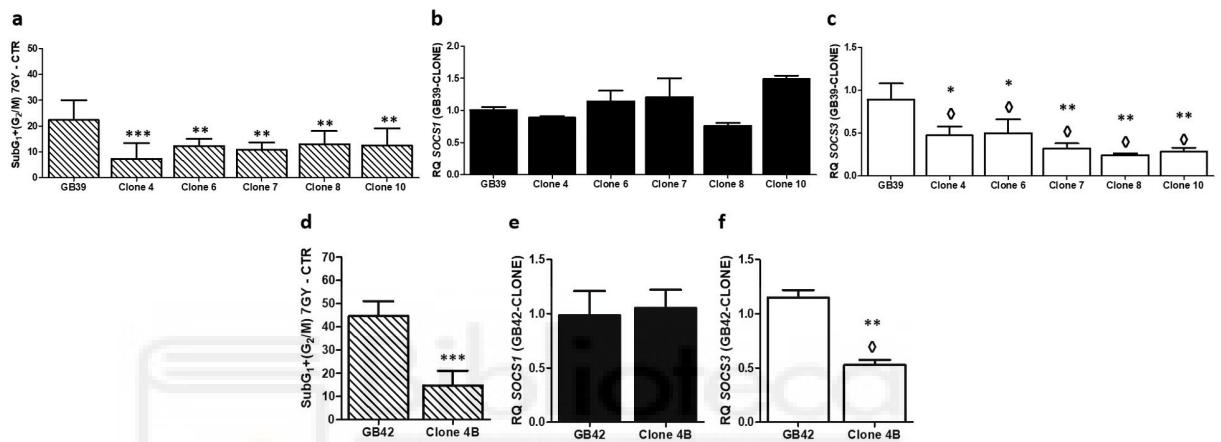


Fig 7. Cell cycle analysis, and *SOCS1* and *SOCS3* expression on the clonal isolated resistant populations and parental cell lines. Data are presented as the mean percentage \pm SD of arrested cells in SubG₁ and G₂/M phase due to radiotherapy, arrested (**a,d**). Mean \pm SD of *SOCS1* mRNA expression (**b, e**) and *SOCS3* (**c, f**) in parental cell lines and clonal populations. ^ means changes in expression. Indicate P-value < 0.05, Indicate P-value < 0.01, and indicate P-value < 0.001 (n3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g007>

radioresistant populations in contrast to their parental cell lines ([Fig 7C and 7D](#)). These results reinforce the data obtained by siRNA.

Induction of SOCS3 expression and its role in the radiotherapy response

Induction of *SOCS3* expression by a heterologous promoter. The study of radiotherapy sensitization was performed in the most radioresistant GBM cell line (GB39). In order to achieve the upregulating of *SOCS3*, this cell line was transfected with 15 ng or 25 ng of synthetic plasmid, which contains the *SOCS3* ORF under a heterologous promoter control.

The increase of *SOCS3* mRNA expression was evaluated by Q-PCR, and the data obtained confirmed that cells transfected with 15 ng and 25 ng of *SOCS3* plasmid increased the expression of *SOCS3*, when compared to cells transfected with control plasmid. The cells transfected with 25 ng of plasmid showed four times increase in *SOCS3* mRNA level, and the cells transfected with 15 ng showed three times increase (Fig 8A), which suggest that the amount of plasmid correlates with the increase of gene expression.

In relation to the radiotherapy effect, cells with higher *SOCS3* mRNA expression showed a greater response to irradiation, compared to control cells. The percentage of cells in SubG₁ and G₂/M phases was twice as much in cells transfected with *SOCS3* plasmid than in cells transfected with control plasmid (Fig 8B). Therefore, when *SOCS3* is upregulating the culture showed a better response to radiotherapy.

Induction of endogenous *SOCS3* expression by TSA treatment. Finally, we wondered whether increasing endogenous *SOCS3* expression by an alternative treatment, such as the iHDAC named TSA, will be able to sensitize the most radioresistant established cell line to radiotherapy. To test this hypothesis, the cells were pre-treated for 16 hours with different doses of TSA, in a range from 25–200 nM. Then, the expression of *SOCS3* mRNA was determined just before the irradiation, and the effect of radiotherapy was determined 24 hours after the treatment by cell cycle analysis. The *SOCS3* mRNA expression was increased by TSA treatment in a dose-dependent manner (Fig 9A), and the radiosensitive of GB39 cell line also increased in the same way (Fig 9B).

To demonstrate that the TSA-induced increase in radiosensitivity showed in the radioresistant cell line was due to the increase in *SOCS3* expression, a siRNA experiment blocking *SOCS3* expression was performed, with or without TSA pre-treatment, keeping on this way the *SOCS3* mRNA levels downregulated. In these conditions, the radiosensitization effects of TSA disappeared (Fig 9C and 9D).

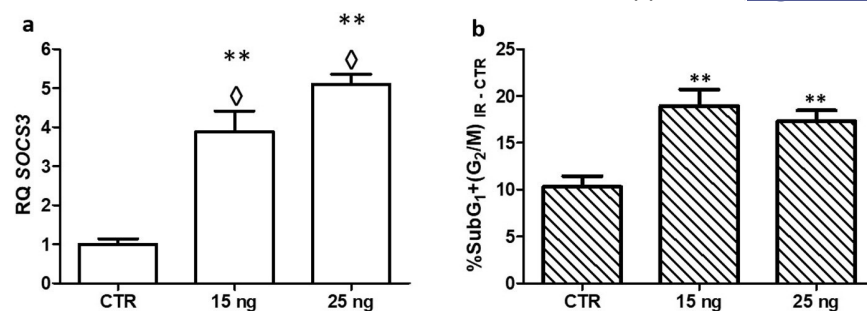


Fig 8. Induction of *SOCS3* expression by a heterologous promoter. Mean ± SD values of relative expression of *SOCS3* (a) and cellular mean percentages of cells in SubG₁ and G₂/M phases (b). CTR: sample transfected with control plasmid, 15ng and 25ng: cells transfected with 15 and 25 ng of *SOCS3* synthetic plasmid, respectively. ^ means changes in expression. Indicate P-value <0.01 (n3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g008>

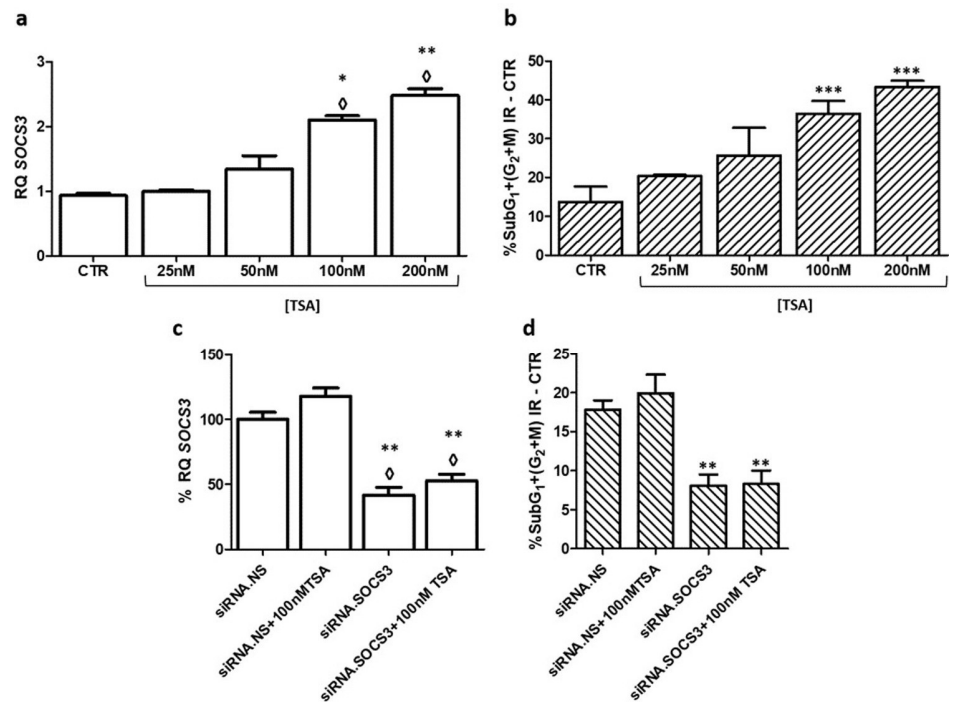


Fig 9. TSA pre-treatment and its effect upon cell cycle and SOCS3 expression. White bars show mean \pm SD of SOCS3 mRNA expression in the different experiments (a,c). Striped bars represent mean percentages \pm SD of cells in SubG₁ and G₂/M phases (b,d). ^ means changes in expression Indicate P-value<0.01, Indicate P-value<0.001 (n3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581.g009>

The effect of TSA was also tested in the most radiosensitivity cell line (GB42) following the same conditions used for GB39. In this case, the endogenous levels of SOCS3 and the percentages of SubG₁+G₂/M remained unchanged for all TSA concentrations tested (S7 Fig).

Discussion

The progression of GBM is fast and difficult to control, due to its chemo and radioresistance. Hence, it is very important to obtain accurate models to study this type of cancer. For that purpose, there are many cell lines which mimic GBM, such as U87MG or LN229 (ATCC collection), but these cell lines are far away from the patient state and they usually have been modified to achieve an immortalized status. The six new human GBM cell lines established in this study resemble more the patient state, because not only they were originated from them but also, they preserve their glial nature and molecular features of the initial tumour and they lack any artificially induced modification. Other advantage of using these cell lines from primary cultures is the possibility to recreate their progression and go back and forth in their development to study gene expression or physiological properties, as DNA, RNA and cryopreserved cells have been stored at different passages.

The molecular studies of these cell lines have confirmed that they were included in the *IDH*-wildtype GBM, which is the most aggressive GBM group, according to 2016 WHO SNC classification. Moreover, they harbour *TERT* mutations in their promoters, and alterations in P53, two characteristics that support the fact that they are indeed primary GBM [5]. To date, the only *IDH*-wildtype GBM well characterized according to WHO are these cell lines, so they can be used as a proper model of primary GBM to study the malignant features of these tumours.

In relation to chemotherapy, all these cell lines showed a middle response to BCNU treatment, reinforcing their classification as primary GBM. The most resistant cell line affected only by 12.6% \pm 2.3, was GB16. Epigenetic results indicated that this cell line has the *MGMT* promoter methylated, and unlike the rest of cell lines, it expresses this gene at the mRNA level. Furthermore, we demonstrated the relationship between *MGMT* promoter methylation status and chemoresistance, which has been postulated in many previous studies [33]. However, the low response obtained by the other cell lines suggest that resistance to alkylating drugs must be regulated by other mechanisms not confirmed as yet, such as the presence of tumour stem cells, capable of resisting treatment and replace dead cells, already described in other types of cancers [34,35].

Moreover, radiotherapy affected the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle, reducing the cellular percentage in the G₁ and S phases, and increasing the percentage of cells in G₂/M phase. Thus, the statistically significant increase of arrested cells in the G₂/M phase was established as a hallmark to determine the radiotherapy effect on these cell lines. According to this value, the GBM cell lines showed a low radiotherapy response, and never reached more than 50%, indicating again that they belong to the worst prognostic group.

SOCS genes have been associated with carcinogenesis and tumour progression [36]. Particularly, *SOCS1* and *SOCS3* have been postulated as candidates to regulate the radio and chemoresistance acquisition in other types of cancer, such as prostate cancer [37,38], or cervix cancer [20], but there is a lack of studies regarding the role of *SOCS1* and *SOCS3* in radiotherapy resistance in GBM. These genes inhibit the cytokine response in many cell types, including CNS, and are involved in the immune response [39]. *SOCS* proteins also modulate the JAK-STAT pathway, which is involved in many cellular processes, such as cell migration, cell proliferation and apoptosis. *SOCS1* and *SOCS3* have three different ways to inhibit the JAK/STAT pathway: first, they can bind directly to JAKs proteins, silencing their activity; second, *SOCS* can bind and block STAT proteins; and finally, they can establish connections with the BC complex and Cullin 5, promoting JAK ubiquitination [14].

SOCS1 and SOCS3 were overexpressed in the six GBM cell lines analysed. This increase in mRNA expression has been previously reported in breast cancer where SOCS family plays a role in tumour proliferation [40]. The expression of these genes remained constant after different doses and radiotherapy periods, yet there are no studies in GBM and other cancers related to expression changes of these genes due to radiotherapy. However, a similar study in sarcoma has identified several genes implicated in chemoresistance [41]. Therefore, it is relevant to perform these studies to elucidate the expression changes involved in radioresistance. On the other hand, the inhibition of SOCS1 expression by a siRNA did not change the radiotherapy response in any of the six cell lines, and the isolated clonal resistant populations did not show any modification in the level of SOCS1 mRNA expression, indicating that SOCS1 is not directly related to radioresistance acquisition in GBM, as it was postulated by Zhou *et al* [18]. The reason for the discrepancy is unknown, but their studies were carried out only in a GBM cell line (U87) and SOCS1 was ectopically expressed, because it was silenced in U87 cells by promoter methylation [18]. Meanwhile, our data have been obtained in six different new established cell lines where the SOCS1 promoter is not methylated. In contrast, the inhibition of SOCS3 expression by siRNA significantly increased radioresistance of the six cell lines studied, and also there was a downregulation of SOCS3 mRNA levels in all the isolated clonal radioresistant populations, suggesting again that SOCS3 plays a key role in GBM radioresistance. Zhou *et al* indicated that the depletion of SOCS3 induced radiosensitivity, though in their study SOCS3 wasn't directly silenced, and radiotherapy response was tested only in U87 cell line which expressed a phosphorylation-deficient DN STAT3 allele [18], and this mutation could affect the whole JAK-STAT pathway. Moreover, our results about SOCS3 are in agreement with previous studies that have hypothesised the relationship between the methylation of the SOCS3 promoter and poor prognosis in GBM [17], and its low expression and worse response in other cancers [19,20]. Furthermore, low levels of SOCS3 could lead to an increase in the JAK/ STAT pathway activation, which would contribute to acquisition of features of tumour invasion and metastasis [15].

To further support the implication of SOCS3 in radioresistance acquisition, SOCS3 expression was induced under a heterologous promoter in the most radioresistant established cell line (GB39). Upregulation of SOCS3 produced radiosensitization in this cell line demonstrating again, that SOCS3 participates in GBM radioresistance. Finally, the endogenous expression of SOCS3 was also upregulated by TSA treatment, and again the most radioresistant cell line showed an increase in its radiosensitivity, in a TSA dose-dependent way. This effect of TSA disappeared when the increase in SOCS3 expression induced by TSA was blocked by SOCS3 siRNA. Previous studies in myeloproliferative neoplasms and colorectal cancer, indicated that TSA treatment increases the SOCS3 expression, and this increase repressed the cell growth in both type of cancers [25,42].

These publications also reveal the increase of *SOCS3* expression was associated to a lower activation of JAK/STAT pathway, reinforcing the key role of *SOCS3* and JAK/STAT pathway in radioresistance acquisition proposed in this work.

The data obtained in this study demonstrate the implication of *SOCS3* expression in radiotherapy resistance acquisition in GBM, so the downregulation of *SOCS3* expression by siRNA increased the radiotherapy resistance in all the cell lines tested. In the same sense, a statistically significant downregulation of *SOCS3* mRNA was observed in all the isolated radioresistant clonal population, when compared with the parental cell line. On the other hand, the induction of *SOCS3* expression under a heterologous promoter in the most resistant established cell line induced its radiosensitization. Finally, the pre-treatment with TSA in the established cell lines produced an increase in *SOCS3* expression levels and a parallel radiosensitization of these cells. Interestingly, the effects of TSA are completely abrogated when the increase in *SOCS3* mRNA produced by this drug is blocked by *SOCS3* siRNA.

Taken together, the results probe that *SOCS3* plays a key role in radioresistance acquisition in GBM, and reveal the possible implication of the JAK/STAT pathway, which is inhibited by SOCS, in response to radiotherapy. These findings show that *SOCS3* and its signal transduction pathway could be considered as a source of putative new targets to overcome GBM radioresistance.

Supporting information

S1 Fig. Methylation status of *MGMT* promoter of GBM cell lines: GB16 (a), GB37 (b), GB39 (c), GB 40 (d), GB42 (e), GB 48 (f). Black bars show control methylated CpG islands. Yellow lines show the threshold to consider a methylated CpG island, following the Jeuken et al [29] criteria. Red arrows, on different colours bars, indicate the CpG islands of *MGMT*. In the abscissa axis, all promoter of genes studied by SALSA MS-MLPA ME011.B1 Mismatch Repair Genes kit are shown. (TIF)

S2 Fig. BCNU effect. Bars show the percentage \pm SD of cell death in each cell line. (TIF)

S3 Fig. Radiotherapy effect 72 hours post-treatment. Bars show the percentage \pm SD of cell death in each cell line. (TIF)

S4 Fig. Radiotherapy effect in cell lines grown in serum-free media. Bars show the effect of radiotherapy as the $(\Delta (\text{SubG}_1 + \text{G}_2/\text{M})_{\text{IR-CTR}}) \pm \text{SD}$. (TIF)

S5 Fig. (a) Expression profile of *SOCS1* and *SOCS3* in primary GBM cell lines. Fold change. (FC) values \pm SD of *SOCS1* mRNA expression (black bars), and *SOCS3* mRNA expression (white bars) are shown for each cell line represented in the X-axis. (b): Western blot analysis of *SOCS3* expression on total protein extracts from established cell lines. The molecular sizes of the bands are shown to the right. (TIF)

S6 Fig. Analysis of siRNA transfection effect by itself. Representation of the 95% confidence interval of % of cells in the SubG₁ and G₂/M phases **(a)** and mRNA expression **(b)** for control (CTR) and transfected with non-specific siRNA (siRNA.NS) cells.

(TIF)

S7 Fig. TSA pre-treatment and its effect upon cell cycle and SOCS3 expression. White bars show mean \pm SD of SOCS3 mRNA expression in the different experiments **(a)**. Striped bars represent mean percentages \pm SD of cells in SubG₁ and G₂/M phases **(b)**. (n3). (TIF)

Acknowledgments

We are grateful to our laboratory members for helpful comments.

Author Contributions

Formal analysis: Victor Manuel Barbera.

Funding acquisition: Pilar Garcia-Morales, Victor Manuel Barbera, Miguel Saceda.

Investigation: Maria Paz Ventero, Maria Fuentes-Baile, Cristina Quereda, Elizabeth PerezValeciano, Cristina Alenda, Pilar Garcia-Morales, Danilo Esposito, Pilar Dorado.

Methodology: Maria Paz Ventero, Cristina Quereda, Cristina Alenda, Danilo Esposito, Pilar Dorado.

Project administration: Miguel Saceda.

Resources: Miguel Saceda.

Supervision: Victor Manuel Barbera, Miguel Saceda.

Validation: Victor Manuel Barbera, Miguel Saceda.

Writing – original draft: Maria Paz Ventero, Victor Manuel Barbera, Miguel Saceda.

Writing – review & editing: Maria Paz Ventero, Victor Manuel Barbera, Miguel Saceda.

References

1. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol.* 2016; 18: v1–v75. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now207> PMID: [28475809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28475809/)
2. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005; 109: 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y> PMID: [15685439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15685439/)
3. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002> PMID: [23209033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209033/)
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007; 114: 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4> PMID: [17618441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17618441/)
5. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. pp. 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1> PMID: [27157931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27157931/)
6. Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med.* EMBO Press; 2014; 6: 1359–70. <https://doi.org/10.15252/emmm.201302627> PMID: [25312641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25312641/)
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 2005; 352: 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330> PMID: [15758009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15758009/)
8. Preusser M, de Ribaupierre S, Woehrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol.* 2011; 70: 9–21. <https://doi.org/10.1002/ana.22425> PMID: [21786296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21786296/)
9. Mirimanoff R-O, Gorlia T, Mason W, Van Den Bent MJ, Kortmann R-D, Fisher B, et al. Radiotherapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: Recursive Partitioning Analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 Phase III Randomized Trial. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 2563–2569. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.5963> PMID: [16735709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16735709/)
10. Mrugala MM, Chamberlain MC. Mechanisms of Disease: temozolomide and glioblastoma—look to the future. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008; 5: 476–486. <https://doi.org/10.1038/ncponc1155> PMID: [18542116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18542116/)
11. Blumenthal DT, Rankin C, Stelzer KJ, Spence AM, Sloan AE, Moore DF, et al. A Phase III study of radiation therapy (RT) and O6-benzylguanine + BCNU versus RT and BCNU alone and methylation status in newly diagnosed glioblastoma and gliosarcoma: Southwest Oncology Group (SWOG) study S0001. *Int J Clin Oncol.* NIH Public Access; 2015; 20: 650–8. <https://doi.org/10.1007/s10147-014-0769-0> PMID: [25407559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25407559/)
12. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. Alonso MM, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2015; 10: e0140131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131> PMID: [26447477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26447477/)
13. Trengove MC, Ward AC. SOCS proteins in development and disease. *Am J Clin Exp Immunol.* e-Century Publishing Corporation; 2013; 2: 1–29. PMID: [23885323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23885323/)
14. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004; 117: 1281–1283. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963> PMID: [15020666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15020666/)
15. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2015; 113: 365–71. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.233> PMID: [26151455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151455/)
16. Sasi W, Sharma AK, Mokbel K. The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Mol Biol Int.* Hindawi Limited; 2014; 2014: 630797. <https://doi.org/10.1155/2014/630797> PMID: [24757565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24757565/)

17. Martini M, Pallini R, Luongo G, Cenci T, Lucantoni C, Larocca LM. Prognostic relevance of SOCS3 hypermethylation in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Cancer*. Wiley-Blackwell; 2008; 123: 2955–2960. <https://doi.org/10.1002/ijc.23805> PMID: [18770864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18770864/)
18. Zhou H, Miki R, Eeva M, Fike FM, Seligson D, Yang L, et al. Reciprocal Regulation of SOCS 1 and SOCS3 Enhances Resistance to Ionizing Radiation in Glioblastoma Multiforme. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2344–2353. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2303> PMID: [17438093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17438093/)
19. Li G, Xu J, Wang Z, Yuan Y, Li Y, Cai S, et al. Low expression of SOCS-1 and SOCS-3 is a poor prognostic indicator for gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015; 141: 443–452. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1838-5> PMID: [25261987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25261987/)
20. Kim M-H, Kim M-S, Kim W, Kang MA, Cacalano NA, Kang S-B, et al. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Genes Are Silenced by DNA Hypermethylation and Histone Deacetylation and Regulate Response to Radiotherapy in Cervical Cancer Cells. Scott RJ, editor. *PLoS One*. 2015; 10: e0123133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123133> PMID: [25849377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25849377/)
21. Cappellacci L, Perinelli DR, Maggi F, Grifantini M, Petrelli R. Recent Progress in Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents. *Curr Med Chem*. 2018; 25. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181016163110> PMID: [30332940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30332940/)
22. Festuccia C, Mancini A, Colapietro A, Gravina GL, Vitale F, Marampon F, et al. The first-in-class alkylating deacetylase inhibitor molecule tinostamustine shows antitumor effects and is synergistic with radiotherapy in preclinical models of glioblastoma. *J Hematol Oncol*. 2018; 11: 32. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0576-6> PMID: [29486795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29486795/)
23. Minegaki T, Suzuki A, Mori M, Tsuji S, Yamamoto S, Watanabe A, et al. Histone deacetylase inhibitors sensitize 5-fluorouracil-resistant MDA-MB-468 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncol Lett*. 2018; <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9388> PMID: [30333885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30333885/)
24. Rivera S, Leteur C, Me'gnin F, Law F, Martins I, Kloos I, et al. Time dependent modulation of tumor radiosensitivity by a pan HDAC inhibitor: abexinostat. *Oncotarget*. 2017; 8: 56210–56227. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14813> PMID: [28915585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28915585/)
25. Xiong H, Du W, Zhang Y-J, Hong J, Su W-Y, Tang J-T, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses JAK2/STAT3 signaling via inducing the promoter-associated histone acetylation of SOCS1 and SOCS3 in human colorectal cancer cells. *Mol Carcinog*. 2012; 51: 174–184. <https://doi.org/10.1002/mc.20777> PMID: [21520296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21520296/)
26. Carrasco-Garcia E, Martinez-Lacaci I, Mayor-Lo'pez L, Tristante E, Carballo-Santana M, Garcí'a-Morales P, et al. PDGFR and IGF-1R Inhibitors Induce a G2/M Arrest and Subsequent Cell Death in Human Glioblastoma Cell Lines. *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018; 7: 131. <https://doi.org/10.3390/cells7090131> PMID: [30200644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30200644/)
27. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJB, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2010; 16: 1597–604. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2902> PMID: [20160062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20160062/)
28. Wang K, Liu T, Ge N, Liu L, Yuan X, Liu J, et al. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in upper tract urothelial carcinomas and serve as urinary biomarkers detected by a sensitive castPCR. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC; 2014; 5: 12428–39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2660> PMID: [25474136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25474136/)
29. Jeuken JWM, Cornelissen SJB, Vriezen M, Dekkers MMG, Errami A, Sijben A, et al. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest*. 2007; 87: 1055–1065. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700664> PMID: [17700563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17700563/)
30. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008; 3: 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73> PMID: [18546601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18546601/)

31. Goyal R, Mathur SK, Gupta S, Goyal R, Kumar S, Batra A, et al. Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system. *J Neurosci Rural Pract.* Wolters Kluwer—Medknow Publications; 2015; 6: 499–503. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.168426> PMID: [26752892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26752892/)
32. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* NIH Public Access; 2009; 360: 765–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710> PMID: [19228619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19228619/)
33. Chen Y, Hu F, Zhou Y, Chen W, Shao H, Zhang Y. MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma Prognosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res.* Elsevier; 2013; 44: 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.04.004> PMID: [23608672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23608672/)
34. Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells—much more complex than expected. *Mol Cancer.* BioMed Central; 2011; 10: 128. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10128> PMID: [21988793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21988793/)
35. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133 + cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* BioMed Central; 2006; 5: 67. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-67> PMID: [17140455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17140455/)
36. Culig Z. Suppressors of cytokine signalling-3 and -1 in human carcinogenesis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013; 5: 277–283.
37. Handle F, Erb HHH, Luef B, Hoefler J, Dietrich D, Parson W, et al. Signal Transduction SOCS3 Modulates the Response to Enzalutamide and Is Regulated by Androgen Receptor Signaling and CpG Methylation in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 2016; 14 (6): 574–584. <https://doi.org/10.1158/15417786.MCR-15-0495> PMID: [27053681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27053681/)
38. Chevrier M, Bobbala D, Villalobos-Hernandez A, Gulam Musawwir Khan M, Ramanathan S, Saucier C, et al. Expression of SOCS1 and the downstream targets of its putative tumor suppressor functions in prostate cancer. *BMC Cancer.* 2018; 17: 157. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3141-8> PMID: [28235401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28235401/)
39. Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol.* NIH Public Access; 2009; 30: 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.001> PMID: [19643666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19643666/)
40. Evans MK, Yu C-R, Lohani A, Mahdi RM, Liu X, Trzeciak AR, et al. Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals. *Oncogene.* 2007; 26: 1941–1948. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209993> PMID: [17001312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17001312/)
41. Horbach L, Sinigaglia M, Da Silva CA, Olguins DB, Gregianin LJ, Brunetto AL, et al. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in Ewing sarcoma cells. *Mol Clin Oncol.* Spandidos Publications; 2018; 8: 719–724. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1608> PMID: [29844902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29844902/)
42. Gao S, Chen C, Wang L, Hong L, Wu J, Dong P, et al. Histone deacetylases inhibitor sodium butyrate inhibits JAK2/STAT signaling through upregulation of SOCS1 and SOCS3 mediated by HDAC8 inhibition in myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol.* 2013; 41: 261–270.e4. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.10.012> PMID: [23111066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23111066/)



Elche, 2019