

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2020-2021

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**ESTUDIO DEL PAPEL DE *IFITM1* Y OTROS
GENES REGULADOS POR INTERFERÓN EN LA
RESISTENCIA A FÁRMACOS EN TUMORES**

Autor: Ignacio Pachón Bermúdez

Tutor académico: Prof. Dra. Meuri del Camino de Juan Romero

Co-tutor: Prof. Dr. Miguel Saceda Sánchez

Dña. MEURI DEL CAMINO DE JUAN ROMERO, Doctora en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche de la Universidad Miguel Hernández-FISABIO, y **D. MIGUEL SACEDA SÁNCHEZ**, Doctor y Profesor Asociado del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“ESTUDIO DEL PAPEL DE IFITM1 Y OTROS GENES REGULADOS POR INTERFERÓN EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS EN TUMORES”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. IGNACIO PACHÓN BERMÚDEZ

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 30 de agosto de 2021

Fdo.: Dra. Meuri del Camino de Juan Romero

Fdo: Dr. Miguel Saceda Sánchez

RESUMEN

La proteína transmembrana 1 inducida por interferón (*IFITM1*, del inglés *interferon-induced transmembrane 1*), codificada por el gen con el mismo nombre, está sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, siendo clave en la proliferación, metástasis e invasión tumoral. Además, juega un papel importante en la adquisición de resistencia frente a diferentes tipos de terapia; sin embargo, su mecanismo de acción es aún desconocido.

Los resultados de unos arrays realizados previamente por el grupo de investigación del Dr. Miguel Saceda, identificaron unos genes relacionados con el interferón, entre los que estaba *IFITM1*, que estaban sobreexpresados en sublíneas resistentes a 5-fluorouracilo (5-FU) en cáncer colorrectal y a paclitaxel en cáncer de mama. En este trabajo se han seleccionado de entre ellos una serie de genes objetivo para estudiar su implicación en la adquisición de resistencia en diferentes modelos celulares de cáncer colorrectal, adenocarcinoma de páncreas exocrino y glioblastoma multiforme.

En este estudio se observó la sobreexpresión de *IFITM1* en los modelos tumorales más resistentes a 5-FU y carmustina (BCNU), tanto basalmente como en sublíneas resistentes generadas a estos fármacos. El efecto del 5-FU es citostático a dosis bajas, mientras que pasa a ser citotóxico al aumentar la concentración. Además, la administración de una dosis alta de 5-FU indujo la aparición de células aberrantes con mayor cantidad de material genético, mayor tamaño y vacuolas en su interior. Para estudiar la relación entre la expresión de *IFITM1* con la aparición de quimiorresistencias, se realizó el silenciamiento del gen en los diferentes modelos tumorales. El análisis mediante la distribución del ciclo celular no demostró un efecto significativo, mientras que los ensayos de proliferación resultaron ser más efectivos a la hora de establecer dicha relación.

Finalmente, en la búsqueda de moduladores del gen *IFITM1*, se analizó el efecto del verteporfín (VPF) en los modelos tumorales previamente utilizados. En el marco de colaboración del proyecto SARCOVIR, el grupo de investigación del Dr. Luis Pérez demostró que el VPF es capaz de aumentar los niveles de *IFITM1* en líneas celulares de peces. Sin embargo, nuestros experimentos en células tumorales humanas no mostraron ningún efecto al aplicar el fármaco tanto en monoterapia como en terapia combinada.

En conclusión, nuestro trabajo muestra evidencias que plantean una relación entre la sobreexpresión de *IFITM1* y la adquisición de quimiorresistencia, permitiendo el posible desarrollo de nuevas terapias dirigidas frente a este gen. No obstante, se requiere de un estudio más exhaustivo para esclarecer la participación de los genes objetivo en la adquisición de resistencia a fármacos.

Palabras clave

IFITM1, quimiorresistencia, 5-FU, BCNU, cáncer

ABSTRACT

Interferon-induced transmembrane 1 (IFITM1) protein, encoded by the gene under the same name, is overexpressed in several types of cancer, being crucial in tumour proliferation, metastasis, and invasion. In addition, it plays a key role in resistance acquisition against different therapies; however, its mechanism of action is still unknown.

The results of arrays previously performed by Dr. Miguel Saceda's research group have identified interferon-related genes, including *IFITM1*, which were overexpressed in 5-fluorouracil (5-FU) resistant colorectal cancer cells and paclitaxel resistant breast cancer cells. In this work, a series of target genes have been selected among them to study their involvement in the resistance acquisition in different cellular models of colorectal cancer, exocrine pancreatic adenocarcinoma and glioblastoma multiforme.

In this study, the most resistant tumour models to 5-FU and carmustine (BCNU) have showed *IFITM1* overexpression both, basally and in resistant generated cell sublines. 5-FU effect is cytostatic at low doses, whereas it becomes cytotoxic with increasing concentration. Furthermore, the administration of 5-FU higher doses induced the appearance of aberrant cells with greater amount of genetic material, larger size, and cytoplasmic vacuoles. To study the relationship between *IFITM1* expression and the appearance of chemoresistance, gene silencing was performed in different tumour models. Cell cycle distribution analysis did not show a significant effect, while proliferation assays proved to be more effective in establishing this relationship.

Finally, searching *IFITM1* modulators, the effect of verteporfin (VPF) was analysed in the tumour models previously used. Within SARCOVIR project framework, Dr. Luis Pérez's research group demonstrated that VPF is capable of increasing *IFITM1* levels in fish cell lines. However, our experiments in human tumour cells showed no effect when the drug was applied both in monotherapy and in combination therapy.

In conclusion, our work shows evidence that suggest a relationship between *IFITM1* overexpression and resistance to different drugs, allowing the possible development of new therapies targeting this gene. Nevertheless, further studies are required to clarify the involvement of target genes in the acquisition of chemoresistance.

Keywords

IFITM1, chemoresistance, 5-FU, BCNU, cancer

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Cáncer colorrectal | 2 |
| Glioblastoma multiforme | 3 |
| Terapia tumoral mediante el uso de interferón | 5 |
| ANTECEDENTES | 6 |
| OBJETIVOS..... | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| Cultivo celular | 8 |
| Tratamientos | 8 |
| <i>Adquisición de resistencia</i> | 8 |
| Ensayos de proliferación celular | 9 |
| Análisis del ciclo celular | 9 |
| Estudio de la viabilidad celular | 11 |
| Detección de células aberrantes | 11 |
| Transfección con RNA interferente | 11 |
| Análisis de la expresión génica | 13 |
| <i>Extracción RNA</i> | 13 |
| <i>Retrotranscripción</i> | 14 |
| <i>PCR cuantitativa en tiempo real</i> | 14 |
| Análisis estadísticos | 16 |
| RESULTADOS | 16 |
| Genes involucrados en la respuesta inmunitaria muestran una relación con el cáncer de colon | 16 |
| Modelo <i>in silico</i> de las proteínas IFITM1 e IFITM3 | 19 |
| El tratamiento con 5-FU provoca efectos citostáticos y/o citotóxicos en las líneas celulares de CRC, siendo SW480 la línea más resistente | 20 |
| La expresión de <i>IFITM1</i> y <i>-3</i> se relaciona con la resistencia a 5-FU en las líneas celulares de CRC | 22 |
| El silenciamiento de <i>IFITM1</i> e <i>IFITM3</i> no restaura la sensibilidad a 5-FU en las líneas celulares de CRC | 23 |
| El tratamiento periódico con dosis altas de 5-FU favorece la aparición de células aberrantes | 25 |
| Elevada expresión de <i>IFITM1</i> inicial tras el tratamiento agudo con 5-FU en las sublíneas celulares de CRC | 27 |
| El silenciamiento de <i>IFITM1</i> potencia el efecto antiproliferativo del 5-FU en las sublíneas celulares resistentes de CRC | 28 |
| La elevada expresión de IFITM1 y <i>-3</i> se correlaciona con una mayor resistencia intrínseca a 5-FU en PAAD | 29 |
| La expresión de <i>IFITM1</i> tiende a ser mayor en líneas tumorales resistentes a BCNU en GBM | 30 |
| <i>IFITM1</i> y <i>-3</i> aumentan su expresión en las sublíneas celulares de GBM resistentes a BCNU | 32 |

| | |
|--|-----------|
| No hay una clara una relación causa-efecto entre la sobreexpresión de <i>IFITM1</i> y la resistencia a fármacos en modelos tumorales de mal pronóstico | 33 |
| El tratamiento con VPF no modifica sustancialmente la expresión de <i>IFITM1</i> en modelos tumorales | 35 |
| DISCUSIÓN | 39 |
| CONCLUSIONES | 45 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |
| ANEXOS | 52 |

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades con el común denominador de una división celular descontrolada. Principalmente, este crecimiento anómalo se debe a una acumulación escalonada de mutaciones en el control de la proliferación celular que termina en el establecimiento de una población celular de crecimiento rápido e incontrolado. En ella, algunas de dichas mutaciones otorgan ventajas selectivas que favorecen su prevalencia sobre el resto de las células. Este proceso proliferativo desordenado termina por generar un tumor que puede ser clasificado como benigno o maligno. Mientras que los primeros son de crecimiento lento y se mantienen en el lugar de origen, pudiendo ser extirpados quirúrgicamente con un bajo porcentaje de recaída; los tumores malignos crecen muy rápidamente y son capaces de invadir tejidos cercanos y diseminarse por el cuerpo a través de vasos linfáticos o circulatorios colonizando y proliferando en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. El concepto “cáncer” como enfermedad siempre es indicativo de un tumor maligno y su malignidad es muy variable según el tejido afectado, la capacidad proliferativa, invasiva, metastática y de supervivencia.

Dependiendo del tipo celular en el que ocurra, un tumor puede clasificarse como: carcinoma, es el más frecuente (80-90%) y está generado por células epiteliales; sarcoma, derivado de tejido conectivo; neuroectodérmicos, afectan células del sistema nervioso; y linfomas y leucemias, afectan células de la línea linfóide (sistema inmunitario) y de la línea mieloide (células sanguíneas), respectivamente (Pelengaris y Khan, 2006).

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, casi 10 millones de personas fallecieron en el año 2020, siendo el principal el cáncer de pulmón (18%) seguido por el cáncer colorrectal (9,4%) y el cáncer hepático (8,3%). Aproximadamente se diagnosticaron unos 19,3 millones de nuevos casos de cáncer de los cuales el 11,7% correspondía a cáncer de mama, 11,4% a cáncer pulmonar y 10% a cáncer colorrectal (Sung *et al.*, 2021) (**Figura 1**).

Más concretamente, en España, hubo un total de 282.421 nuevos casos estimados siendo el más incidente el cáncer colorrectal (14,3%) seguido por los cánceres de próstata y de mama (12,3% y 12,1%, respectivamente). Sin embargo, a nivel de mortalidad encabeza el listado el cáncer pulmonar (20,3%) seguido del cáncer colorrectal y pancreático (14,6% y 6,7%, respectivamente).

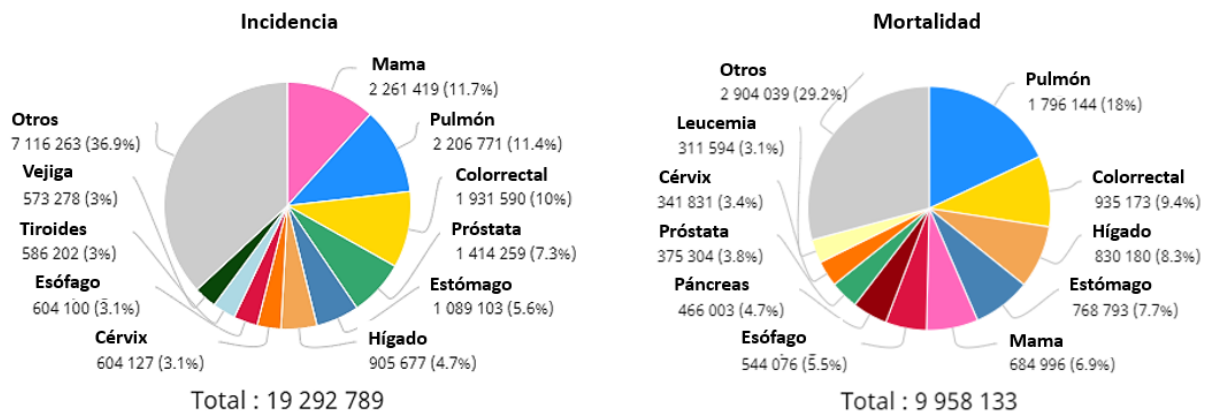


Figura 1. Estimación de los porcentajes de incidencia y mortalidad global en 2020 para ambos sexos (Modificado de GLOBOCAN, 2021).

Se estima que para el año 2040 haya aproximadamente 28,4 millones de casos nuevos a nivel global, lo que supone un aumento de casi el 50% de las cifras actuales (Sung *et al.*, 2021). Precisamente, debido a los elevados porcentajes de incidencia y mortalidad que ocurren y se estiman, es de vital importancia el desarrollo de métodos preventivos, técnicas diagnósticas que permitan detectar la enfermedad en etapas tempranas y nuevas terapias dirigidas específicamente a las células tumorales y que actúen de la manera más eficaz posible.

Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC, del inglés *colorectal cancer*) es la presencia de un tumor maligno en el colon o el recto. Existen diferentes tipos de tumores colorrectales dependiendo del tipo de célula afectada. El CRC más común es el adenocarcinoma, presente en un 95% de los casos. Comienza con un crecimiento anormal de células en el colon, llamado pólipo precanceroso (fase 0). Posteriormente, según el crecimiento, la profundidad que alcance y la capacidad invasora y/o metastática, el tumor puede clasificarse en 4 fases diferentes representadas en la **Figura 2**.

A pesar del gran avance en el desarrollo de las técnicas de cribado y diagnóstico de esta enfermedad, únicamente se detecta el tumor en una etapa temprana a 4 de cada 10 pacientes (Beklen *et al.*, 2021). El tratamiento más efectivo es la cirugía, combinada junto a sesiones de quimio y/o radioterapia, pero esta va perdiendo eficacia conforme va avanzando la enfermedad siendo ineficaz en pacientes donde el cáncer ha metastatizado. En esos casos, el tratamiento que suele aplicarse es la quimioradioterapia (Rawla *et al.*, 2019).

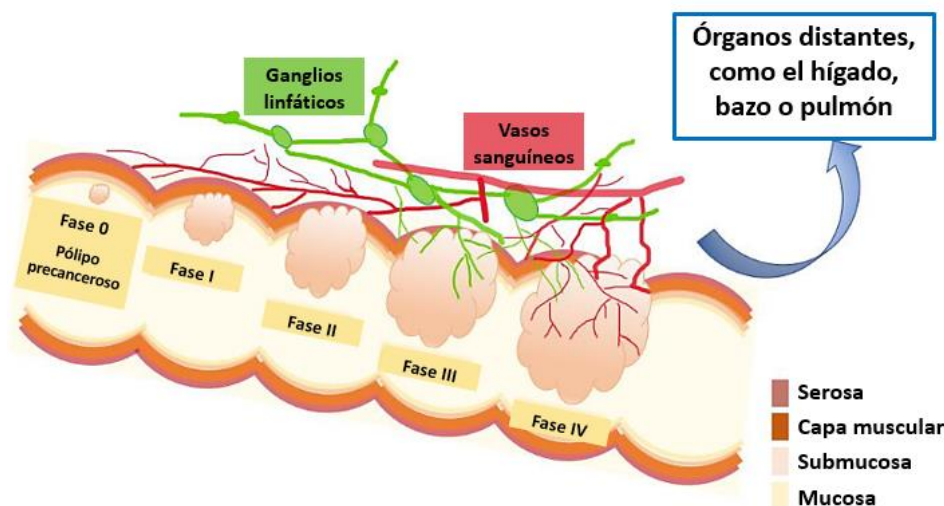


Figura 2. Fases del desarrollo del cáncer colorrectal. En la fase 0, existe un crecimiento anómalo (pólipo precanceroso) de células en la capa interna del colon o el recto. En la fase 1, el pólipo ha traspasado la capa interna pero no la capa muscular. En la 2ª fase, el tumor ha invadido la capa muscular. En la fase 3, el cáncer llega a invadir vasos y ganglios linfáticos cercanos. En la última fase, el tumor es capaz de metastatizar al invadir los vasos sanguíneos, lo que facilita su propagación a órganos distantes (Modificado de (Martin *et al.*, 2021)).

Como se ha comentado previamente, el CRC es uno de los tres tipos de tumores con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. Su mal pronóstico se debe a su elevada capacidad de desarrollar resistencias a los tratamientos convencionales sumado a un alto porcentaje de recidiva. En los últimos años se han desarrollado terapias dirigidas específicamente a las células tumorales para reducir los efectos secundarios de la quimio y radioterapia. Algunos ejemplos de los tratamientos que han llegado a fases clínicas son: Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al factor de crecimiento endotelial vascular, para evitar la angiogénesis; Regorafenib, un inhibidor de la tirosina quinasa; e inhibidores del receptor del factor de crecimiento epitelial, como Cetuximab o Panitumumab (Dekker *et al.*, 2019). Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos es variable debido a la alta heterogeneidad molecular del CRC, siendo necesaria la identificación de nuevos marcadores y dianas terapéuticas.

Glioblastoma multiforme

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes y en función del tipo de célula glial al que afectan se dividen en: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y gliomas del tronco encefálico. Los astrocitomas son los más frecuentes y se clasifican dependiendo del grado o agresividad del tumor: astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitoma difuso (grado II), astrocitoma anaplásico (grado III) y glioblastoma (grado IV). Además de ser el más agresivo, el glioblastoma multiforme (GBM) es el más invasivo e indiferenciado. A pesar de su baja incidencia a nivel global, es uno de los tumores con mayor tasa de mortalidad ya que la mayoría de los pacientes no superan el primer año (62,8%) y aproximadamente solo el 5% sobrevive tras 5 años (Lapointe *et al.*, 2018).

Existen diferentes biomarcadores para determinar el pronóstico y el tratamiento a emplear. El más conocido es el estado de la metilación del promotor de la enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT). La metilación del promotor de MGMT produce su silenciamiento, indicativo de un mejor pronóstico y una mayor sensibilidad a tratamientos comúnmente utilizados en quimioterapia en tumores cerebrales, como la temozolomida (TMZ) o la carmustina (BCNU, del inglés *N,N'*-Bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea) que son agentes alquilantes (Hegi *et al.*, 2005). Otro biomarcador importante en la generación temprana del tumor es el estado mutacional de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 e IDH2, cuyas versiones mutadas se encuentran presentes aproximadamente en el 10% de los casos de GBM. Concretamente, las mutaciones en IDH1 se encuentran principalmente en gliomas de bajo grado. Es tal la importancia de estas mutaciones que la Organización Mundial de la Salud clasifica los glioblastomas según IDH mutado, IDH silvestre y glioblastoma NOS (del inglés *not otherwise specified*) (Louis *et al.*, 2016). En condiciones normales, la IDH actúa en el ciclo de Krebs produciendo α -cetoglutarato y NADPH, utilizado para la síntesis de glutatión, que elimina las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Pero cuando la IDH está mutada genera únicamente α -hidroxiglutarato utilizando NADPH, lo que reduce los niveles finales de glutatión. Bajos niveles de glutatión se han relacionado con mejor pronóstico debido a una mayor sensibilidad frente a quimio y radioterapia, las cuales aumentan los niveles de ROS (Guo *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2020; Oronsky *et al.*, 2021) (**Figura 3**).

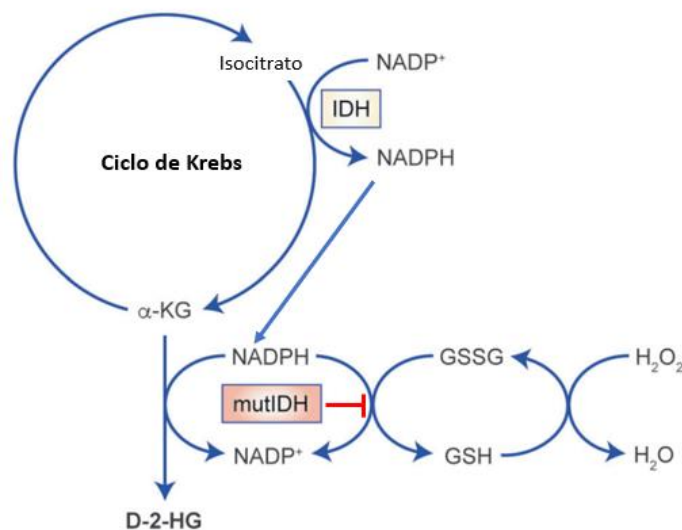


Figura 3. IDH mutado bloquea la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. La actividad de la IDH mutada consume NADPH para producir NADP⁺, suprimiendo la detoxificación de H₂O₂ (Modificado de (Han *et al.*, 2020)).

La estrategia terapéutica utilizada en los glioblastomas se inicia con la cirugía, aunque al tratarse de tumores con alta capacidad invasiva, resulta prácticamente imposible la completa extirpación del tumor. Por ello, el tratamiento quirúrgico se complementa con radioterapia y quimioterapia concomitante utilizando un agente alquilante como la TMZ. A pesar de la mejora en el

pronóstico del paciente obtenida tras la aplicación de este tipo de tratamiento, existe una alta probabilidad de reaparición del tumor (Oronsky *et al.*, 2021). Sin embargo, en estudios donde se ha utilizado BCNU previamente a la quimioterapia con TMZ, se ha demostrado una mejora en la supervivencia del paciente (Xiao *et al.*, 2020).

Actualmente se está estudiando la eficacia de otras terapias frente a este tipo de tumores. Entre ellas se encuentra el uso combinado de TMZ con campos eléctricos, para interrumpir la división de las células tumorales. Sin embargo, el elevado coste que supone ha limitado su aplicación (Oronsky *et al.*, 2021). Por otro lado, se están evaluando diferentes dianas terapéuticas de GBM, por ejemplo, inhibidores de diferentes receptores tirosina quinasa, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular, el receptor del factor de crecimiento epitelial o el receptor A3 de efrina (EphA3) (Taylor *et al.*, 2019). Desgraciadamente, la eficacia de estos inhibidores como terapias antitumorales *per se* ha resultado ser limitada.

Terapia tumoral mediante el uso de interferón

A pesar de los grandes avances realizados en el tratamiento del cáncer, la falta de eficacia para lograr la completa eliminación del tumor revela la necesidad de desarrollar terapias más efectivas y de identificar nuevos marcadores de pronóstico o nuevas dianas terapéuticas.

Aunque el papel antitumoral del interferón (IFN) fue descrito hace más de 50 años (Gresser y Bourali, 1969), su utilización como terapia tumoral no ha resultado efectiva debido al gran desconocimiento que existía en su mecanismo de acción. Actualmente, existen muchos estudios al respecto, abriendo así un abanico de posibles tratamientos.

Dentro de las citocinas de IFN existen tres familias conocidas como IFN de tipo I, II y III. Mientras que los IFN de tipo I (IFN- α e IFN- β) y de tipo III (IFN- λ) son secretados por diferentes células, los IFN de tipo II (IFN- γ) son producidos por las células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*) (Pestka *et al.*, 2004). Una vez secretados, los IFN se unen a sus respectivos receptores activando múltiples cascadas de señalización que dan lugar a la expresión de genes estimulados por IFN (ISG, del inglés *IFN-stimulated genes*). Los ISGs son capaces de controlar varios procesos celulares como la proliferación, diferenciación, progresión del ciclo celular, apoptosis, metástasis y supervivencia (Lazear *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2016) y diferentes estudios demuestran como la desregulación del sistema inmunitario puede generar sobreexpresión de estos genes, implicando una mayor carcinogénesis y resistencia a fármacos (Alam y Kennedy, 2019).

La familia de los genes transmembrana inducidos por interferón (IFITM, del inglés *interferon-induced transmembrane*), localizada en el cromosoma 11, pertenece al grupo de los ISGs y codifica una serie de proteínas homólogas que se encuentran en las membranas plasmáticas y

endolisosomales (Yáñez *et al.*, 2019). Esta familia está compuesta por 5 integrantes: IFITM1, IFITM2, IFITM3, IFITM5 e IFITM10. Mientras que la información sobre la función que desempeñan IFITM5 e IFITM10 en humanos es limitada; se conoce que IFITM1, -2 y -3 están implicados en la respuesta inmunitaria frente a ciertos virus, como por ejemplo influenza A o SARS-CoV, evitando la fusión de la membrana viral y celular.

Durante la última década, varios estudios han demostrado que la proteína IFITM1 tiene diferentes funciones muy importantes. En tumores no sólidos, como las leucemias, forma parte de la de señal de respuesta inmunológica antiproliferativa por parte de linfocitos B (Matsumoto *et al.*, 1993). Sin embargo, en tumores sólidos, IFITM1 es clave en el control de la proliferación tumoral (Yu *et al.*, 2011; Ogony *et al.*, 2016), así como en la metástasis, la invasión y la angiogénesis (Yu *et al.*, 2011; Popson *et al.*, 2014; Sari *et al.*, 2016). Además, la sobreexpresión de *IFITM1* está relacionada con mal pronóstico en algunos tipos de tumores, ya que es capaz de favorecer el desarrollo de resistencia frente a diferentes tratamientos como la quimio, radio o endocrina (Liang *et al.*, 2020). Todo ello convierte a IFITM1 en una posible diana terapéutica para el tratamiento del cáncer con características muy prometedoras, aunque son necesarios más estudios para descifrar los mecanismos moleculares implicados en la angiogénesis y la resistencia a las terapias. Asimismo, debido al papel que desempeña en la respuesta inmunitaria frente a diversos tipos de virus, podría utilizarse como terapia antivírica inespecífica de amplio espectro.

El papel que desempeña IFITM3 en las células tumorales es similar al observado en IFITM1, ya que también es fundamental en la división y migración y se encuentra sobreexpresado en tumores de colon y gliomas (Fan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013), entre otros. Sin embargo, la importancia de la desregulación de este gen y los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen.

ANTECEDENTES

Previamente, en el grupo de Investigación de Oncología Molecular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) se realizó un estudio en el que se generaron diferentes líneas celulares de carcinoma de mama y de colon resistentes a paclitaxel y 5-fluorouracilo (5-FU), respectivamente, por presión selectiva con dosis crecientes de estos fármacos. Posteriormente, se realizaron arrays de ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés *deoxyribonucleic acid*) obteniéndose una lista de genes diferencialmente expresados. Se observó un característico grupo de genes relacionados con la respuesta a IFN que cambiaba estructural y funcionalmente, en ambos modelos celulares y en función de la adquisición de resistencia a los fármacos (**Figura 4**). De este conjunto se seleccionaron una serie de genes objetivo, que se explicarán más adelante, entre los que estaba *IFITM1*.

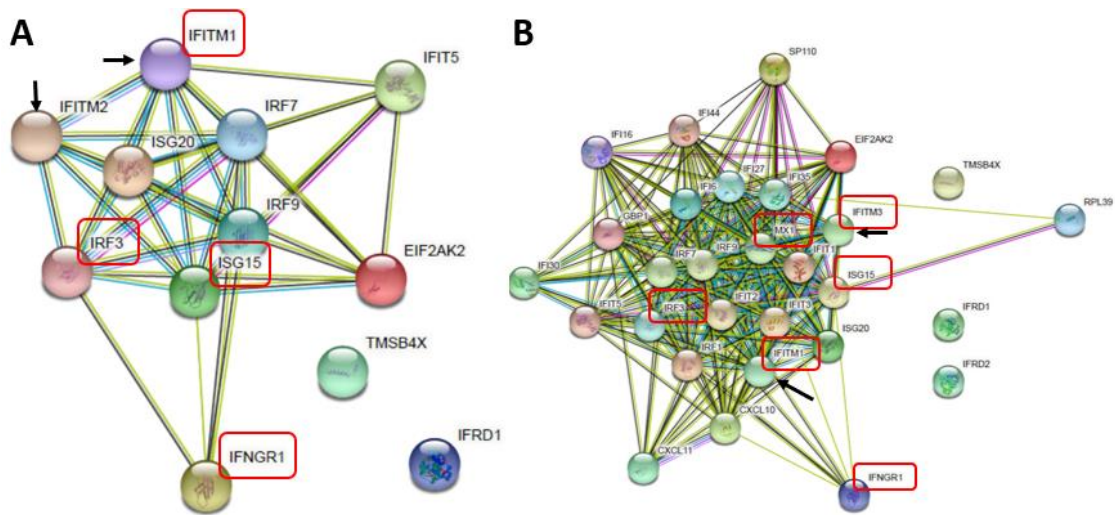


Figura 4. Representación del grupo de genes diferencialmente expresados y relacionados con la respuesta a interferón. La relación entre las proteínas se obtuvo mediante la base de datos STRING en pacientes de carcinoma de mama (A) y colorrectal (B). En rojo, se enmarcan los genes objetivo; las flechas negras muestran las proteínas de la familia IFITM destacando que, cuando se inició el estudio, no se conocía su estructura.

Existen estudios que han determinado la sobreexpresión de *IFITM1* en diferentes modelos tumorales de CRC, siendo mayor en aquellas líneas celulares con mayor capacidad de generar metástasis (Sari *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que inducir la sobreexpresión de *IFITM1* mediante una transfección aumenta la agresividad del tumor (He *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es determinar la relación entre el aumento de los niveles de expresión de *IFITM1*, y/o genes relacionados, y la adquisición de resistencia a fármacos en diferentes modelos celulares. Para el cumplimiento del objetivo principal, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar una búsqueda de los niveles de expresión y la información funcional y/o estructural de los genes estimulados por interferón, seleccionados en base a los arrays del grupo de investigación, en carcinoma de colon y glioblastoma.
2. Analizar la expresión de los genes objetivo en líneas celulares de carcinoma colorrectal, pancreático y glioblastoma y determinar la relación con la resistencia a 5-FU y BCNU.
3. Desarrollar sublíneas celulares de carcinoma de colon y glioblastoma resistentes a fármacos por presión selectiva y caracterizar la expresión de los genes objetivo.
4. Determinar la relación causa-efecto entre la resistencia adquirida en las sublíneas del objetivo anterior y los cambios en la expresión de los genes objetivo.
5. Relacionar la expresión de los genes anteriores con la respuesta viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares tumorales HT-29, HT-29-M6 (variante de HT-29 resistente a metotrexato) y SW480 de CRC y Hs766T, M220 y RWP1 de adenocarcinoma de páncreas exocrino. Todas ellas fueron suministradas por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM, Barcelona, España). También se utilizaron las líneas celulares de GBM HGUE-GB-16, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40, HGUE-GB-42 y HGUE-GB-48, siendo la más estudiada HGUE-GB-39. Estas líneas celulares fueron establecidas por el grupo de investigación a partir de cultivos primarios obtenidos en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE) (Ventero *et al.*, 2019). Para mantener las líneas celulares de colon y páncreas el medio utilizado fue Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose con glutamina estable y Hepes 25 mM (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) mientras que para los cultivos de GBM se utilizó DMEM-F12 con glutamina estable y Hepes 15 mM (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos). Tanto el medio DMEM como el DMEM-F12 fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomicina) (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos). Las células fueron incubadas en frascos de cultivo celular T25 a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera humidificada.

Tratamientos

El tratamiento con carmustina (BCNU) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos), un agente alquilante de tipo nitrosourea, se utilizó en las líneas celulares de GBM a una concentración de 50 µM y concentraciones de fármaco crecientes para la adquisición de resistencia de HGUE-GB-39. Por otro lado, el 5-Fluorouracilo (5-FU) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos), que es un antimetabolito antagonista de pirimidina, se usó para los experimentos realizados en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas y de colon a concentraciones de 10 µM, 20 µM o 50 µM, así como para la adquisición de resistencia. Además, se aplicó verteporfin (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos), una benzoporfirina, en líneas celulares pancreáticas y colorrectales a concentraciones de 1 µM y 2,5 µM.

Adquisición de resistencia

Las líneas celulares SW480 y HGUE-GB-39 fueron sometidas a presión selectiva con dosis crecientes de distintos fármacos, 5-FU y BCNU respectivamente, para conseguir sublíneas resistentes a los mismos. En ambas líneas celulares, se comenzó con una dosis baja de 1 µM y fue aumentándose progresivamente la concentración una vez las células se estabilizaban y continuaban creciendo a dicha dosis. Además, en otra aproximación experimental para generar líneas resistentes, la línea SW480 fue sometida a un tratamiento agudo con 5-FU, utilizando una dosis muy elevada (40 µM) y

se le suministró medio DMEM enriquecido con 20% de FBS para favorecer su recuperación a esta dosis aguda de fármaco. Posteriormente, las células que consiguieron sobrevivir fueron tratadas periódicamente con dosis crecientes de 5-FU (1-10 μ M). Para diferenciar ambos grupos celulares, nos referiremos a las células que fueron tratadas inicialmente con la dosis aguda como tratamiento agudo X (TaX, siendo X la concentración de fármaco que se administra periódicamente) mientras que las células que se trataron de forma crónica desde el comienzo se nombrarán tratamiento crónico (TcX, siendo X la concentración de fármaco administrada periódicamente).

Ensayos de proliferación celular

Para realizar estudios de proliferación celular se utilizó el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Esta técnica se basa en una reacción de reducción catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa, localizada en la mitocondria. El compuesto MTT, de color amarillo, se transforma en sales de formazán, que son de color morado e insolubles. Debido a que únicamente las células viables pueden generar dicha reacción, la cantidad de sales generadas es directamente proporcional a la cantidad de células funcionales.

Para ello, se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Tras ello, se aplicaron por sextuplicado dosis crecientes del fármaco a estudiar y se incubaron las células durante 72 horas a 37°C. Pasado ese tiempo, se aplicó MTT (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a los pocillos con una concentración de 0,25 mg/mL y se incubaron de nuevo las placas durante 3 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, se vació el contenido de las placas, se añadieron 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, en inglés *dimethyl sulfoxide*) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y se mantuvieron 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Por último, para cuantificar la cantidad de células viables, se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro de microplacas Eon™ (BioTek®, Winooski, VT, Estados Unidos).

La medida de IC₅₀ es la concentración a la cual se inhibe el 50 por ciento de la proliferación celular. Gracias a los ensayos con MTT, también se pudo determinar la IC₅₀ de cada una de las líneas celulares, tanto basales como aquellas que fueron tratadas para adquirir resistencia al fármaco.

Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo permite determinar el número de células, ciertas características celulares como el tamaño o la forma y, mediante el marcaje fluorescente proporciona información sobre el porcentaje de células vivas y su distribución del ciclo celular, entre otras. Las mediciones se basan en la manera en que las células teñidas, responden a la luz. El análisis de la distribución del ciclo celular se basa en la detección de la cantidad de DNA utilizando yoduro de propidio (PI, del inglés *propidium iodide*), que es un intercalante fluorescente de ácidos nucleicos. El ciclo celular

consta de 4 fases: G1, S, G2 y M. La fase G1 se caracteriza por el crecimiento celular y la generación de orgánulos, proteínas y ácido ribonucleico (RNA, del inglés *ribonucleic acid*); en la fase S se replica el DNA; en la fase G2 continúa el crecimiento de la célula y la síntesis proteica; la última fase es la mitosis celular (M). La intensidad de la fluorescencia emitida por el PI será proporcional a la cantidad de DNA, pudiendo diferenciar las fases G1, S, G2/M y las células muertas cuyo DNA se encuentre fragmentado. Esta última fase recibe el nombre de SubG1 al tener menor cantidad de DNA que la fase G1. Además, este tipo de ensayo permite diferenciar si el efecto de un fármaco es citostático, bloqueando las células en una fase del ciclo, o citotóxico, induciendo la muerte celular.

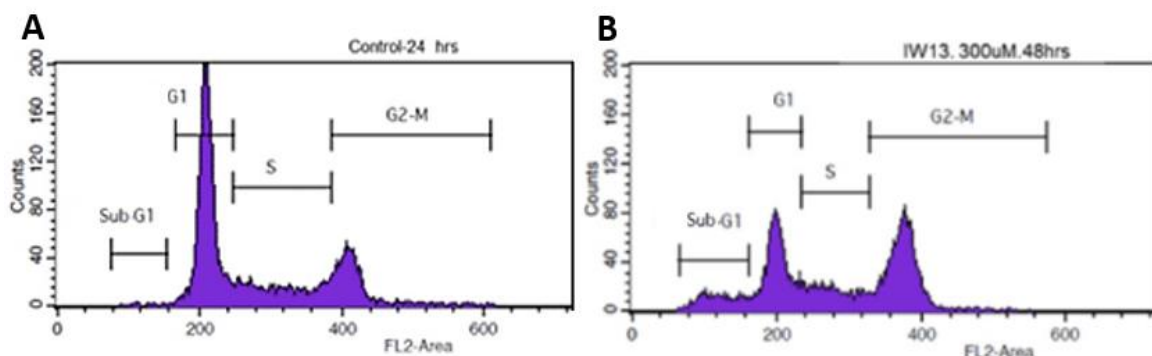


Figura 5. Distribución de las fases del ciclo celular obtenida por citometría de flujo. Las diferentes fases del ciclo se detectan gracias al marcaje mediante PI. En el análisis del grupo control (A) se observa cómo no hay presencia de muerte celular (SubG1), mientras en el grupo tratado (B) sí aparece (Modificado de (Prabha et al., 2019)).

Para realizar esta técnica, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Tras ello, se añadieron los tratamientos correspondientes y se mantuvieron entre 24 y 72 horas, según el experimento. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el medio de los pocillos se recogió en tubos de 15 mL y se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) al 0,02%. A continuación, las células se tripsinizaron y se pasaron al mismo tubo, el cual se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g. Las células se resuspendieron en 1 mL de etanol frío al 75% y se almacenaron durante 1 hora, como mínimo, a -20°C. Tras ello, se centrifugaron los tubos a 400 x g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 500 µL de una mezcla de PBS, 0,5% Triton X-100 (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos), 25 µg/mL de RNAsa (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y 25 µg/mL de PI (Promocell®, Heidelberg, Alemania). El Triton X-100 y la RNAsa se utilizaron para facilitar la entrada de PI y asegurar que únicamente marque el DNA, respectivamente. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Por último, para el determinar la distribución del ciclo celular según la cantidad de DNA se utilizó el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).

Estudio de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante citometría de flujo analizando la permeabilidad de la membrana plasmática utilizando el marcaje con PI, que es impermeable a la misma. Las células cuya membrana estuviera dañada quedarían marcadas, ya que el PI entraría y se uniría a los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia.

Para el ensayo de viabilidad se siguió el mismo protocolo que para el estudio del ciclo celular, pero tras la centrifugación, en lugar de resuspender las células en etanol al 75%, se diluyeron en PBS para finalmente obtener 1×10^6 células/mL. A los tubos se les añadió PI ($3 \mu\text{M}$) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para determinar el porcentaje de viabilidad celular se utilizó el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).

Detección de células aberrantes

La identificación de células aberrantes, tras la aplicación del fármaco, se realizó mediante fotografías de las células tumorales marcadas con Hoescht (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos), un fluoróforo que marca el DNA. El Hoescht se excita con la luz ultravioleta a una longitud de onda de 361 nm y emite fluorescencia de color azul en un rango de longitud de onda de entre 460 y 490 nm.

Para ello, se sembraron las células en placas opacas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Tras ello, se aplicó el fluoróforo a $10 \mu\text{g/mL}$ y se mantuvo en el incubador durante 30 minutos. Finalmente, las células se detectaron mediante fotografías utilizando el lector de placas con captura de imágenes celulares Cytation™ 5 (BioTeK®, Winooski, VT, Estados Unidos).

Transfección con RNA interferente

Con el fin de estudiar el papel de los genes que codifican las proteínas transmembrana inducidas por interferón (IFITM, del inglés *interferon induced transmembrane*) 1 y 3 (*IFITM1* e *IFITM3*) en la adquisición de resistencia a fármacos, se utilizaron RNA interferentes pequeños (siRNA, del inglés *small interfering RNA*), cadenas de RNA de doble hebra de 20-25 nucleótidos, para bloquear la expresión de dichos genes. Este bloqueo se produce gracias a la interacción del siRNA con el complejo silenciador inducido por RNA (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*) en el citosol y, tras la unión, una de las hebras del siRNA se degrada. Posteriormente, el RISC se dirige al RNA mensajero diana e interacciona con él cortándolo en dos mitades que la célula considera como extrañas y acaba degradándolas (**Figura 6**). Para transfectar el siRNA en la célula se utilizó lipofectamina, un lípido catiónico que es capaz de formar complejos con las moléculas de siRNA, que están cargadas negativamente, y permite que atraviesen la membrana plasmática liberando el siRNA al citosol.

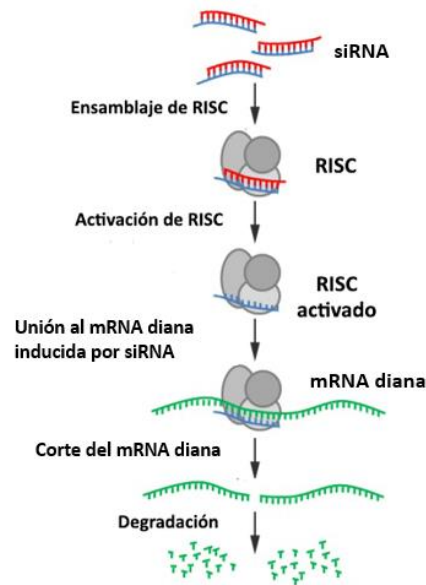


Figura 6. Mecanismo del silenciamiento de mRNA diana mediante siRNA. Una vez en el citosol, el siRNA se une al complejo RISC el cual se activa al degradarse una de las hebras de siRNA. Tras su activación, el complejo siRNA-RISC interacciona con el mRNA diana cortándolo por la mitad. El mRNA dividido presente en el citosol es reconocido como extraño y acaba siendo degradado por la célula con el consecuente silenciamiento del gen diana (Modificado de (Petrova *et al.*, 2013)).

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente, se realizó la transfección utilizando siRNA (Ambion® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) dirigido a *IFITM1* (ID: s16192) o a *IFITM3* (ID: s195033). Para ello, se prepararon dos diluciones en medio OPTI-MEM® (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), una con 50 pmol/mL de siRNA mientras que la otra tenía una concentración de 20 µM/mL de Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen™, Waltham, MA, Estados Unidos) y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se mezclaron ambas diluciones y se mantuvieron 20 minutos a temperatura ambiente para que se formara el complejo lípido-siRNA. Antes de añadir la mezcla, el medio de los pocillos se sustituyó por medio DMEM o DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS sin antibiótico. No ha de añadirse antibiótico ya que la lipofectamina permeabiliza la membrana al fusionarse con ella, permitiendo así la entrada de una mayor cantidad de antibiótico que puede llegar a ser tóxico para la célula. Pasados los 20 minutos, se añadió la mezcla a su respectivo pocillo obteniendo una concentración final de 2 µL/mL de lipofectamina y de 5 pmol/mL de siRNA y se incubaron las células a 37°C durante 24 o 48 horas, para conseguir la práctica eliminación de la expresión de la proteína diana, tras las cuales se les añadió el fármaco correspondiente (5-FU o BCNU).

Cabe destacar que, además de la preparación de una mezcla de siRNA dirigida al gen objetivo, se preparó una mezcla utilizando un siRNA no específico a modo de control negativo. Asimismo, se prepararon dos placas por línea celular estudiada, en una placa se estudió la

distribución del ciclo celular (ver **Análisis del ciclo celular**) y a la otra se le extrajo RNA para estudiar la variación de la expresión génica y comprobar si, efectivamente, la expresión del gen diana había sido suprimido (ver **Análisis de la expresión génica**).

Análisis de la expresión génica

Se analizó la expresión basal de los genes de interés en las líneas celulares humanas utilizadas, y también se realizaron análisis de expresión génica diferencial tanto tras la aplicación de un tratamiento como para comprobar si los siRNA habían funcionado correctamente. Para ello, y como se explica a continuación, se extrajo RNA de las líneas celulares a estudiar; seguido de una transcripción inversa para obtener el DNA complementario (cDNA, del inglés *complementary DNA*); y, por último, se realizó el análisis de la variación génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) cuantitativa en tiempo real (qPCR, del inglés *quantitative PCR*).

Extracción RNA

La extracción de RNA se realizó con el kit de aislamiento de RNA total de NZY (NZY total RNA isolation kit, NZYTech, Lisboa, Portugal) siguiendo el protocolo proporcionado por la empresa.

Se sembraron las células en pocillos y se dejaron incubar a 37°C hasta alcanzar un 90-100% de confluencia. Posteriormente, se lisaron las células utilizando una solución que contenía tampón NR y β -mercaptoetanol en una dilución 1:100 y se agitó en el vórtex. El lisado se trasladó a una columna de homogenización NZYSpin y se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g. Al sobrenadante se le añadió 350 μ L de etanol al 70%, se pasó todo el contenido a una columna de unión NZYSpin y se centrifugó a 11.000 x g durante 30 segundos, tras los cuales se desechó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 350 μ L del tampón NI y se volvió a centrifugar las muestras con las mismas condiciones. En este paso, quedan adheridas las cadenas de DNA y RNA en la columna de unión, por lo que para eliminar el DNA se añadieron 95 μ L de una mezcla de digestión que contenía tampón de digestión y desoxirribonucleasa en una dilución 1:10 y se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, se llevaron a cabo diferentes lavados entre los cuales se fue centrifugando la muestra a 11.000 x g durante 1 minuto y desechando los sobrenadantes. Primero se realizó un lavado con 200 μ L de tampón NWR1; 600 μ L de tampón NWR2 y 250 μ L con tampón NWR2. Tras este último lavado, se realizó una centrifugación con las mismas condiciones para secar la columna. Por último, se eluyó el RNA añadiendo 50 μ L de agua libre de nucleasas y se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g.

Tras la extracción de RNA, se evaluó la concentración y la pureza utilizando el espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Para

que el valor de pureza del RNA sea considerado como óptimo, la relación de las absorbancias 260/280 nm ha de tener un valor entre 2.0 y 2.2; aquellas muestras fuera de dicho rango quedaron excluidas. Asimismo, también se excluyeron las muestras cuya concentración era inferior a 50 ng/μL.

Retrotranscripción

La retrotranscripción de las muestras se realizó utilizando el kit de transcripción reversa de cDNA de alta capacidad (High-capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo proporcionado por la empresa. Se realizó una mezcla que contenía: 0,8 μL de una mezcla de dNTPs (100 mM), 1 μL de transcriptasa inversa MultiScribe, 1 μL de inhibidor de RNAsas, 2 μL de cebadores aleatorios RT y 2 μL de tampón RT. Para cada reacción, se añadieron 6,8 μL de la mezcla, 1 μg de RNA y se completó con agua libre de nucleasas hasta obtener un volumen de 20 μL. Una vez completadas, se incubaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) a las siguientes condiciones: a 25°C durante 10 minutos para que se alineen los cebadores con el RNA; 2 horas a 37°C para activar la transcriptasa inversa; tras ello, aumenta la temperatura a 85°C durante 5 minutos para desnaturalizar los cebadores e inactivar la transcriptasa inversa; por último, disminuye la temperatura a 4°C durante tiempo indefinido para el posterior almacenamiento de la muestra.

Finalmente, se evaluó la concentración y la pureza utilizando el Nanodrop™ 1000 y se diluyeron las muestras con agua libre de nucleasas hasta lograr una concentración de 200 ng/μL.

PCR cuantitativa en tiempo real

La técnica de qPCR permite amplificar los genes y cuantificar su expresión en tiempo real utilizando sondas fluorescentes, siendo proporcional la cantidad de fluorescencia detectada con la cantidad de DNA amplificado. Se puede diferenciar diferentes tipos de qPCR dependiendo los fluorocromos que se utilicen, bien sean no específicos (por ejemplo, SYBR Green) o bien sondas específicas (Taqman®). Todas las qPCRs en este trabajo fueron realizadas con SYBR Green, compuesto que se introduce en la doble hebra de DNA e interacciona con ella aumentando de forma significativa la tasa de emisión fluorescente.

Una ventaja de la utilización de SYBR Green es que únicamente requiere de dos cebadores, uno directo (*forward*) y otro inverso (*reverse*), para poder amplificar. Estos cebadores fueron diseñados utilizando un software específico frente a los genes que han sido estudiados. En la **Tabla 1** se muestran todos los genes y las secuencias diseñadas de los cebadores (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos).

| GEN | CEBADOR DIRECTO | CEBADOR INVERSO |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>IFITM1</i> | 5'-GAAACGACAGGGGAAAGGAG-3' | 5'-GAGTGAAGGTTTGAGAAGTGTGG-3' |
| <i>IFITM3</i> | 5'-ACTGTCCAAACCTTCTTCTCTCC-3' | 5'-TCGCCAACCATCTTCCTGTC-3' |
| <i>IFNGR1</i> | 5'-TCCTCAGTGCCTACACCACTAA-3' | 5'-CTCGTCACAATCATCTTCCTTCTG-3' |
| <i>IRF3</i> | 5'-GACCCTCAGACCCACATAA-3' | 5'-CAGAAGTACTGCCTCCACCA-3' |
| <i>ISG15</i> | 5'-ACTCATCTTTGCCAGTACAGG-3' | 5'-GGGACACCTGGAATTCGTTG-3' |
| <i>MX1</i> | 5'-GAAGATAAGTGGAGAGGCAAGG-3' | 5'-CTCCAGGGTGATTAGCTCATG-3' |
| <i>GAPDH</i> | 5'-TGCACCACCACTGCTTAGC-3' | 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' |

Tabla 1. Cebadores directos e inversos de cada gen estudiado.

Los análisis de qPCR se realizaron en placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® de 0,1 mL (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) y cada reacción contenía: 300 nM de cebador directo, 300 nM de cebador inverso, 2 µL de muestra, 6,8 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos). Posteriormente, la placa se selló con una cubierta adhesiva óptica ABI PRISM™ (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) y se centrifugó a 3.500 x g durante 4 minutos. Para llevar a cabo el análisis se utilizó el termociclador QuantStudio®3 Real-Time PCR (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos). El protocolo utilizado fue el siguiente:

Se comienza con una fase de incubación a 50°C durante 2 minutos a la que le sigue una fase de 10 minutos a 95°C en la que se activa la DNA polimerasa. Tras ello, se mantiene a 95°C durante 15 segundos, en los que se desnaturaliza el DNA de doble cadena, y disminuye la temperatura a 60°C durante 1 minuto, para el alineamiento de los cebadores y la amplificación del DNA, este ciclo se repite 40 veces. Por último, en la fase de disociación la temperatura oscila a 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto y, de nuevo, 95°C 15 segundos.

Cada una de las muestras se analizó por triplicado y se utilizó agua libre de nucleasas a modo de control negativo. Asimismo, para poder normalizar la expresión de los genes diana se utilizó, como control endógeno, la expresión del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), que normalmente se expresa de forma constitutiva en las células. Al finalizar la reacción, se utilizaron los valores de umbral de ciclo (*Ct*, del inglés *cycle threshold*) de cada muestra, que son inversamente proporcionales a la expresión del gen. Para calcular la expresión relativa se restó el *Ct* del control endógeno al valor *Ct* del gen diana (ΔCt), tras lo cual se obtuvo la expresión relativa mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Análisis estadísticos

Las gráficas representan la media \pm desviación estándar (SD, del inglés *standard deviation*) con un tamaño muestral (n) ≥ 3 . Mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk se determinó si los datos seguían una distribución normal o asimétrica. Posteriormente, para determinar si los cambios observados eran significativos se utilizó la prueba T de Student en aquellas muestras que seguían una distribución normal y cuya varianza era homogénea y, en aquellas que no cumplían dichas características, se realizó la prueba U de Mann-Whitney. Los cambios estadísticamente significativos se han indicado de la siguiente forma: * si p-valor $< 0,05$, ** si p-valor $< 0,01$ y *** si p-valor $< 0,001$. Los análisis estadísticos se obtuvieron mediante el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

RESULTADOS

Genes involucrados en la respuesta inmunitaria muestran una relación con el cáncer de colon

Se realizó una búsqueda en la base de datos UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) de aquellos genes que habían demostrado estar desregulados en carcinoma de colon y mama en el proceso de adquisición de resistencia a 5-FU y paclitaxel respectivamente. Se encontró que la vía del IFN estaba muy desregulada en ambos casos y por tanto nos centramos en el estudio de los genes implicados en ella. El software UALCAN constituye una herramienta que permite realizar análisis de expresión génica en tejido tumoral y no tumoral, supervivencia y correlaciones en pacientes de diferentes tipos de tumores, recopilados en bases de datos -ómicas del cáncer (Chandrashekar *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos de la base de datos indicaron que los niveles de expresión de *IFITM1* e *IFITM3* eran significativamente superiores en CRC con respecto al tejido normal. Sin embargo, las curvas de Kaplan-Meier asociadas a dichos genes indican que no afectan significativamente a la supervivencia de los pacientes (**Figura 7**).

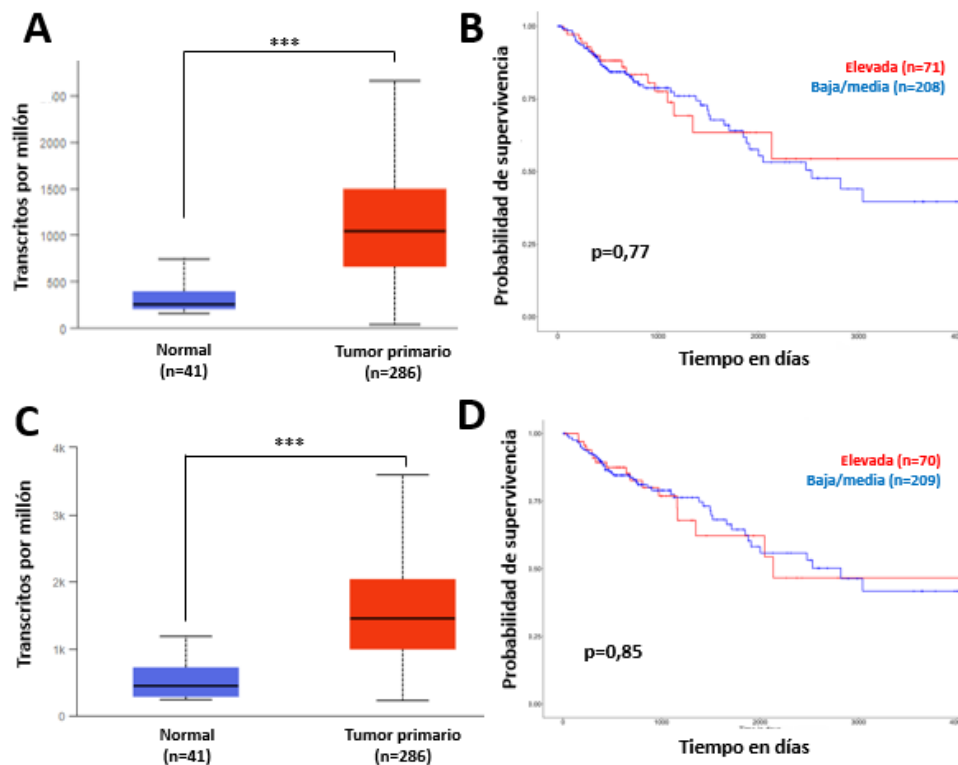


Figura 7. Expresión génica y supervivencia de *IFITM1* e *IFITM3* en CRC. La expresión relativa de los genes *IFITM1* (A) e *IFITM3* (C) es significativamente superior en tejido tumoral (caja roja) comparado con el tejido normal (caja azul). Los análisis de las curvas Kaplan-Meier revelan que no existe relación entre la diferencia de expresión de los genes *IFITM1* (B) e *IFITM3* (D) y la supervivencia del paciente. *** p-valor<0,001. (Modificado de UALCAN).

Este estudio se amplió al resto de genes cuya expresión variaba en ambos procesos de adquisición de quimiorresistencia en los arrays. En la **Tabla 2** se muestran los datos de CRC obtenidos, los datos de carcinoma de mama están reflejados en la **Tabla S1**. La gran mayoría de estos genes están involucrados en la respuesta inmunitaria frente a diversos tipos de virus. Sin embargo, también poseen funciones biológicas de respuesta a otro tipo de estrés más implicadas en cáncer, según las cuales pueden dividirse en dos grupos: aquellos que favorecen carcinogénesis y aquellos que la limitan.

Los genes *CXCL10*, *CXCL11*, *MX1* y *RPL39* han sido asociados con la proliferación, metástasis e invasión tumoral en distintos tipos de tumores, como por ejemplo carcinoma de mama triple negativo o CRC (Dave *et al.*, 2014; Tokunaga *et al.*, 2018; Aljohani *et al.*, 2020). Asimismo, *IFI30*, la familia IFIT, *IFRD1* e *ISG20* son marcadores de mal pronóstico en tumores debido a su implicación en la proliferación, supervivencia y resistencia a terapias (Lewis *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Pidugu *et al.*, 2019; Miyashita *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Los genes *IFITM1*, *IFITM3*, *IFI6* e *IFI27* codifican proteínas transmembrana que favorecen la proliferación, invasión y metástasis tumoral e inhiben la apoptosis, concretamente *IFI27* también está relacionado con la resistencia a fármacos y la transición epitelio-mesenquimal en cáncer ovárico (Li *et al.*, 2015; Sari *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Carbotti *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Rajapaksa *et al.*, 2020).

Dentro de los genes que relacionados con el IFN se encuentran varios genes que limitan la carcinogénesis. *IFI16* participa en respuesta al daño en el DNA interaccionando con proteínas supresoras de tumores como p53 (Agúndez Llaca, 2016). *IFI44* forma parte de la respuesta inmunitaria, estando implicado en la presentación de antígenos y la infiltración de linfocitos CD4⁺, neutrófilos y macrófagos en algunos tipos tumorales (Pan *et al.*, 2020). La familia de los factores reguladores de IFN (IRF, del inglés *interferon regulatory factor*) está asociada con mejor pronóstico en diferentes neoplasias gracias a sus capacidades antitumorales (Yanai *et al.*, 2012). El receptor de IFN-γ 1 (IFNGR1, del inglés *interferon gamma receptor 1*) está relacionado con buen pronóstico en cáncer ya que participa en la inmunovigilancia (Salvagno y Cubillos-Ruiz, 2021).

Finalmente, ISG15 y GBP1 tienen un papel dual en cáncer. Por un lado, son capaces de inhibir la proliferación, migración e invasión tumoral. Pero a su vez, ISG15 interactúa con numerosas proteínas celulares con funciones muy variadas y es capaz de aumentar la progresión tumoral. Asimismo, GBP1 puede estar relacionado con fenotipos resistentes a terapias así como con una mayor agresividad en tumores como el GBM, entre otros (Desai, 2015; Zuo *et al.*, 2016; Alcalá *et al.*, 2020; Carbotti *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

Para el desarrollo de este trabajo, inicialmente se seleccionaron varios de estos genes relacionados con IFN. El estudio se centra en los genes *IFITM1* y *-3* debido a su implicación en cáncer y que al igual que *IFNGR1*, codifican proteínas transmembrana. El hecho de que se trate de proteínas transmembrana favorecería el hipotético desarrollo de fármacos que pudieran utilizarse frente a ellos dada su accesibilidad. *IRF3* se seleccionó porque regula la expresión de IFN, por lo que, de manera indirecta, también regula la expresión de *IFITM1* y *-3*. El doble papel de *ISG15* en cáncer le convierte en un gen muy interesante para que su estudio se incluya en este trabajo. Finalmente, *MX1* se ha seleccionado debido a su implicación en la proliferación, invasión y metástasis tumoral. Además, el laboratorio del Dr. Luis Pérez estudia el papel de *MX1* en la infección vírica. Mediante una colaboración con este laboratorio (proyecto SARCOVIR, financiado por la UMH y FISABIO), también se está estudiando el papel de los genes *IFITM1* y *-3* como posibles dianas terapéuticas contra el proceso de infección por virus en peces. Este grupo de genes seleccionados, al que nos referiremos de aquí en adelante como “genes objetivo”, mostró una alteración de su expresión génica en CRC con respecto al tejido normal que, en *ISG15*, se reflejó también en la supervivencia (**Tabla 2**).

| Genes | Expresión (p-valor) | Supervivencia (p-valor) |
|---------|---------------------|-------------------------|
| CXCL10 | ND (2,94E-01) | SD (0,35) |
| CXCL11 | SE (4,20E-11) | SD (0,55) |
| EIF2AK2 | SE (1,62E-12) | SD (0,91) |
| GBP1 | ND (8,95E-01) | SD (0,95) |
| IFI16 | SE (4,80E-04) | SD (0,064) |
| IFI27 | SD (1,14E-01) | SD (0,39) |
| IFI30 | SD (1,16E-01) | SD (0,15) |
| IFI44 | SE (8,49E-11) | ↓ (0,022) |
| IFI6 | SE (7,24E-12) | SD (0,093) |
| IFIT1 | IE (6,59E-04) | SD (0,54) |
| IFIT2 | IE (3,64E-03) | SD (0,074) |
| IFIT3 | SD (3,9E-01) | SD (0,17) |
| IFIT5 | SD (4,86E-01) | SD (0,87) |
| IFITM1 | SE (<1E-12) | SD (0,77) |
| IFITM3 | SE (<1E-12) | SD (0,85) |
| IFNGR1 | SE (1,69E-05) | SD (0,29) |
| IFRD1 | SE (1,62E-12) | SD (0,32) |
| IFRD2 | SE (<1E-12) | ↑ (0,038) |
| IRF1 | SD (1,79E-01) | SD (0,90) |
| IRF3 | SE (1,62E-12) | SD (0,91) |
| IRF7 | SE (5,02E-03) | SD (0,06) |
| IRF9 | SD (3,12E-01) | SD (0,28) |
| ISG15 | SE (1,75E-02) | ↓ (0,032) |
| ISG20 | IE (3,78E-06) | SD (0,19) |
| MX1 | SE (5,08E-03) | SD (0,16) |
| RPL39 | SE (<1E-12) | SD (0,70) |
| SP110 | SD (5,78E-01) | SD (0,074) |

Tabla 2. Expresión y supervivencia de los genes relacionados con el IFN y la adquisición de resistencia a 5-FU. Valores de expresión génica con respecto al tejido no tumoral obtenidos en el array de CRC. ND, no diferencias; SE, sobreexpresión (rojo); IE, infraexpresión (azul); ↓, disminución significativa de la supervivencia (amarillo) y ↑, aumento significativo de la supervivencia (verde).

Modelo *in silico* de las proteínas IFITM1 e IFITM3

Puesto que la estructura de las proteínas IFITM1 e IFITM3 se desconocía al inicio de este estudio (**Figura 4**), no fue posible el diseño o cribado virtual de inhibidores mediante estudios de “*docking*” que era uno de los objetivos a desarrollar en el estudio. El reciente lanzamiento del software AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021), capaz de predecir la estructura de proteínas a partir de su secuencia, ha permitido el estudio de la posible estructura de IFITM1 y -3 (**Figura 8**). La estructura *in silico* propuesta muestra varias hélices alfa, que posiblemente puedan corresponder a un dominio transmembrana. Asimismo, se puede observar en ambas proteínas una cadena más o menos larga, que probablemente se encuentre fuera de la membrana participando en la interacción con otras

proteínas. Por tanto, esta parte de la estructura puede ser clave en las funciones biológicas de las proteínas IFITMs, siendo una potencial diana frente a la que se puedan desarrollar inhibidores en el futuro.

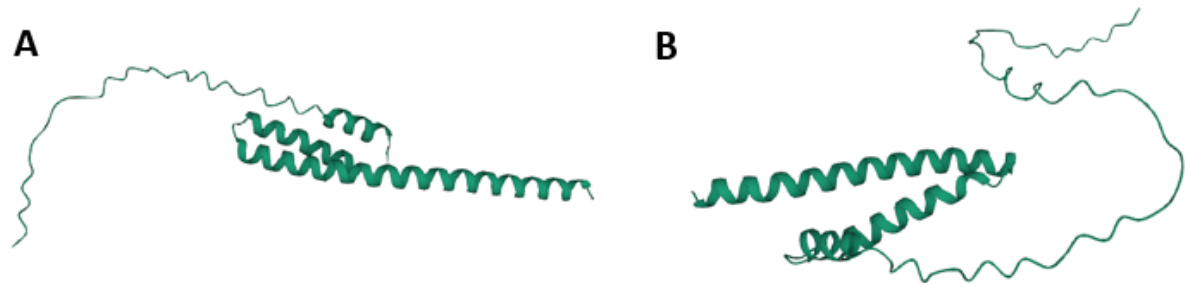


Figura 8. Estructura de las proteínas transmembrana inducidas por interferón 1 y -3. La estructura de las proteínas IFITM1 (A) e IFITM3 (B) se obtuvo mediante el software AlphaFold2.

El tratamiento con 5-FU provoca efectos citostáticos y/o citotóxicos en las líneas celulares de CRC, siendo SW480 la línea más resistente

Inicialmente se realizaron estudios dosis-respuesta con 5-FU de las diferentes líneas celulares de CRC, SW480, HT-29 y HT-29-M6. Estas células fueron tratadas con dosis crecientes de 5-FU en un rango de concentraciones de 0,25 a 50 μM durante 72 horas. Los resultados indican un efecto dependiente de concentración en todas las líneas celulares testadas (**Figura 9**), aunque con diferente grado de sensibilidad y/o resistencia al fármaco. Los valores de IC_{50} demuestran que la línea celular SW480 es la más resistente ($33,38 \pm 8,11 \mu\text{M}$), seguida de HT-29-M6 ($17,96 \pm 1,80 \mu\text{M}$) y HT-29 ($6,84 \pm 2,96 \mu\text{M}$).

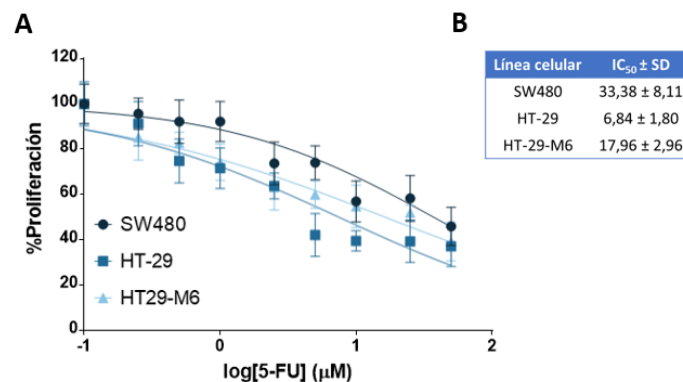


Figura 9. Ensayos dosis-respuesta con 5-FU en las líneas celulares SW480, HT-29 y HT-29-M6. (A) Porcentaje de proliferación celular representado con respecto al logaritmo de la concentración de 5-FU (μM). (B) Valores de IC_{50} de las líneas celulares. SD, desviación estándar.

Con el fin de determinar si el efecto antiproliferativo se debe a una acción citostática y/o citotóxica del fármaco se realizaron análisis de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular en la línea celular más resistente (SW480) y la más sensible (HT-29) (**Figura 10**). Para ello, se trataron las células con dosis de 10 y 50 μM de 5-FU durante 24 horas. El efecto del 5-FU en SW480 resultó ser citostático causando un aumento significativo de células en la fase S del ciclo

celular, lo que sugiere un bloqueo en dicha fase (**Figura 10A**). Por otro lado, el efecto citostático observado en HT-29, se debió a un bloqueo del ciclo celular en la fase G1 (**Figura 10B**).

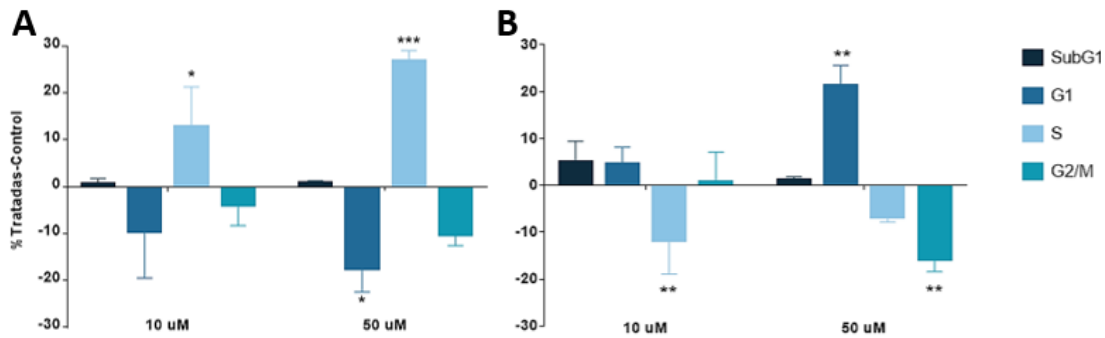


Figura 10. Distribución del ciclo celular en SW480 y HT-29 tratadas con 5-FU. Las células de SW480 (A) y HT-29 (B) fueron tratadas con concentraciones de 10 y 50 µM de 5-FU durante 24 horas. Se representa la diferencia entre el porcentaje de células tratadas y las células control en cada fase del ciclo celular. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

Al utilizar la dosis de 50 µM de 5-FU se observó que en el análisis de los resultados se producía un desplazamiento de la población hacia la derecha (**Figura 11A**). Este hecho implica un mayor contenido de DNA ya sea por la presencia de células poliploides o un aumento de células aneuploides, que se correspondería con una división celular aberrante y/o desigual. Con el objetivo de profundizar en este suceso, se mantuvo el tratamiento de 5-FU durante 24, 48 y 72 horas y se cuantificó el porcentaje de células desplazadas (**Figura 11B**). Los resultados confirman el aumento del porcentaje de células con mayor contenido en DNA conforme se incrementa el tiempo de tratamiento.

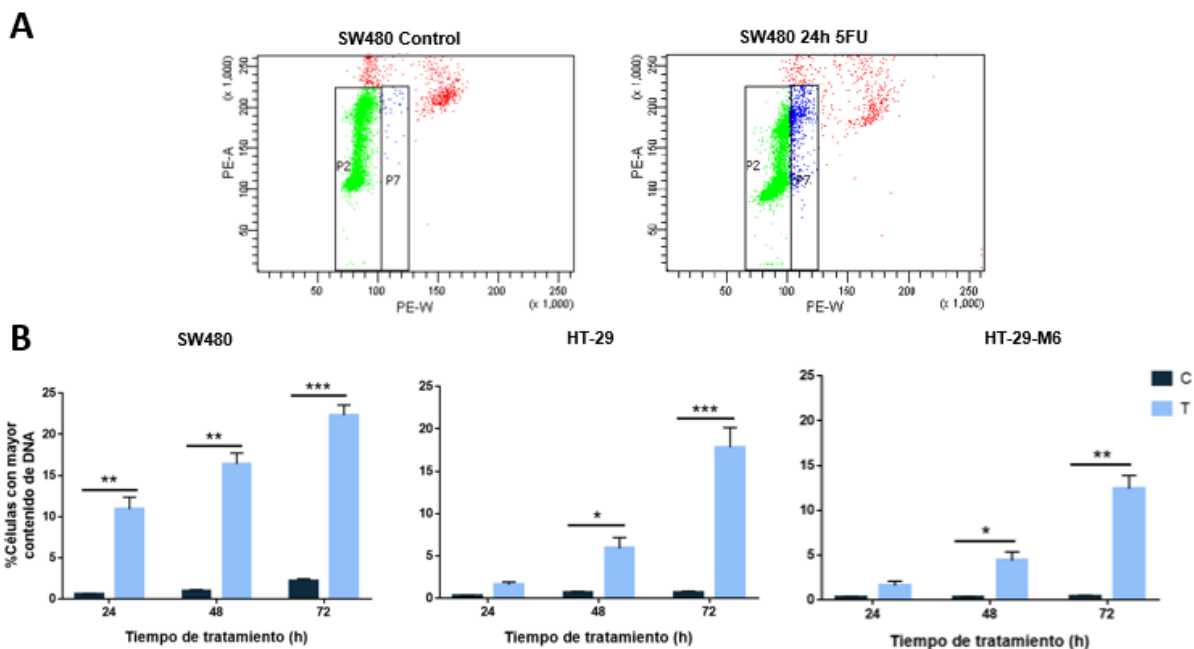


Figura 11. Distribución del ciclo celular en SW480, HT-29 y HT-29-M6 tratadas con 5-FU. (A) Imágenes representativas de la cuantificación de los porcentajes de células en división aberrante tras el tratamiento con 50 µM de 5-FU durante 24, 48 y 72 horas. Se ha seleccionado la población de células que se encuentra ciclando en las muestras control (verde) y se ha cuantificado el porcentaje de células cuyo contenido en DNA y tamaño ha aumentado tras el tratamiento (azul). En rojo, células excluidas de ambos análisis. (B) Porcentajes de células con mayor contenido en DNA tras el tratamiento administrado. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

Para determinar si las células bloqueadas en el ciclo celular finalmente morían, se realizó un análisis de viabilidad utilizando 50 μM de 5-FU durante 24, 48 y 72 horas. En la **Figura 12** se observa un aumento del número de células muertas conforme aumenta el tiempo de tratamiento en todas las líneas celulares testadas, siendo de nuevo SW480 la más resistente. Esto sugiere que, al aumentar la dosis administrada y el tiempo de tratamiento, el efecto del fármaco pasa de ser citostático a citotóxico, ya que las células quedan bloqueadas y no pueden dividirse o realizan divisiones aberrantes con el consiguiente aumento de la aneuploidía y /o poliploidía.

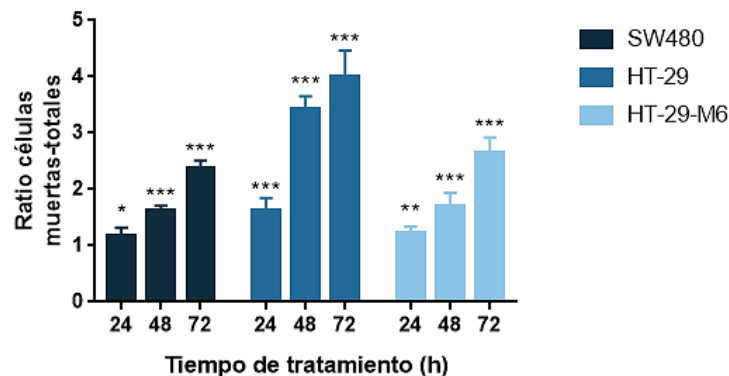


Figura 12. Viabilidad celular en las líneas celulares de CRC SW480, HT-29 y HT-29-M6 tratadas con 5-FU. A las células se les administró un tratamiento con 50 μM de 5-FU durante 24, 48 o 72 horas tras el cual se realizó el análisis de la viabilidad celular. Se representa la proporción de células muertas con respecto al número de células totales. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

La expresión de *IFITM1* y *-3* se relaciona con la resistencia a 5-FU en las líneas celulares de CRC

Para poder entender mejor el posible papel de los genes objetivo en la resistencia frente a fármacos en CRC, se analizó la expresión basal de los genes en las diferentes líneas celulares estudiadas mediante qPCR. (**Figura 13**). Los resultados muestran una mayor expresión de los genes *IFITM1* y *-3* en SW480, la línea celular más resistente al 5-FU. En el análisis se incluyó también la línea celular HT-29-M6, una variante de HT-29 con resistencia adquirida previamente a metotrexato. La expresión de *IFNGR1* es mayor en esta línea celular en comparación con las otras dos, mientras que la expresión de *IFITM1* y *-3* es muy reducida. Estos resultados sugieren que *IFITM1* y *-3* podrían estar relacionados con la resistencia a 5-FU, dada su mayor expresión en la línea celular más resistente, mientras que la alta expresión de *IFNGR1* podría estar relacionada con la resistencia a metotrexato. Ambos mecanismos, por tanto, podrían ser independientes, aunque serían necesarios más experimentos para esclarecer este punto. Cabe destacar que *IRF3*, *ISG15* y *MX1* se expresan más significativamente en HT-29, que es la más sensible al efecto antiproliferativo del 5-FU; mientras que estos genes se expresan menos en SW480, la más resistente a dicho efecto, y en HT-29-M6. La expresión de estos genes sugiere su posible relación con la sensibilidad de las líneas celulares, independientemente del tratamiento utilizado.

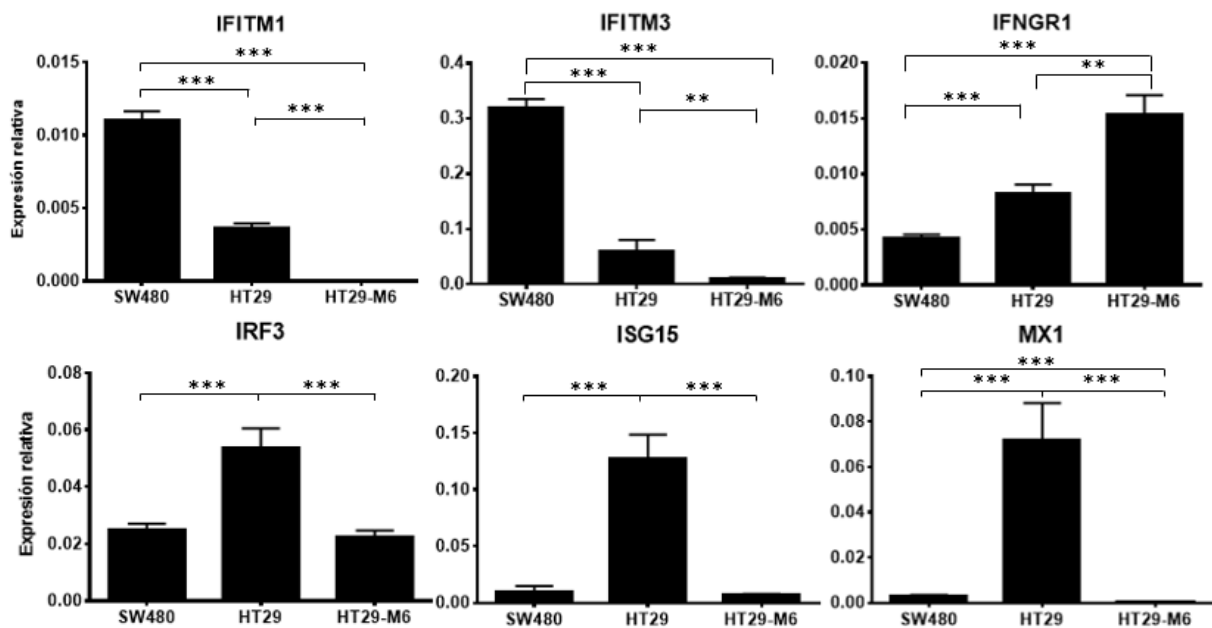


Figura 13. Expresión relativa de los genes objetivo en las líneas celulares de CRC. Niveles de expresión génica de *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en SW480, HT-29 y HT-29-M6. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

El silenciamiento de *IFITM1* e *IFITM3* no restaura la sensibilidad a 5-FU en las líneas celulares de CRC

Dado que la mayor expresión de *IFITM1* y -3 en la línea celular SW480 sugería un papel de dichos genes en la resistencia intrínseca a 5-FU, se procedió a realizar un análisis más detallado. Primeramente, la expresión de *IFITM1* fue silenciada mediante la transfección con siRNA antes de añadir el tratamiento con 5-FU (10 μ M), para posteriormente analizar la variación del efecto. Este estudio se realizó en las líneas celulares de CRC SW480 y HT-29 (**Figura 14**). En el análisis de expresión génica, mostrado en la **Figura 14A**, se observó que en la línea celular SW480 se obtuvo un silenciamiento de *IFITM1* de un 92% aproximadamente, mientras que en HT-29 la bajada en la expresión fue del 75%. El tratamiento con 5-FU de las células transfectadas de la línea SW480, no resultó en un cambio importante en la expresión del gen, que permaneció silenciado. Sin embargo, cabe destacar que el tratamiento en HT-29 dio lugar a un aumento de la expresión de *IFITM1* 4,7 veces mayor con respecto al control. Las variaciones en la distribución del ciclo celular fueron moderadas en ambos modelos celulares. Al evaluar las variaciones producidas en el ciclo celular, únicamente, en SW480 se observó un inesperado descenso del efecto del fármaco al silenciar la expresión de *IFITM1*, que se ve reflejada en una acumulación de células en fase S significativamente menor que la observada en el control. En HT-29 se observó un ligero aumento de la muerte celular, que no llegaba a ser significativo (**Figura 14B**). Teniendo en cuenta que la aplicación del fármaco resultó en un aumento en la expresión de *IFITM1* en las células transfectadas con un siRNA no específico y que, con respecto a ese control, las células silenciadas presentaban una reducción de casi un 400%, es difícil concluir si hay una relación causa-efecto entre el silenciamiento de *IFITM1* y el efecto del 5-FU en HT-29.

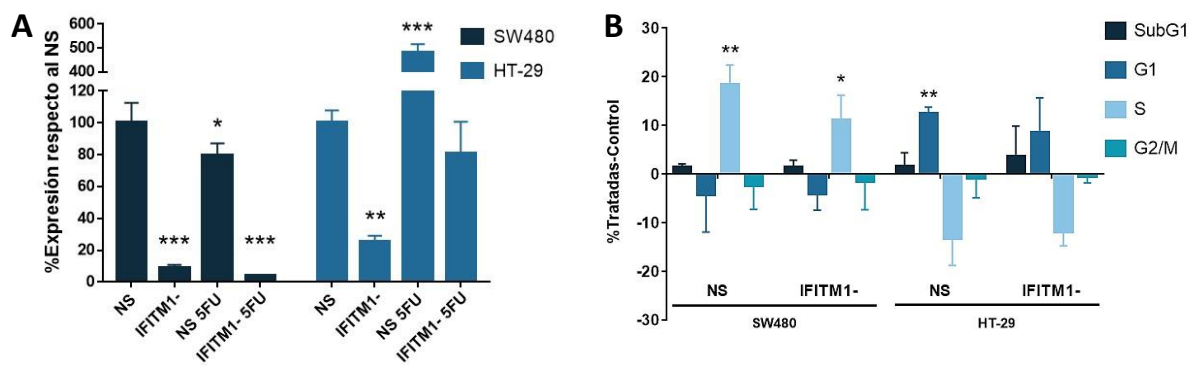


Figura 14. Efecto del 5-FU tras el silenciamiento de *IFITM1* en las líneas parentales de carcinoma colorrectal SW480 y HT-29. (A) Expresión diferencial de *IFITM1* tras el silenciamiento de este en ambos modelos celulares. (B) Distribución del ciclo celular tras realizar el silenciamiento del gen y añadir el tratamiento con 10 μ M de 5-FU en ambas líneas celulares. Se representa el porcentaje de células tratadas tras restar el porcentaje de células totales del control. NS, células transfectadas con un siRNA no específico, IFITM1-, células transfectadas con un siRNA frente a *IFITM1*. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

Para poder entender mejor el efecto provocado tras el silenciamiento de *IFITM1*, se analizaron los cambios en la expresión de los genes objetivo. En la **Figura 15** se muestra dicha variación en la línea parental SW480. El silenciamiento de *IFITM1* resultó en una disminución de la expresión de *IFITM3* muy similar a la ocurrida con *IFITM1*, siendo en ambos casos una reducción de aproximadamente el 90%. Esto sugiere que *IFITM1* podría regular los niveles de expresión de *IFITM3*. En cambio, la variación de la expresión génica tras el tratamiento con 5-FU y el silenciamiento de *IFITM1* en el resto de los genes fue variable. Al tratar las células con 5-FU, se produjo un aumento sustancial de la expresión de *IFNGR1* y de *MX1*. En el caso de *IFNGR1*, dicho aumento de la expresión fue más pronunciado al silenciar la expresión del gen *IFITM1*, mientras que en *MX1* sucedió lo contrario. Con respecto al gen *ISG15*, el silenciamiento de *IFITM1* causó un aumento de su expresión que se hizo más notable al añadir el tratamiento con 5-FU. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de *IRF3*.

Con el objetivo de estudiar la posible relación de *IFITM3* con la adquisición de resistencia a 5-FU, se realizó un silenciamiento de su expresión mediante siRNA, seguido del tratamiento con 5-FU (**Figura 16**). Para comprobar el grado de silenciamiento de *IFITM3* en ambas líneas celulares, se evaluaron sus niveles de expresión (**Figura 16A**). El análisis reveló que, a diferencia de lo que ocurría con *IFITM1*, solamente HT-29 presentaba una reducción significativa del 50% en la expresión del gen. Sin embargo, la expresión de *IFITM3* disminuyó solo en un 30% en SW480. Es interesante comentar que, cuando se trató con 5-FU, de forma similar a lo ocurrido con *IFITM1*, la expresión de *IFITM3* aumentó significativamente con respecto al control, aproximadamente un 140% en SW480 y un 415% en HT-29. Este aumento de la expresión quedó bloqueado con transfección del siRNA dirigido al gen. No obstante, los niveles de expresión en ambos casos no disminuyeron significativamente con respecto al control sin tratar. Al analizar la variación del ciclo celular, no se observaron cambios en el

efecto del fármaco en SW480 tras el silenciamiento del gen, mientras que sí hubo diferencias significativas en HT-29, donde el efecto disminuyó (**Figura 16B**). Lejos de arrojar luz al papel que juegan *IFITM1* y -3 en la resistencia a fármacos, estos experimentos demuestran que se trata de un mecanismo complejo que requiere de un estudio mucho más profundo.

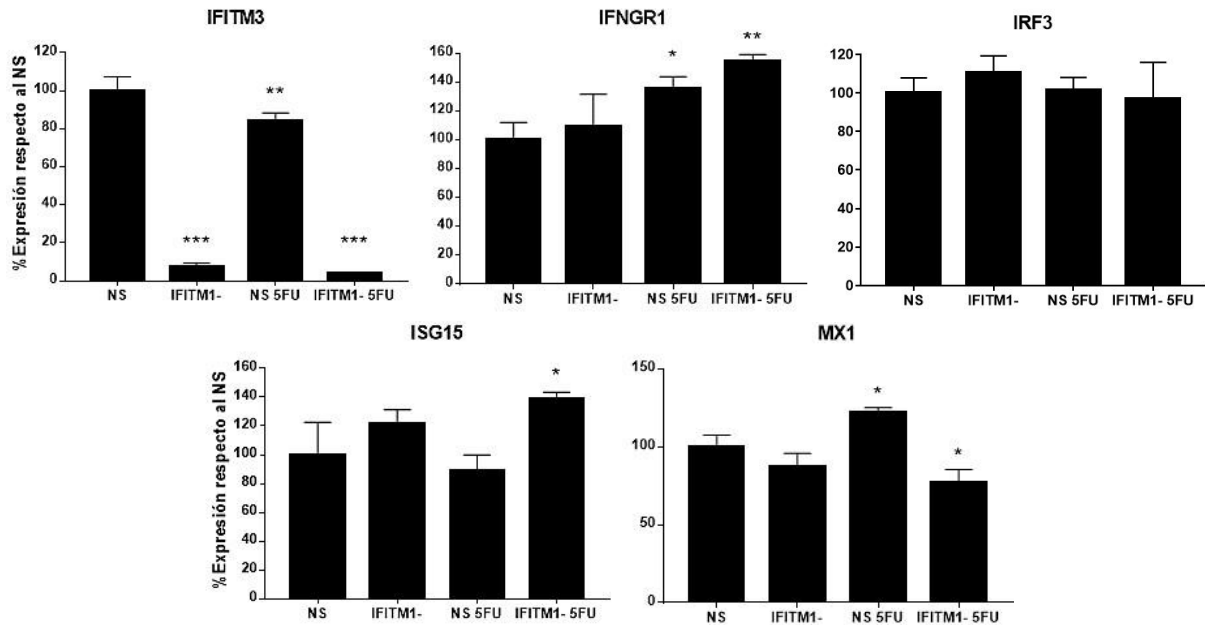


Figura 15. Expresión relativa de los genes objetivo tras el silenciamiento de *IFITM1* en SW480. Niveles de expresión génica de *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en SW480 tras el silenciamiento con un siRNA dirigido a *IFITM1*. Además, las células fueron tratadas con 10 μ M de 5FU. NS, células transfectadas con un siRNA no específico; IFITM1-, células transfectadas con siRNA frente a *IFITM1*. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

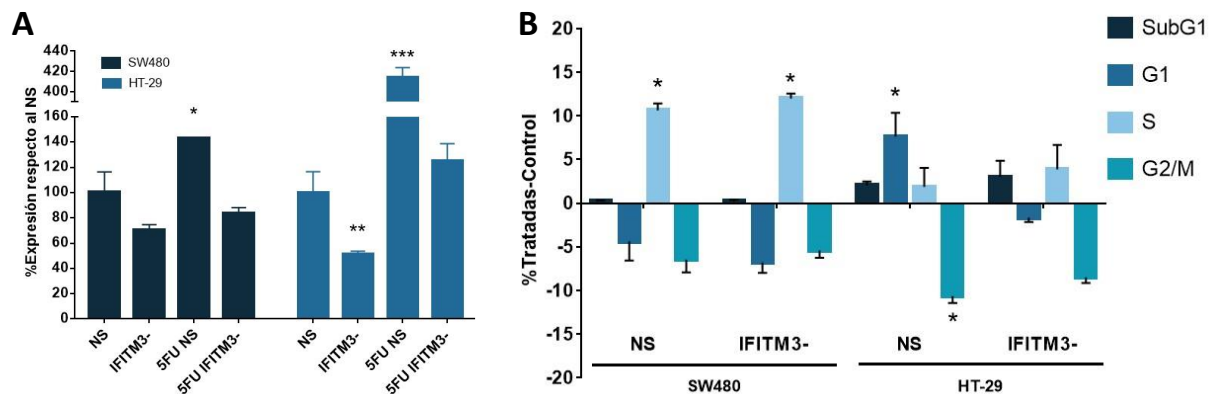


Figura 16. Efecto del 5-FU tras el silenciamiento de *IFITM3* en las líneas parentales de carcinoma colorrectal SW480 y HT-29. (A) Expresión diferencial de *IFITM3* tras el silenciamiento de este en ambos modelos celulares. (B) Distribución del ciclo celular tras realizar el silenciamiento del gen y añadir el tratamiento con 10 μ M de 5-FU en ambas líneas celulares. Se representa el porcentaje de células tratadas tras restar el porcentaje de células totales del control. NS, células transfectadas con un siRNA no específico; IFITM3-, células transfectadas con un siRNA frente a *IFITM3*. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

El tratamiento periódico con dosis altas de 5-FU favorece la aparición de células aberrantes

Puesto que la relación entre la expresión de *IFITM1* y la resistencia intrínseca a 5-FU presente en SW480 no había sido esclarecida, se decidió generar sublíneas celulares a partir de SW480, con

resistencia creciente al fármaco mediante presión selectiva, para determinar el posible papel de *IFITM1* en el mecanismo de adquisición de dicha resistencia.

Existen dos grupos de sublíneas divididos según el enfoque experimental utilizado para establecer la resistencia. Por un lado, se aplicó una dosis inicial muy alta de 5-FU durante un período corto, las poblaciones que sobrevivieron a ese tratamiento y recuperaron la capacidad proliferativa fueron sometidas periódicamente a dosis crecientes de fármaco. Este grupo de sublíneas se nombró Tratamiento agudo X (TaX, siendo X la dosis administrada en el momento experimental correspondiente). Por otro lado, partiendo de la línea celular parental, las células fueron seleccionadas por presión selectiva con concentraciones crecientes de 5-FU desde el inicio, y se nombraron Tratamiento crónico X (TcX, siendo X la dosis administrada en el momento).

Las células de SW480 se trataron con concentraciones de 5-FU entre 0,25 y 50 μM y se mantuvieron 72 horas con el tratamiento (**Figura 17**). La resistencia adquirida se analizó mediante ensayos de proliferación celular. Se observó que, independientemente de la vía experimental seguida, ambos grupos aumentaban su resistencia al fármaco conforme se les incrementaba la concentración administrada periódicamente en el frasco de cultivo.

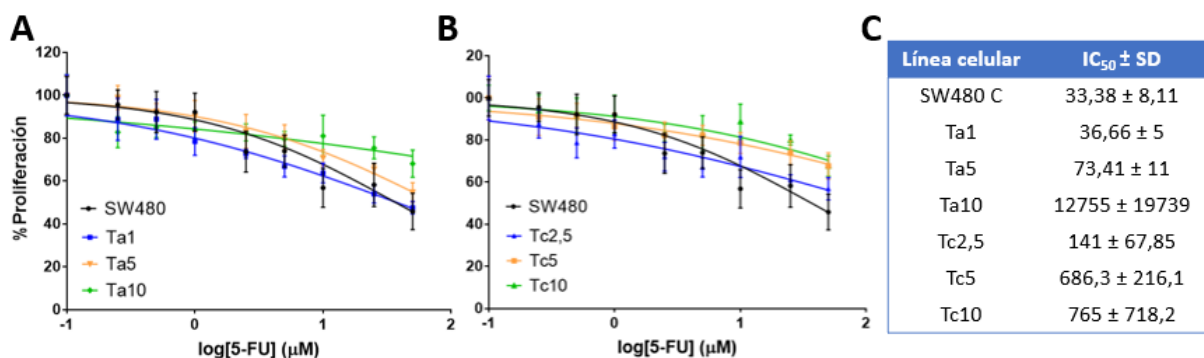


Figura 17. Ensayos dosis-respuesta con 5-FU en las sublíneas resistentes de SW480. Porcentaje de proliferación celular representado con respecto al logaritmo de la concentración de 5-FU (μM) en las sublíneas resistentes que recibieron el tratamiento agudo inicial (A) y las que fueron periódicamente tratadas (B). (C) Valores de IC₅₀ de la línea parental y las sublíneas celulares. C, control; SD, desviación estándar; Ta, células que inicialmente recibieron una dosis aguda de fármaco; Tc células que recibieron tratamiento de forma crónica.

También se observó que, en las sublíneas celulares de SW480, al aumentar la concentración de 5-FU añadida periódicamente a los frascos de cultivo, la morfología de las células iba cambiando. Como se muestra en la **Figura 18**, las células aumentaron de tamaño, conteniendo un mayor número de núcleos y también empezaron a aparecer vacuolas en su interior, en concordancia clara con el aumento en el contenido de DNA observado en los estudios de ciclo celular (**Figura 11**).

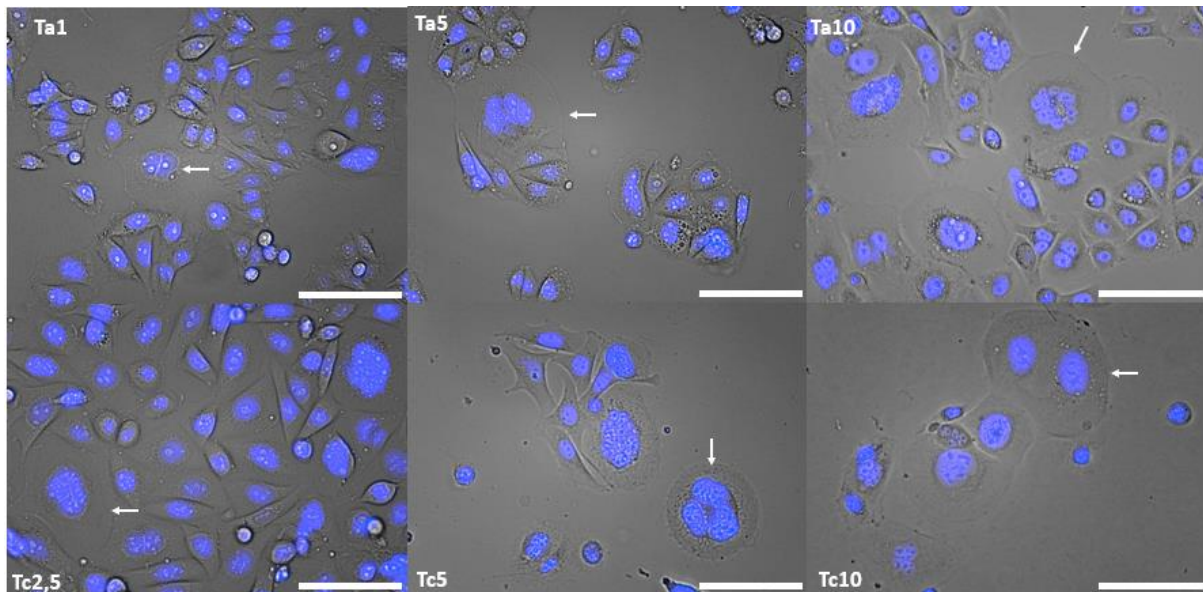


Figura 18. Imágenes de las diferentes sublíneas resistentes de SW480. Cada imagen fue tomada con campo claro para visualizar la membrana y se superpuso la imagen de los núcleos marcados con Hoescht. Las flechas blancas indican la presencia de células multinucleadas y con un crecimiento aberrante. Esta morfología es más notable cuanto mayor es la concentración de fármaco suministrada. Ta, células que inicialmente recibieron una dosis aguda de fármaco; Tc células que recibieron tratamiento de forma crónica. Barra de escala: 100 μ m.

Elevada expresión de *IFITM1* inicial tras el tratamiento agudo con 5-FU en las sublíneas celulares de CRC

Tal y como se realizó en las muestras basales de las líneas celulares, se analizó la variabilidad de la expresión génica relativa de los genes objetivo para cada una de las sublíneas resistentes generadas (**Figura 19**). Los valores de *IFITM1* y *-3* aumentaron significativamente en las células que recibieron el Ta, especialmente al inicio de la presión selectiva. En cambio, la expresión de *IFNGR1* aumentó en las dosis altas de las células Ta, lo que puede sugerir la activación de otra vía relacionada con IFN en la adquisición de la resistencia. De esta forma, la vía de transducción del IFN- α sería importante al inicio, dejando paso después a la vía del IFN- γ . Por otro lado, la expresión de *ISG15* y *MX1* disminuyó, generalmente, en los modelos más resistentes. Interesantemente, los patrones de expresión de los genes objetivo eran diferentes en los dos modelos de adquisición de resistencia, el agudo y el crónico. Esto sugiere la existencia de, al menos, dos mecanismos de adquisición de resistencia adicional al 5-FU en la línea SW480, con una participación diferencial de los genes objetivo en cada modelo.

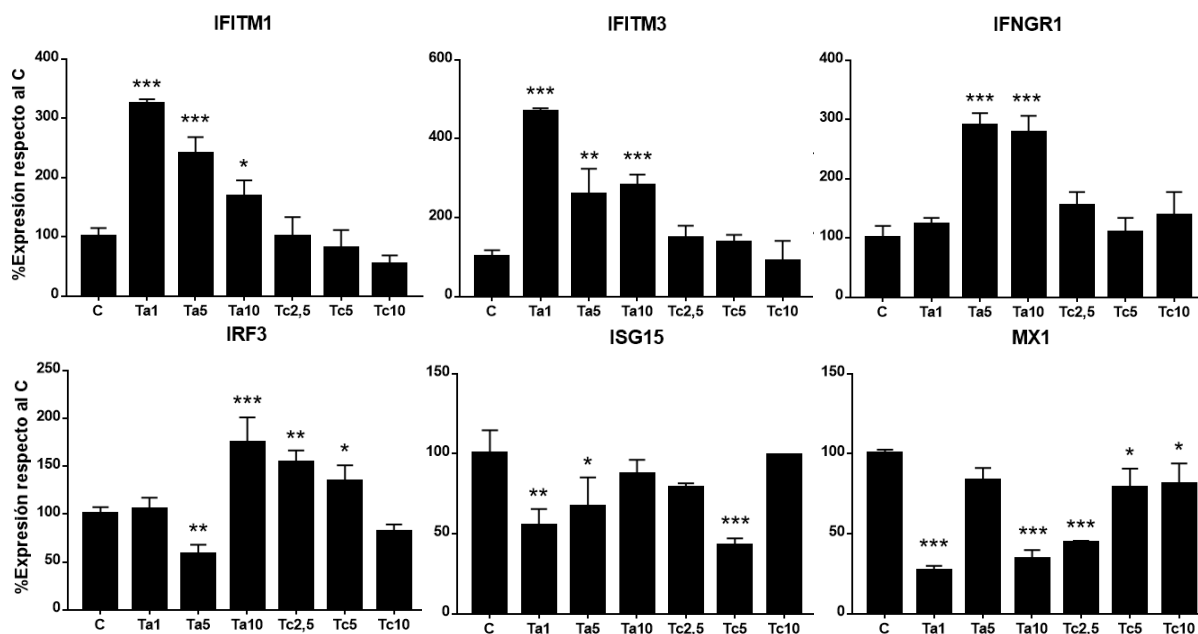


Figura 19. Expresión relativa de los genes objetivo en las sublíneas celulares de SW480. Niveles de expresión génica de *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en las sublíneas resistentes a 5FU adquiridas a partir de SW480. C, control; Ta, células que inicialmente recibieron una dosis aguda de fármaco; Tc células que recibieron tratamiento de forma crónica. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

El silenciamiento de *IFITM1* potencia el efecto antiproliferativo del 5-FU en las sublíneas celulares resistentes de CRC

Los niveles de *IFITM1* aumentan significativamente en algunas de las sublíneas resistentes a 5-FU (**Figura 19**). Para comprobar si es posible recuperar la sensibilidad al fármaco modificando la expresión de *IFITM1*, se silenció su expresión mediante siRNA. Primero se analizaron las variaciones del ciclo celular para entender las repercusiones del silenciamiento de *IFITM1*. Se observó que esta manipulación disminuía el bloqueo en la fase S únicamente en la sublínea Ta1, siendo los cambios muy ligeros en Tc5, mientras que en Ta5 no se produjeron modificaciones en el ciclo celular (**Figura 20A**). Seguidamente, se repitieron las transfecciones frente a *IFITM1*, analizando esta vez los resultados mediante ensayos de proliferación celular (**Figura 20B**). Este tipo de ensayo resultó en un efecto del silenciamiento de *IFITM1* mucho mayor que el observado anteriormente. Se produjo una disminución de la proliferación celular significativa por sí mismo, y al añadir el tratamiento el efecto antiproliferativo se incrementó siendo este cambio más notable con el gen silenciado.

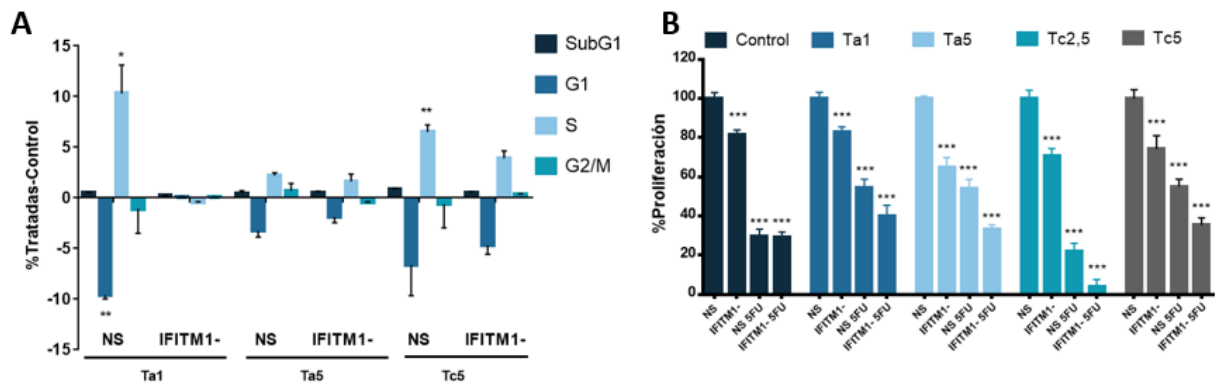


Figura 20. Efecto del 5-FU tras la supresión de *IFITM1* en las sublíneas de SW480 resistentes a fármaco. (A) Distribución del ciclo celular tras el silenciamiento de *IFITM1* y el tratamiento con 10 μ M de 5-FU. Se representa el porcentaje de células tratadas tras restar el porcentaje de células totales del control. (B) Ensayos de proliferación celular mediante MTT de las sublíneas resistentes a fármaco transfectadas con un siRNA frente a *IFITM1* y tratadas con 10 μ M de 5-FU. NS, células transfectadas con un siRNA no específico; IFITM1-, células transfectadas con un siRNA frente a *IFITM1*; Ta, células que inicialmente recibieron una dosis aguda de fármaco; Tc células que recibieron tratamiento de forma crónica. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

La elevada expresión de *IFITM1* y -3 se correlaciona con una mayor resistencia intrínseca a 5-FU en PAAD

Para entender si el papel de los genes objetivo en la resistencia a 5-FU estaba o no restringido al CRC, se decidió ampliar el estudio a otro tipo de tumor de mal pronóstico y relacionado con el desarrollo de resistencia a las terapias, como el adenocarcinoma de páncreas exocrino (PAAD, del inglés *pancreatic adenocarcinoma*).

Debido a que el 5-FU era el fármaco utilizado en el tratamiento estándar de PAAD, hasta que fue sustituido por la Gemcitabina (Burris *et al.*, 1997), se analizó la posible resistencia a este fármaco. Para ello, se analizó la variación de la distribución del ciclo celular en las líneas celulares M220, Hs766T y RWP1 (**Figura 21**). Las células se mantuvieron durante 24 horas con 10 μ M de 5-FU, resultando en un efecto citostático bloqueando el ciclo celular en la fase G1. Este efecto solo fue significativo en M220 y RWP1, sugiriendo que Hs766T es más resistente al fármaco.

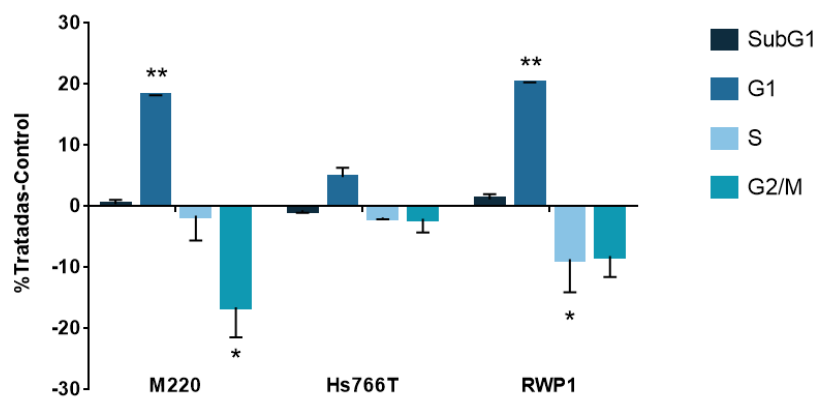


Figura 21. Distribución del ciclo celular en M220, Hs766T y RWP1 tratadas con 5-FU. Las células fueron tratadas con 10 μ M de 5-FU durante 24 horas. Se representa la diferencia entre el porcentaje de células tratadas y las células control en cada fase del ciclo celular. * p-valor<0,05 y ** p-valor<0,01.

Se estudiaron los niveles basales de la expresión relativa de los genes objetivo en las tres líneas celulares pancreáticas mediante qPCR (**Figura 22**). En consonancia con los resultados obtenidos en el ciclo celular (**Figura 21**), y al igual que ocurría en el CRC, los genes *IFITM1* y *-3* estaban más expresados en Hs766T, el modelo celular más resistente a 5-FU. Es interesante destacar que *IFNGR1* se expresaba significativamente más en Hs766T. Esto implicaría que el mecanismo de resistencia a los tratamientos en el caso del PAAD, no es dual como ocurre en el CRC. Si bien un estudio más exhaustivo sería necesario para poder describir este proceso de forma concreta. Finalmente, las líneas celulares sensibles al fármaco, RWP1 y M220, presentaron un patrón de expresión variable respecto a los genes *IRF3*, *ISG15* y *MX1*. RWP1 presentó una elevada expresión del gen *IRF3* con respecto a las otras dos líneas celulares, mientras que M220 tenía sobreexpresados los genes *ISG15* y *MX1*. Por tanto, estos resultados sugieren que *IFITM1* y *-3* tienen una relación con la resistencia a 5-FU, sin embargo, los genes *IRF3*, *ISG15* y *MX1* no han mostrado una expresión diferencial que pueda indicar un papel principal en la resistencia intrínseca a 5-FU. Así pues, un estudio más profundo sería necesario para elucidar la implicación de estos genes en dicho mecanismo.

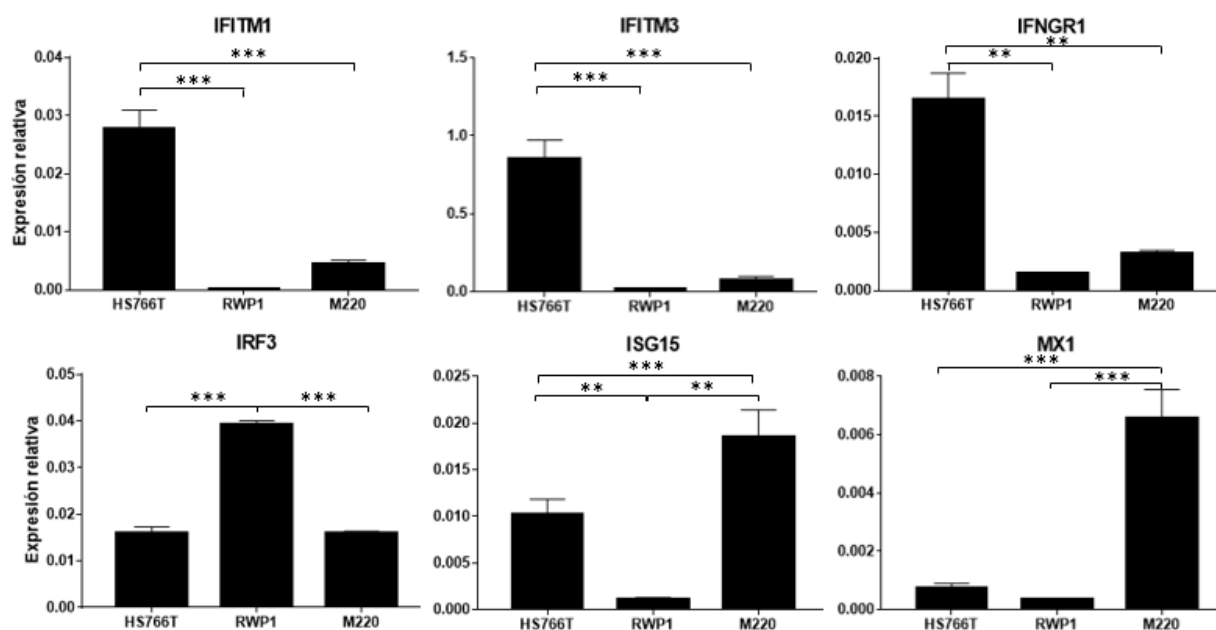


Figura 22. Expresión relativa de los genes objetivo en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino. Niveles de expresión génica basal de *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en Hs766T, RWP1 y M220. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

La expresión de *IFITM1* tiende a ser mayor en líneas tumorales resistentes a BCNU en GBM

Como modelos celulares de un tipo de tumor de origen no epitelial, se decidió incluir el GBM, en el que se utiliza como tratamiento estándar BCNU o TMZ. El grupo de investigación del Dr. Miguel Saceda dispone de una colección de líneas celulares de GBM establecidas a partir de muestras de

pacientes en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE), que fueron las utilizadas en este estudio.

Con el fin de establecer la relación entre la resistencia y la expresión de los genes objetivo en GBM, las líneas celulares fueron tratadas con BCNU. En un trabajo previo del grupo, ya se había analizado la muerte celular inducida por 50 μ M de BCNU en las diferentes líneas celulares de glioblastoma (**Tabla 3**) (Ventero *et al.*, 2019). Los resultados revelaron que HGUE-GB-16 es la más resistente al tratamiento con BCNU, mientras que HGUE-GB-42 es la más sensible.

| Línea celular | Células muertas (%) \pm SD |
|---------------|------------------------------|
| HGUE-GB-16 | 12,6 \pm 2,3 |
| HGUE-GB-40 | 19,5 \pm 1,1 |
| HGUE-GB-39 | 25,2 \pm 1,8 |
| HGUE-GB-48 | 27,9 \pm 2,1 |
| HGUE-GB-37 | 35,1 \pm 2,2 |
| HGUE-GB-42 | 49,9 \pm 3,7 |

Tabla 3. Porcentaje de muerte celular inducida por BCNU en modelos celulares de glioblastoma multiforme. Niveles de muerte celular inducida por 50 μ M de BCNU en los diferentes modelos celulares de glioblastoma. Los datos son de un estudio previo del grupo, modificados de (Ventero *et al.*, 2019). SD, desviación estándar.

Una vez determinados los niveles de sensibilidad a BCNU de las líneas celulares de GBM a nivel basal, se realizó el análisis de la variación de los genes objetivo en las células de GBM con el fin de poder establecer una relación (**Figura 23**). En dicho análisis también se incluyó una muestra de un *pool* de tejido cerebral sano. Los resultados indicaron que no había una correlación entre los niveles de expresión de los distintos genes en las líneas de GBM y su porcentaje de muerte celular. No obstante, los niveles de *IFITM1* indicaron una posible tendencia a sobreexpresarse en líneas más resistentes a BCNU. Cabe destacar la baja expresión del gen *MX1* en las diferentes líneas celulares de GBM en comparación con el tejido de cerebro normal. Hecho que también ocurrió, aunque en menor grado, con la expresión de *IFITM1*, *IFITM3* e *IFNGR1*, con la excepción de HGUE-GB-37 en estos dos últimos genes. De nuevo, la expresión de *IFITM1* e *IFITM3* fue mayor en la línea celular más resistente comparada con la más sensible, aunque la variación en la expresión de estos genes en las distintas líneas celulares era muy alta y no permite extraer conclusiones. La variación observada es también evidente si estudiamos la expresión de estos genes en la base de datos UALCAN (**Figura S1**). Para poder extraer una conclusión más clara sería necesario determinar la expresión en la línea celular obtenida de cada paciente con respecto a la expresión en tejido no tumoral del propio paciente.

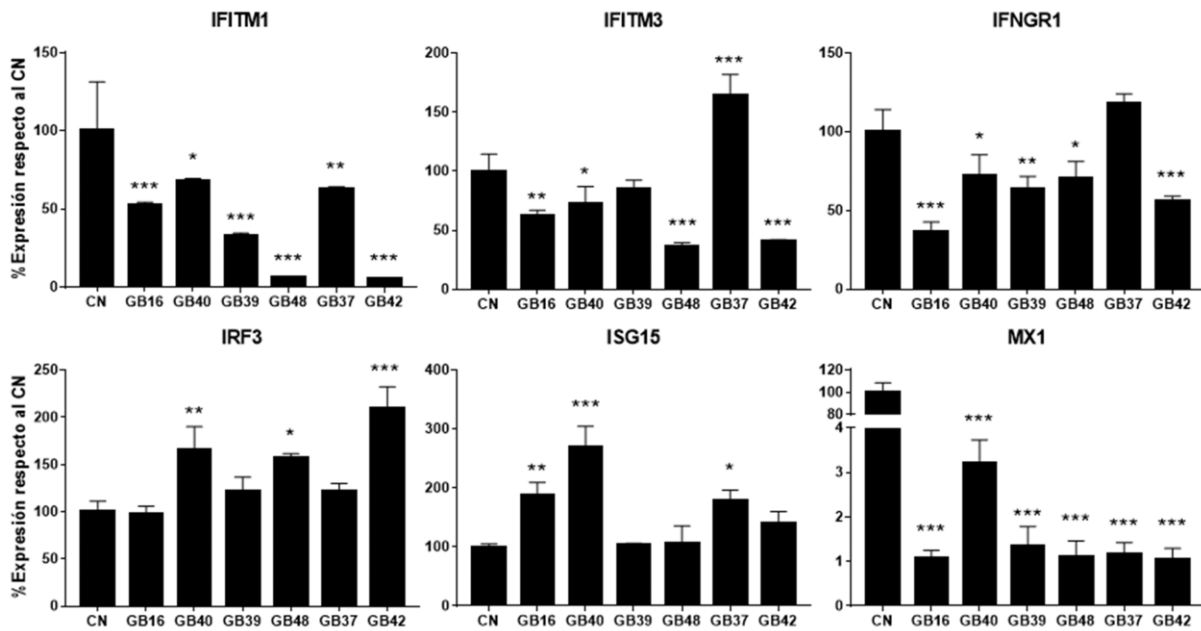


Figura 23. Expresión relativa de los genes objetivo en las líneas celulares de glioblastoma multiforme. Análisis de la expresión génica basal de *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en los modelos celulares establecidos por el grupo. CN, cerebro normal. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

IFITM1 y -3 aumentan su expresión en las sublíneas celulares de GBM resistentes a BCNU

Con el fin de profundizar en la relación entre la expresión de los genes objetivo y la adquisición de resistencia en nuestros modelos celulares de GBM, se utilizó la línea celular HGUE-GB-39 para generar sublíneas resistentes a BCNU. Las células fueron tratadas progresivamente con concentraciones crecientes de fármaco y la resistencia lograda se estudió mediante ensayos de proliferación celular. Las concentraciones de BCNU que se utilizaron para dicho estudio comprendían un rango entre 1 y 100 μM , tratamiento que se mantuvo durante 72 horas (**Figura 24**). Los resultados mostraron un efecto antiproliferativo dependiente de concentración, confirmando la sublínea T2,5 como la más resistente a BCNU.

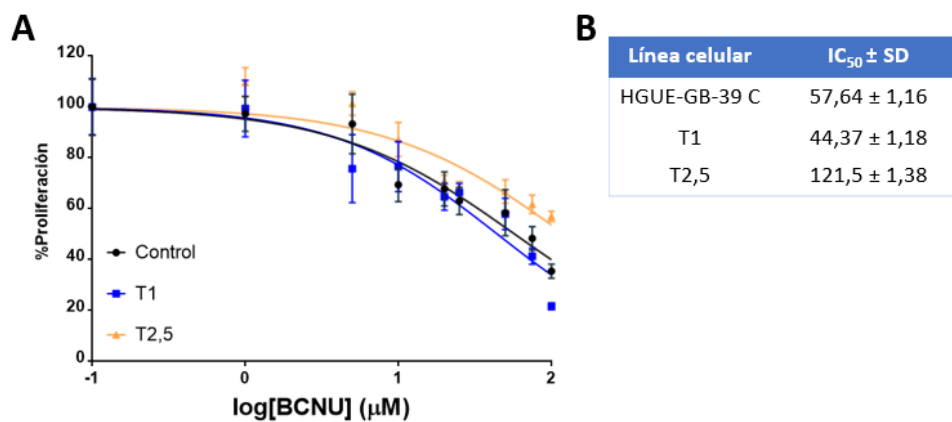


Figura 24. Ensayos dosis-respuesta con BCNU en las sublíneas resistentes de HGUE-GB-39. (A) Porcentaje de proliferación celular representado con respecto al logaritmo de la concentración de BCNU (μM) en las sublíneas resistentes que fueron periódicamente tratadas. (C) Valores de IC₅₀ de la línea parental y las sublíneas celulares. C, control; SD, desviación estándar.

Se analizó la variación génica de los genes objetivo en las sublíneas resistentes de GBM mediante qPCR. En la **Figura 25** puede observarse que los niveles de expresión de los genes objetivo están directamente correlacionados con el aumento de la concentración de BCNU. Cabe destacar la elevada expresión de *IFITM1* en las células sometidas a mayor dosis de tratamiento. La expresión de *IFITM3* también se encuentra elevada a concentraciones de 2,5 μ M de BCNU. La tendencia ascendente, también se puede visualizar en los niveles de *ISG15* y *MX1*, aunque a menor escala. Sin embargo, *IFNGR1* e *IRF3* están inversamente correlacionados con el incremento de la dosis de fármaco. Aunque no es una variación significativa, es destacable como en la dosis baja de BCNU, *IFITM1* y -3 disminuyen su expresión mientras que *IFNGR1* la aumenta; al incrementar la dosis ocurre lo contrario, un aumento de *IFITM1* y -3 y un descenso de *IFNGR1*. Esto puede indicar la implicación inicial de la vía de transducción de IFN- γ y un posterior cambio a la vía de IFN- α al aumentar la concentración de BCNU. Hecho que, aunque a la inversa, también se observó en las sublíneas Ta de CRC (**Figura 19**). Los resultados indican que los genes objetivo del proyecto también sufren modificaciones significativas de expresión que están relacionadas, en un sentido u otro, con la adquisición de resistencia a BCNU en GBM.

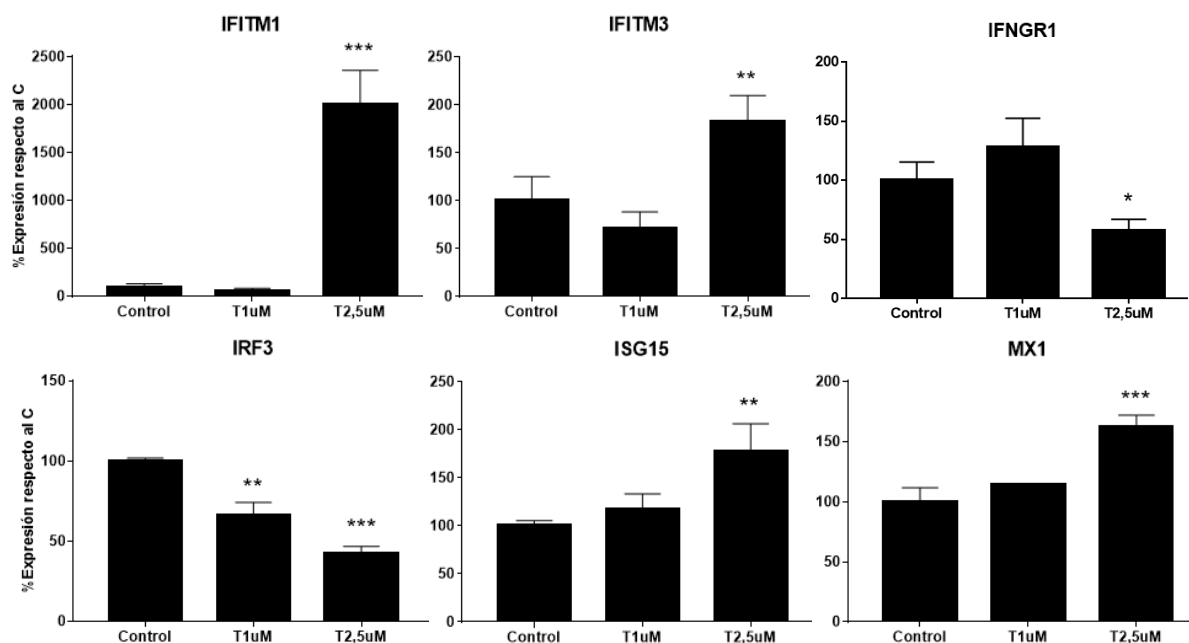


Figura 25. Expresión relativa de los genes objetivo en las sublíneas resistentes de HGUE-GB-39. Niveles de expresión génica de *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en las sublíneas resistentes a BCNU adquiridas a partir de HGUE-GB-39. T, células fueron tratadas crónicamente con la concentración indicada. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

No hay una clara una relación causa-efecto entre la sobreexpresión de *IFITM1* y la resistencia a fármacos en modelos tumorales de mal pronóstico

Con el fin de elucidar el efecto que tendría el tratamiento con fármaco en líneas de GBM y PAAD con distintos niveles de *IFITM1*, se hicieron ensayos de citometría de flujo tras silenciar el gen.

Para el estudio de GBM, se utilizaron las líneas celulares HGUE-GB-39 parental y su respectiva sublínea resistente T2,5. Además, se añadió HGUE-GB-40, ya que presentaba una mayor expresión basal de *IFITM1*. En el estudio de PAAD se utilizaron las líneas celulares Hs766T, que posee la mayor resistencia y donde se encontró mayor expresión de *IFITM1*, y RWP1, que es la más sensible y con menor expresión del gen. Para los ensayos con células de GBM se añadió una concentración de 50 μ M de BCNU, mientras que en las pancreáticas se utilizaron 10 μ M de 5-FU. Los resultados del análisis de expresión génica muestran que se ha conseguido el silenciamiento del gen *IFITM1* en HGUE-GB-40 (87%) y Hs766T (64%). Cabe destacar que en la línea celular RWP1 los niveles basales de *IFITM1* eran muy inferiores con respecto a Hs766T (**Figura 22**), lo que pueda reflejar que su expresión solamente bajara alrededor de un 44% tras la transfección. Tras la aplicación del tratamiento correspondiente, solo en la línea celular Hs766T aumentaron los niveles de expresión de *IFITM1* de forma significativa en las células transfectadas con un siRNA no específico (**Figura 26A**). Los modelos utilizados de GBM (**Figura 26B**) y de PAAD (**Figura 26C**) no presentaron cambios significativos en la sensibilidad al fármaco tras el silenciamiento de *IFITM1*, únicamente en RWP1 se observaron ligeras variaciones en la redistribución de las células en el ciclo celular. No obstante, debido a la clarísima diferencia entre los resultados obtenidos en los estudios del ciclo celular y los ensayos de proliferación en la línea SW480 (**Figura 20**), sería aconsejable analizar los efectos de los tratamientos mediante ensayos de proliferación celular tras realizar los experimentos de silenciamiento de *IFITM1* en las líneas de PAAD y GBM.

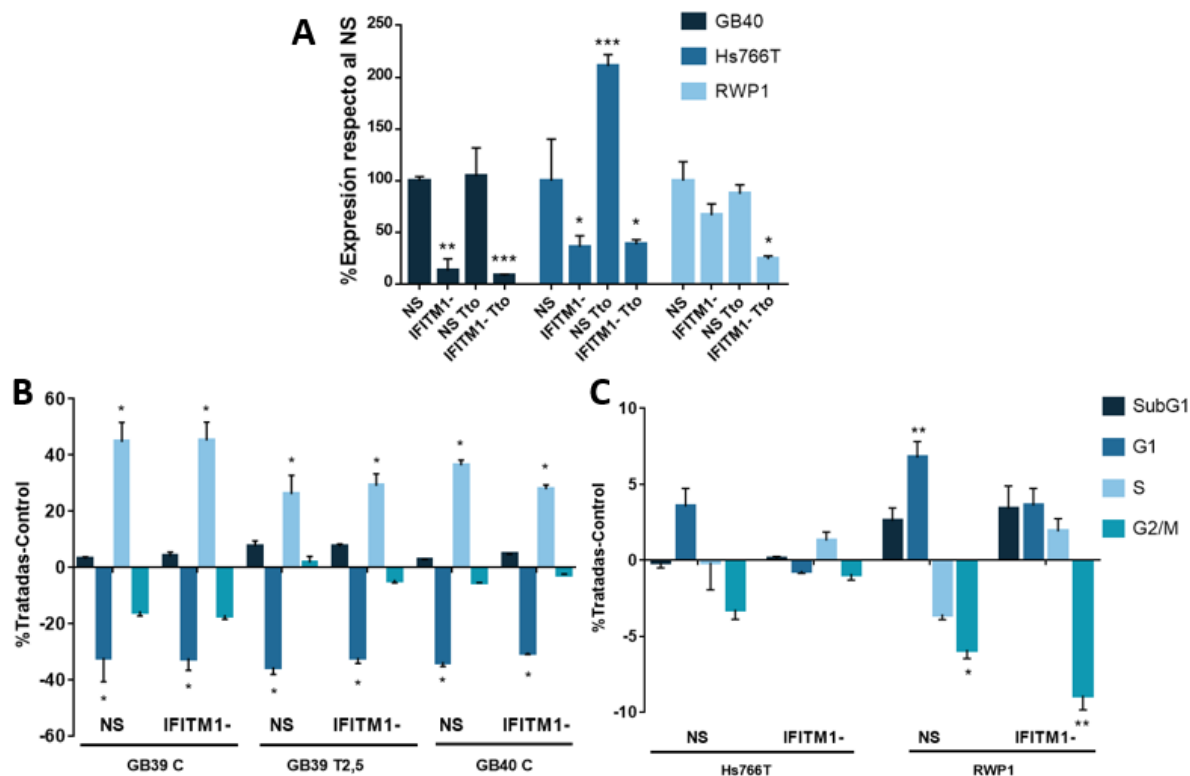


Figura 26. Efecto del fármaco correspondiente en la distribución del ciclo celular tras la supresión de IFITM1. (A) Expresión diferencial de *IFITM1* tras el silenciamiento de este en las líneas celulares HGUE-GB-40, Hs766T y RWP1. (B) Distribución del ciclo celular tras el silenciamiento de *IFITM1* y el tratamiento con 50 μ M de BCNU en las líneas celulares parentales de GBM HGUE-GB-39 y HGUE-GB-40 y la sublínea resistente a BCNU, HGUE-GB-39 T2,5. (C) Estudio de los modelos celulares de PAAD Hs766T y RWP1 transfectados con un siRNA frente a *IFITM1* y tratados con 10 μ M de 5-FU. Se representa el porcentaje de células tratadas tras restar el porcentaje de células totales del control. NS, células transfectadas con un siRNA no específico; IFITM1-, células transfectadas con un siRNA frente a *IFITM1*; Tto, tratamiento correspondiente. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

El tratamiento con VPF no modifica sustancialmente la expresión de IFITM1 en modelos tumorales

Según los datos obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Luís Pérez (proyecto SARCOVIR), que el verteporfin (VPF) aumentaba los niveles de expresión de IFITM1 en líneas celulares de peces. Nos preguntamos si este aumento se podría producir también en las líneas celulares de nuestros modelos de cáncer y si tendría un impacto en la resistencia a fármacos de los mismos. Por otro lado, está demostrado que el VPF es capaz de inducir efectos antiproliferativos gracias a que bloquea un componente de la vía Hippo, la proteína YAP1 (del inglés, yes-associated protein 1). Además, es capaz de fotoactivarse con luz roja liberando radicales libres lo que induciría la muerte celular por estrés oxidativo (Brodowska et al., 2014).

Inicialmente se determinaron las concentraciones en las que el VPF tenía efectos antiproliferativos por sí mismo en los siguientes modelos celulares: SW480, HT-29, HT-29-M6 y HGUE-GB-39 (**Figura 27**). Las células se trataron con dosis crecientes de VPF en un rango de concentraciones de: 0,75 a 15 μ M en el caso de las líneas celulares de CRC; y 0,1 a 10 μ M en HGUE-GB-39. Aunque en las cuatro líneas celulares el efecto antiproliferativo era dependiente de la

concentración, los valores de IC₅₀ muestran que la línea de GBM es más sensible al efecto del fármaco que las de CRC en donde el efecto es similar.

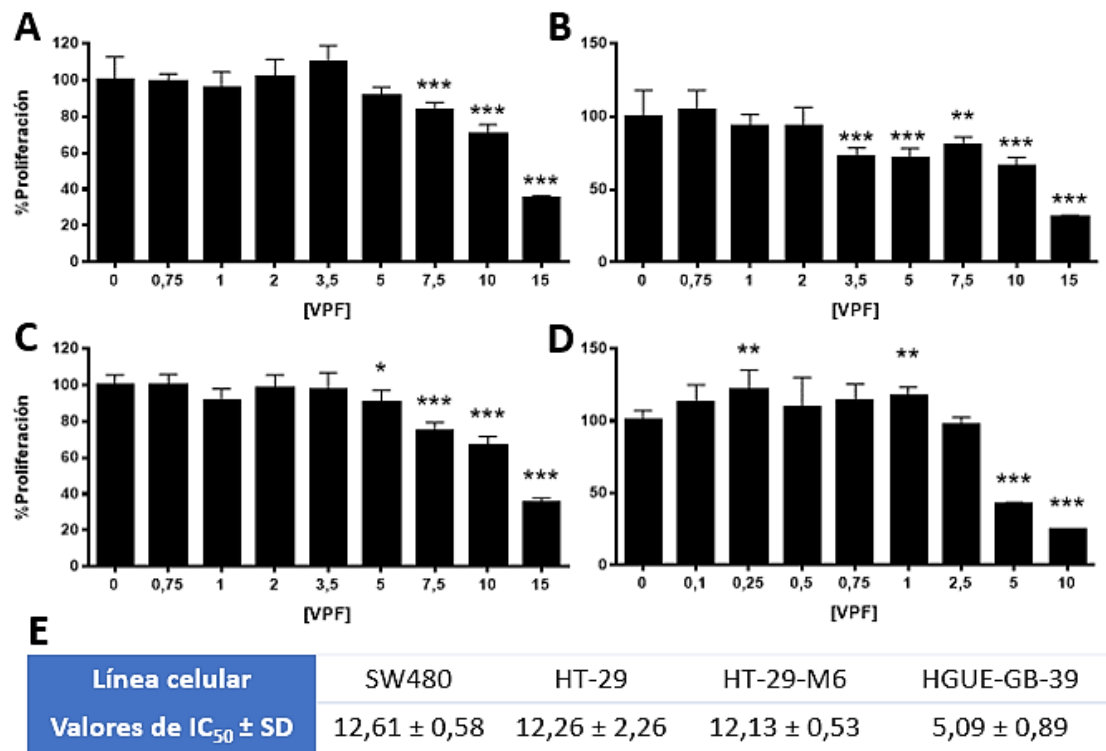


Figura 27. Ensayos dosis-respuesta con VPF en las líneas celulares SW480, HT-29, HT-29-M6 y HGUE-GB-39. Porcentaje de proliferación celular representado con respecto a la concentración de VPF (μM) en las líneas celulares de CRC SW480 (A), HT-29 (B) y HT-29-M6 (C), así como en el modelo celular de GBM HGUE-GB-39 (D). (E) Valores de IC₅₀ de las líneas celulares. SD, desviación estándar.

Para determinar si los fármacos VPF y 5-FU pudieran actuar sinérgicamente, se estudió el efecto de ambos por separado y en combinación en modelos celulares de PAAD. El tratamiento con 5-FU se combinó con dos concentraciones de VPF (1,5 y 2,5 μM), que habían demostrado no ejercer un efecto antiproliferativo *per se*, en las líneas celulares M220 y RWP1 (**Figura 28**). El estudio del cambio en la distribución del ciclo celular tras la aplicación de los distintos tratamientos concluyó que ambos fármacos inducen un aumento del porcentaje de células en la fase G1, mientras que la combinación no produce un aumento aditivo en dicha fase.

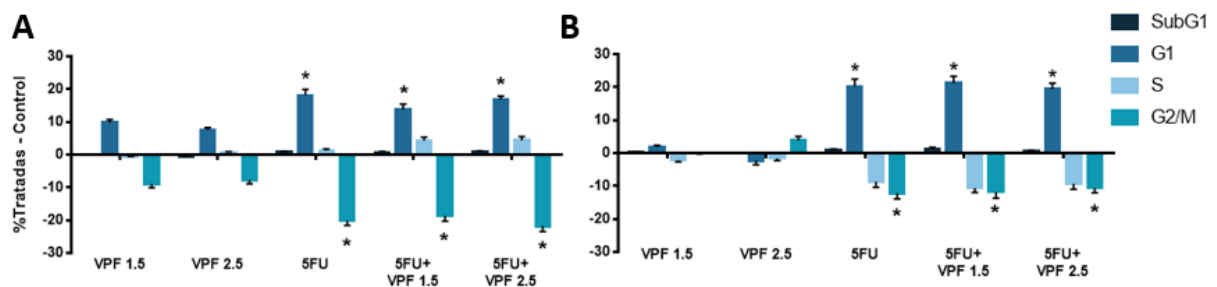


Figura 28. Efecto del fármaco correspondiente en la distribución del ciclo celular tras tratar con VPF y 5-FU. Distribución del ciclo celular de las líneas celulares de PAAD, M220 (A) y RWP1 (B) tras el tratamiento con 1,5 y 2,5 μM de VPF y 10 μM de 5-FU y la combinación de ambas. Se representa el porcentaje de células tratadas tras restar el porcentaje de células totales del control. * p-valor<0,05.

Como se ha comentado previamente, el VPF es capaz de fotoactivarse al ser irradiado con una fuente de luz roja aumentando así su efecto antiproliferativo. Por ello, se decidió estudiar la viabilidad de los modelos celulares SW480 y RWP1 después del tratamiento con 1,5 y 2,5 μM de VPF con y sin fotoactivación (**Figura 29**). Las células que fueron fotoactivadas se expusieron durante 5 minutos a una fuente de luz roja (655 nm) tras ser tratadas en suspensión. Tras la fotoactivación se observó un aumento significativo de la muerte celular con las dos concentraciones de VPF utilizadas en SW480, mientras que en RWP1 se consiguió únicamente en la dosis mayor de fármaco.

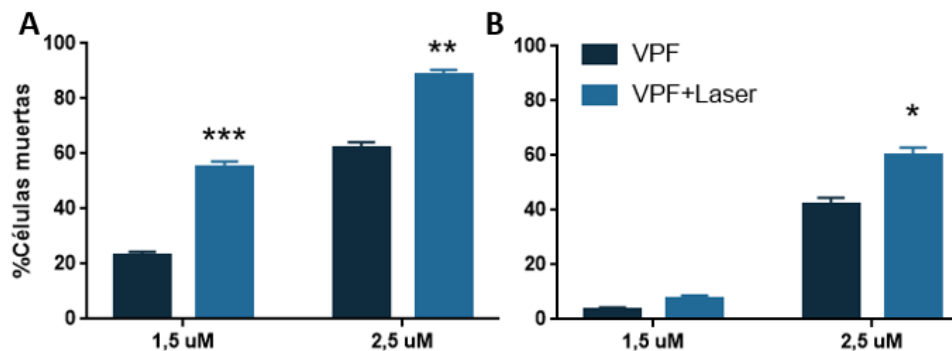


Figura 29. Viabilidad celular en las líneas celulares de SW480 y RWP1. Las células de SW480 (A) y RWP1 (B) fueron tratadas con 1,5 y 2,5 μM de VPF durante 24 horas. Un grupo de células tratadas se irradió durante 5 minutos con luz roja para fotoactivar el VPF. Se representa la proporción de células muertas con respecto al número de células totales. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

Para determinar si el efecto del VPF variaba según estuvieran las células adheridas a la placa o en suspensión, necesaria para la fotoactivación del fármaco, se analizó la variación de la expresión de los genes objetivos en SW480 y RWP1 mediante qPCR (**Figura 30**). El grupo de células nombrado como "Fijas" son las células que se trataron adheridas a la placa, las células "Sueltas" se tripsinizaron y se trataron en suspensión, y las "Láser" se trataron en suspensión seguida de una fotoactivación durante 5 minutos con luz roja. Los resultados obtenidos no establecen una clara relación entre la adhesión de las células a la placa o el efecto del VPF tras la fotoactivación (**Figura 29**) y la variación de la expresión. Solo en el caso de la línea SW480, la expresión de *IFNGR1* aumentó en las células sueltas y aún más al fotoactivarse, si bien, ese resultado no se recapituló en la línea celular RWP1. Asimismo, se observó un aumento significativo en la expresión de los genes *IFITM1*, *IFITM3* e *IFNGR1* al tratarse las células en suspensión en la línea celular SW480 que no tuvo lugar en RWP1. *ISG15* y *MX1* disminuyen su expresión al aplicar VPF en suspensión en ambas líneas celulares. Estos resultados parecen indicar que el tratamiento con VPF tiene mayor efecto en la variación de la expresión génica en línea celular SW480 (**Figura 30**), lo cual está en consonancia con el hecho de que cuando esta línea fue fotoactivada tras ser tratada con 2,5 μM de VPF en suspensión, mostró más sensibilidad que RWP1 (**Figura 29**).

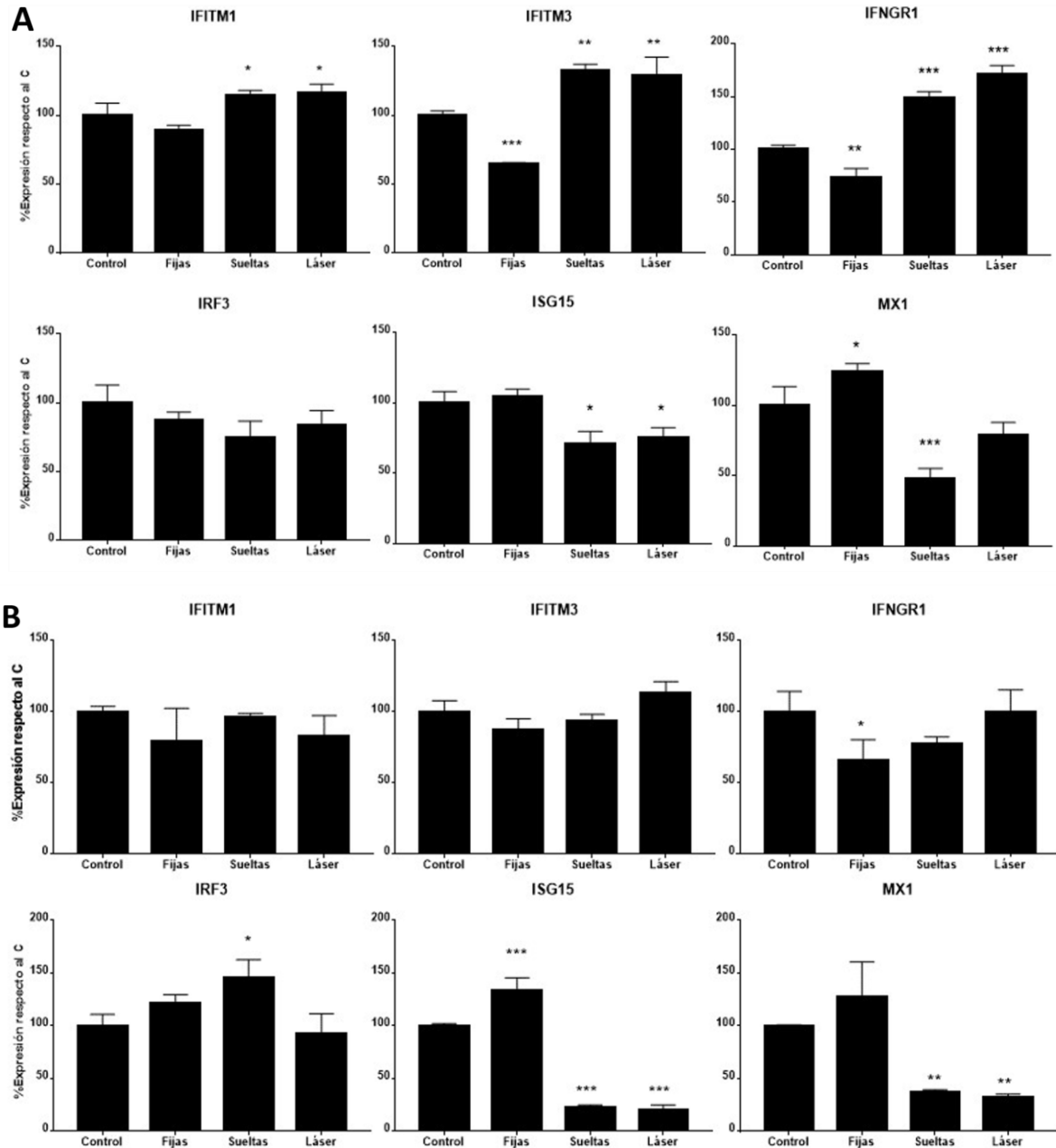


Figura 30. Expresión relativa de los genes objetivo en SW480 y RWP1 tras tratar con VPF. Niveles de expresión génica de *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1* en SW480 (A) y RWP1 (B) tras el tratamiento con 2,5 μ M de VPF. Las células fijas recibieron el fármaco adheridas a la placa; las sueltas se tripsinizaron y recibieron el tratamiento en suspensión; y láser son las células que recibieron la dosis de VPF sueltas y además fueron fotoactivadas con láser durante 5 minutos. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01 y *** p-valor<0,001.

La finalidad era utilizar el VPF como un fármaco que aumentase la expresión de *IFITM1* en células tumorales, tal y como se había observado en los modelos de peces, para así determinar su efecto en la resistencia frente a determinados fármacos, como el 5-FU o el BCNU. Sin embargo, los resultados observados en peces no han sido extrapolables a los modelos tumorales utilizados, lo que implica que se deberán hacer más estudios en esta dirección.

DISCUSIÓN

La capacidad de las células tumorales de desarrollar mecanismos de resistencia frente a los fármacos comúnmente utilizados en las terapias convencionales es una de las principales causas de la ineficacia de estos tratamientos y, por ende, de una mayor tasa de recaída y/o mortalidad.

Este trabajo se ha realizado en modelos celulares de CRC, GBM y PAAD. El CRC es uno de los tumores más incidentes y con mayor número de muertes a nivel mundial. A pesar de los avances tanto en los métodos de diagnóstico temprano como en las estrategias terapéuticas, el alto porcentaje de recaída favorece el desarrollo de resistencia a los tratamientos previamente utilizados, como pueden ser la quimioterapia o la radioterapia. Por otro lado, aunque la incidencia mundial de GBM y PAAD no es tan elevada como la de CRC, la elevada tasa de mortalidad y la agresividad de estos tumores hace necesario el desarrollo de nuevas terapias que aumenten la esperanza de vida de los pacientes.

En arrays realizados por el grupo de investigación del Dr. Miguel Saceda se observó que un grupo de genes relacionados con la respuesta a IFN presentaban niveles de expresión desregulados en CRC durante la adquisición de resistencia a 5-FU. Interesantemente, se observó en arrays del mismo grupo que muchos de estos genes aparecían también desregulados en modelos celulares de cáncer de mama durante la adquisición de resistencia a paclitaxel. Tras ello, la búsqueda de información en la bibliografía y en la base de datos UALCAN demostró la desregulación de estos genes en CRC y corroboró que estos genes juegan un papel clave en la carcinogénesis. Para la realización de este trabajo se escogió un grupo de genes objetivo de entre todos los genes alterados cuya expresión era significativamente mayor en tejido tumoral en comparación con el tejido normal (**Tabla 2**): *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNGR1*, *IRF3*, *ISG15* y *MX1*. El presente trabajo se focalizó principalmente en los dos primeros genes ya que existen varios estudios que demuestran su desregulación en diferentes tipos de tumores. No obstante, no hay concordancia con el papel que juegan en el tejido tumoral ya que algunos autores han asociado las proteínas IFITM1 y -3 a un peor pronóstico tumoral (Zhao *et al.*, 2013; Ogony *et al.*, 2016), mientras que otros las han relacionado con una menor tasa de proliferación de células malignas (Matsumoto *et al.*, 1993). Aunque está ampliamente estudiado su papel en proliferación, metástasis e invasividad, aún se desconoce su implicación en el mecanismo de resistencia a terapias convencionales (Liang *et al.*, 2020; Rajapaksa *et al.*, 2020).

Para determinar la posible participación de estos genes en la adquisición de resistencia a 5-FU en otros tipos de cánceres, se incluyeron en el estudio diferentes modelos celulares de PAAD.

El 5-FU es un fármaco utilizado comúnmente en el tratamiento de diferentes tipos de tumores (Longley *et al.*, 2003). Los resultados de este trabajo demuestran que los modelos celulares

resistentes a 5-FU, tanto de CRC (**Figura 9**) como de PAAD (**Figura 21**), tienen mayores niveles de expresión de *IFITM1* y *-3* (**Figura 13, Figura 22**). Por otro lado, este fármaco inhibe la enzima timidilato sintasa impidiendo la síntesis de DNA y, por lo tanto, causando un bloqueo del ciclo celular en fases G1, en PAAD y la línea celular HT-29, o S, en SW480 (**Figura 10, Figura 21**). Además, este efecto citostático provoca que al aumentar el tiempo de tratamiento con 5-FU, las células vayan acumulando mayor contenido en DNA (**Figura 11**), dando lugar a poliploidías y/o aneuploidías, e induciendo finalmente la muerte de las células tumorales (**Figura 12**). Al analizar la expresión del resto de genes objetivo del trabajo en CRC y PAAD, se observó que la mayor sensibilidad a 5-FU venía asociada con una mayor expresión de los genes *IRF3*, *ISG15* y *MX1* (**Figura 13**). No obstante, el patrón observado en las líneas celulares de PAAD RWP1 y M220, sensibles a 5-FU, difiere entre ellas (**Figura 22**). Según datos de UALCAN, la expresión de *IFNGR1* en PAAD es inferior con respecto a la observada en el tejido no tumoral, aunque esto no parece afectar a la supervivencia de los pacientes (**Figura S2**). Sin embargo, nuestros resultados asocian su elevada expresión a una mayor resistencia frente a 5-FU en este tipo de tumor, dado que la línea Hs766T, la más resistente a 5-FU, presenta un nivel de expresión mucho mayor que el presente en RWP1 y M220 (**Figura 22**). Por otro lado, la mayor expresión de este gen en los modelos celulares de CRC no se produjo en SW480, la línea celular de CRC más resistente a 5-FU, sino en la sublínea celular HT-29-M6, resistente a metotrexato (**Figura 13**), sugiriendo su posible papel en la resistencia a diferentes fármacos.

Dado que teníamos datos de los genes objetivo en tres modelos de carcinoma, CRC, mama y PAAD, se decidió estudiar la expresión de estos genes en modelos celulares de GBM, un tumor de origen no epitelial con muy mal pronóstico. En este caso, se determinó la resistencia frente a BCNU, un fármaco utilizado comúnmente frente a tumores cerebrales, con un mecanismo de acción totalmente diferente al del 5-FU.

Cuando se analizaron los genes objetivo en las diferentes líneas celulares de GBM en la base de datos UALCAN se observó que la expresión de los genes *IFITM3*, *IFNGR1*, *ISG15* y *MX1* era significativamente superior en el tejido tumoral. Concretamente, los niveles de *IFITM3* son clave en la supervivencia del paciente pues su elevada expresión está relacionada con un peor pronóstico (Zhao *et al.*, 2013). Nuestros resultados al analizar la expresión de *IFITM1* sugieren una posible tendencia a sobreexpresarse en aquellas líneas que presentan más resistencia al fármaco (**Figura 23**). Sin embargo, existe una gran variabilidad entre las diferentes líneas celulares, lo que concuerda con los datos almacenados en UALCAN (**Figura S1**). Por ello, no puede afirmarse la existencia de una relación clara entre los niveles de expresión de los genes objetivo y la resistencia intrínseca a BCNU. La variación observada en la expresión de estos genes en los diferentes modelos celulares puede deberse a cambios en el microambiente celular que estén induciendo estrés en el cultivo, ya que los

genes objetivo están relacionados con el IFN y, por tanto, con la respuesta a diferentes tipos de estrés. Las líneas celulares de GBM utilizadas fueron establecidas por el grupo de investigación a partir de cultivos primarios, y se determinó que todas ellas son IDH silvestre (Ventero *et al.*, 2019), lo que correlaciona con una mayor agresividad y resistencia a fármacos. Por este motivo, aunque la expresión de los genes en nuestras líneas celulares se encuentre dentro del rango de variación observado en UALCAN (**Figura S1**), están alejadas de la media. Esta diferencia es especialmente llamativa en la baja expresión de *MX1* en las líneas tumorales con respecto al tejido normal (**Figura 23**) y su aumento en respuesta a BCNU (**Figura 25**). Sin embargo, hay que destacar que la muestra de cerebro normal utilizada procede de un *pool* cerebral, conteniendo tanto tejido glial como neuronal, mientras que nuestras líneas celulares son completamente gliales. Por lo tanto, para poder obtener conclusiones más claras a la hora de comparar las líneas tumorales con el tejido normal, lo ideal sería disponer de muestras de tejido normal y tumoral del mismo paciente.

Para profundizar en el papel de los genes objetivo y la adquisición de resistencia a fármacos se generaron sublíneas resistentes a BCNU y 5-FU a partir de las líneas celulares parentales HGUE-GB-39 de GBM y SW480 de CRC, respectivamente, mediante presión selectiva. En ambos casos, se consiguió una mayor resistencia al añadir periódicamente concentraciones superiores de fármaco en el frasco de cultivo (**Figura 24, Figura 17**).

Interesantemente, al añadir dosis más altas de 5-FU de forma prolongada en la línea celular de CRC, SW480, fue aumentando el porcentaje de células con mayor tamaño, vacuolas en su interior y con varios núcleos (**Figura 18**). Este fenómeno puede estar relacionado con un tipo de muerte celular conocido como catástrofe mitótica (MC, del inglés *mitotic catastrophe*). Inicialmente, la MC se definió como una incapacidad de las células de concluir la mitosis debido a daños en el DNA, dando lugar a la aparición de células poliploides (Castedo *et al.*, 2004). Sin embargo, actualmente se conoce que la MC actúa como un mecanismo supresor de células tumorales que evita la inestabilidad genómica y precede a la muerte celular, bien sea por apoptosis, necrosis o senescencia (Vitale *et al.*, 2011). Además, hay estudios que demuestran que el uso de determinados fármacos que detienen el ciclo celular en la fase G1/S o en G2/M son capaces de inducir la MC, lo que conlleva a ciertas alteraciones como la formación de micronúcleos o la multinucleación, el aumento de las membranas nucleares y plasmática y otras modificaciones celulares (Eom *et al.*, 2005). Efectos que también observamos en nuestro estudio tras el tratamiento con 5-FU, que causa un bloqueo inicial de las células en la fase G1 del ciclo celular (**Figura 10**), que induce modificaciones en la morfología y número de núcleos (**Figura 18**), causando finalmente la muerte celular (**Figura 12**).

El análisis de las sublíneas celulares resistentes indica que la expresión relativa de los genes objetivo sufre modificaciones relacionadas con la adquisición de resistencia a 5-FU o BCNU en CRC y GBM, respectivamente. Estas alteraciones son diferentes según el tipo de tumor. De esta forma pudimos observar que en GBM, existe un aumento significativo de los genes *IFITM1*, *IFITM3*, *ISG15* y *MX1*, mientras que los niveles de *IFNGR1* e *IRF3* disminuyen al aumentar la dosis de fármaco (**Figura 25**). Con respecto a CRC observamos dos patrones de expresión diferentes según el modelo de adquisición de resistencia aplicado. Por un lado, en las células sometidas a Ta (tratamiento agudo previo a la presión selectiva) los valores de expresión de los genes *IFITM1* y *-3* presentan un aumento significativo, principalmente al inicio de la presión selectiva. En cambio, la expresión relativa de *IFNGR1* es superior en concentraciones más elevadas de fármaco. Por otro lado, en las células a las que se les aplicó un Tc (tratamiento crónico mediante presión selectiva directa) no se detectaron cambios sustanciales en ninguno de estos tres genes. Cabe destacar que en ambas estrategias de adquisición de resistencia se observaron diferencias significativas en la expresión de *ISG15* y *MX1* siendo generalmente menor en los modelos más resistentes (**Figura 19**). Las diferencias encontradas en la expresión génica de ambos modelos resistentes sugieren la posible existencia de diferentes mecanismos de adquisición de resistencia.

Tanto en las sublíneas resistentes de GBM como en las de CRC sometidas a Ta, los resultados sugieren que en la adquisición de resistencia están implicadas las vías de transducción de IFN- α e IFN- γ . Por un lado, en CRC inicialmente existe una mayor expresión de los genes *IFITM1* y *-3*, los cuales se activan en respuesta a IFN- α (Padariya *et al.*, 2021). No obstante, conforme va aumentando la concentración de fármaco, la expresión de estos genes disminuye y se incrementa la expresión de *IFNGR1*, receptor de IFN- γ , sugiriendo un posible intercambio de roles entre ambas vías de transducción de señales. Por el contrario, una dosis baja de fármaco en GBM resulta en cambios, aunque no significativos, donde los niveles de *IFITM1* y *-3* son inferiores y los de *IFNGR1* son superiores con respecto al control. Sin embargo, al aumentar la dosis, el patrón de expresión génica es a la inversa. Esto sugiere que, en GBM, inicialmente se activaría la vía de transducción de IFN- γ y posteriormente la vía de IFN- α durante la adquisición de resistencia a BCNU.

A pesar de que varios estudios han determinado que los pacientes con alta expresión de *IFITM1* son más resistentes a fármacos, aún no se conocen los mecanismos de esta relación (Fumoto *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013). En este trabajo, intentamos comprobar si las células de diferentes líneas tumorales se sensibilizaban frente al tratamiento suprimiendo la expresión del gen. Sin embargo, aunque el silenciamiento tuvo éxito en los modelos de GBM, PAAD y CRC, solamente en la línea celular HT-29 de CRC se detectaron cambios significativos en la sensibilidad al fármaco tras el silenciamiento (**Figura 14**, **Figura 26**). Sin embargo, tras la aplicación de 5-FU en HT-29 la expresión

de *IFITM1* aumentó en casi 5 veces más en las células transfectadas con un siRNA no específico respecto al control, lo que conllevó que en las células en las que el gen fue silenciado aumentara tanto la expresión del gen por el propio tratamiento con 5-FU que no se lograra el completo silenciamiento de este, quedando su expresión al mismo nivel que el control. Únicamente en SW480 se observó una menor acumulación significativa de células en la fase S tras silenciar el gen. No obstante, en este caso hay que tener en cuenta que en el estudio del ciclo celular se seleccionan las poblaciones que se incluyen en el análisis y puede que no se incluyan poblaciones con mayor contenido de DNA, que sabemos que aparecen en respuesta al 5-FU (**Figura 11**). Para poder entender mejor las implicaciones del silenciamiento de *IFITM1*, se analizaron las variaciones de los genes objetivo mediante qPCR (**Figura 15**). Los niveles de *IFNGR1* aumentaron de forma significativa al silenciar *IFITM1* y tratar con 5-FU, lo que sugiere que la vía de transducción de IFN- γ toma el protagonismo en el fenotipo resistente cuando se silencian genes de la vía IFN- α , sustentando la hipótesis de la implicación de las dos vías de transducción de IFN. Sorprendentemente, el silenciamiento de *IFITM1* resultó en una reducción similar de los niveles de *IFITM3* siendo en ambos casos de un 90% aproximadamente. Esto sugiere que la expresión de *IFITM3* puede estar regulada por *IFITM1*. Para poder estudiar mejor esta relación y el posible papel de *IFITM3* en la quimiorresistencia también se silenció su expresión en las líneas SW480 y HT-29 de CRC (**Figura 16**). Sin embargo, la transfección solo fue efectiva en HT-29, reduciendo a la mitad la expresión del gen, con lo que no podemos asegurar una pérdida de expresión de *IFITM3* suficiente a nivel de proteína. Los datos obtenidos por ciclo celular no permiten concluir una relación entre *IFITM1* y -3 y su posible papel en la quimiorresistencia.

Con el objetivo de dilucidar si las sublíneas resistentes recuperaban la sensibilidad a 5-FU se silenció el gen *IFITM1* en las sublíneas celulares SW480 Ta1, Ta5 y Tc5 y se analizaron los datos mediante ciclo celular (**Figura 20A**) y ensayos de proliferación celular (**Figura 20B**). Los resultados del ciclo celular mostraban una bajada significativa del bloqueo de la fase S en la sublínea Ta1, una ligera bajada en la sublínea Tc5, mientras que en Ta5 no se produjeron modificaciones sustanciales tras el silenciamiento del gen. Sin embargo, los ensayos de proliferación aportaron un nuevo punto de vista ya que el efecto del silenciamiento de *IFITM1* era mucho mayor que el observado mediante el ciclo celular. La proliferación disminuyó de forma significativa con la transfección mediante siRNA que se incrementó al aplicar 5-FU, siendo mayor en las células que presentaban *IFITM1* silenciado.

La discrepancia observada entre los resultados en el análisis del ciclo celular y los ensayos de proliferación no permite concluir que la inhibición de la expresión de *IFITM1* sensibiliza a las células al efecto del fármaco correspondiente, pero varias evidencias sugieren que los ensayos de proliferación celular podrían ser más efectivos para abordar este objetivo. En primer lugar, los

ensayos de ciclo celular se realizan tras 24 horas de tratamiento, mientras que en los de proliferación el tratamiento se mantuvo durante 48 horas, dando un mayor espacio temporal para la aparición de los efectos del fármaco sobre las células. Por otra parte, la aparición de poblaciones poliploides tras el tratamiento con 5-FU en CRC hace que, en los estudios de ciclo celular, al tener que fijar una población para el análisis no se aprecie adecuadamente el efecto del fármaco.

Sería necesario repetir los ensayos con siRNAs para *IFITM1* e *IFITM3* utilizando los ensayos de proliferación celular para analizar los resultados, ya que muestran los efectos sobre el conjunto de todas las células en cultivo y diseñando nuevos siRNA frente a *IFITM3* que inhiban la expresión adecuadamente.

En colaboración con el grupo del Dr. Luis Pérez (proyecto SARCOVIR) se corroboró que el VPF aumentaba los niveles de *IFITM1* en líneas celulares de peces y aumentaba la resistencia de estas líneas celulares a la infección por determinados virus. Este fármaco es comúnmente utilizado en clínica frente a la degeneración macular, aunque en los últimos años varios estudios han demostrado su capacidad antiproliferativa en distintos modelos tumorales mediante dos mecanismos. El VPF *per se* es capaz de inhibir la proteína YAP-1 de la vía Hippo (Brodowska *et al.*, 2014), además, cuando es fotoactivado con una fuente de luz roja, es capaz de inducir la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Wei y Li, 2020). Por todo ello, quisimos comprobar si el VPF era capaz de aumentar la expresión de *IFITM1*, tal y como se había observado en peces, favoreciendo la adquisición de quimiorresistencia en nuestras líneas tumorales.

Los datos iniciales mostraron que las diferentes líneas celulares de CRC son más resistentes a VPF que la línea tumoral HGUE-GB-39 de GBM. A su vez, no se detectaron diferencias en la sensibilidad basal a VPF entre las líneas celulares de CRC (**Figura 27**). Además, se analizó la distribución de las fases del ciclo celular tras aplicar VPF y 5-FU como monoterapia y en combinación en dos líneas celulares de PAAD (**Figura 28**). Los resultados concluyeron que ambos fármacos bloquean el ciclo celular en la fase G1, sin embargo, la aplicación conjunta no incrementó el efecto observado en la monoterapia, por lo que podemos afirmar que no existe sinergismo entre estos fármacos.

Curiosamente, aunque a las dosis escogidas no se vio efecto al nivel de ciclo celular (**Figura 28**), al tratar las células en suspensión sí que se observó un aumento en la muerte celular, siendo mayor el efecto antiproliferativo del VPF en la línea tumoral SW480 de CRC y la línea tumoral RWP1 de PAAD (**Figura 29**). Para poder fotoactivar, las células han de estar en suspensión, lo que puede ser una variable más que afecte a la eficacia del fármaco. Por ello, aplicamos el fármaco con las células adheridas en la placa, en suspensión y en suspensión fotoactivadas y analizamos los valores de

expresión relativa mediante qPCR para poder evaluar la eficacia del fármaco en las condiciones mencionadas (**Figura 30**). En ninguna de las dos líneas celulares se observó una diferencia significativa al fotoactivar las células, aunque sí que aumentó significativamente la expresión de los genes *IFITM1*, *IFITM3* e *IFNGR1* al tratar las células en suspensión en las células de SW480 que no se detectó en RWP1. Los resultados, tanto del análisis génico como de la viabilidad, parecen indicar que la línea celular SW480 es más sensible a VPF que la línea RWP1.

El objetivo final del uso de VPF en nuestras líneas celulares era la búsqueda de un fármaco que pudiera aumentar la expresión de *IFITM1* de forma más o menos específica, tal y como se había demostrado en modelos de peces, para poder determinar su efecto en la resistencia tumoral. No obstante, los resultados obtenidos no demuestran un aumento significativo del gen, al contrario de lo ocurrido en peces. Uno de los problemas para desarrollar moduladores de la proteína IFITM1 radicaba en el desconocimiento de su estructura, pero gracias al reciente desarrollo del software AlphaFold2 se ha podido conocer su estructura proteica (**Figura 8**). Esto sin duda facilitará que en futuros estudios se pueda evaluar la acción de nuevos activadores/inhibidores sobre las células tumorales.

En conclusión, este trabajo muestra evidencias que sugieren una relación entre la expresión de *IFITM1* y la adquisición de resistencia a diferentes fármacos. Si bien, el mecanismo de adquisición de dicha resistencia podría implicar a un conjunto de genes que estaría relacionado con la ruta de señalización de IFN. Un estudio más profundo sería necesario para poder esclarecer la implicación de los genes objetivo en la adquisición de quimiorresistencia.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que extraemos de este trabajo son:

1. El tratamiento con 5-FU tiene un efecto citostático en modelos celulares de CRC y PAAD, que deriva finalmente en citotóxico en los modelos celulares de CRC tratados con dosis más altas.
2. En las líneas celulares HT-29 de CRC y en PAAD el fármaco un bloquea en la fase G1, mientras que en SW480 de CRC se produce en la fase S.
3. Las líneas celulares SW480 de CRC y Hs766T de PAAD son las más resistentes al 5-FU y presentan mayor expresión de *IFITM1* y -3 que el resto de las líneas tumorales, mientras que las líneas celulares más sensibles tienen mayor expresión de *IRF3*, *ISG15* y *MX1*.
4. Altas dosis de 5-FU o un tratamiento periódico prolongado inducen la aparición de células aberrantes, de mayor tamaño y con mayor cantidad de núcleos.

5. Las sublíneas de SW480 establecidas a partir de un tratamiento agudo y sometidas a bajas dosis de fármaco expresan más *IFITM1* y *-3*, mientras que las más resistentes expresan más *IFNGR1*.
6. El tratamiento crónico no presenta patrones de expresión definidos en las sublíneas resistentes establecidas.
7. El análisis del silenciamiento de los genes *IFITM1* y *-3* mediante proliferación celular es más efectivo que el ciclo celular ya que permite establecer mejor una relación entre la sobreexpresión de *IFITM1* y la resistencia a fármacos.
8. Existe una tendencia de mayor expresión de *IFITM1* en las líneas celulares de GBM más resistentes a BCNU, que aumenta al generar sublíneas resistentes al fármaco.
9. El VPF induce un efecto antiproliferativo dependiente de concentración en modelos celulares de CRC y GBM, siendo HGUE-GB-39 más sensible que los modelos de CRC utilizados, sin embargo, no existe sinergia al combinarlo con 5-FU.
10. El efecto antiproliferativo aumenta cuando las células están en suspensión y son fotoactivadas.
11. El tratamiento con VPF en líneas celulares humanas no aumenta la expresión de *IFITM1*, al contrario de lo que ocurre en peces.

BIBLIOGRAFÍA

- Agúndez Llaca, M. (2016) *Study of the DNA sensor IFI16 in cancer and herpes simplex virus type 1 infection*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid; CSIC.
- Alam, U. y Kennedy, D. (2019) "G3BP1 and G3BP2 regulate translation of interferon-stimulated genes: IFITM1, IFITM2 and IFITM3 in the cancer cell line MCF7", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 459, pp. 189-204. doi:10.1007/s11010-019-03562-3.
- Alcalá, S., Sancho, P., Martinelli, P., Navarro, D., Pedrero, C., Martín-Hijano, L., Valle, S., Earl, J., Rodríguez-Serrano, M., Ruiz-Cañas, L., Rojas, K., Carrato, A., García-Bermejo, L., Fernández-Moreno, M. Á., Hermann, P. C. y Sainz, B. (2020) "ISG15 and ISGylation is required for pancreatic cancer stem cell mitophagy and metabolic plasticity", *Nature Communications*, 11(1), pp. 1-17. doi:10.1038/s41467-020-16395-2.
- Aljohani, A. I., Joseph, C., Kurozumi, S., Mohammed, O. J., Miligy, I. M., Green, A. R. y Rakha, E. A. (2020) "Myxovirus resistance 1 (MX1) is an independent predictor of poor outcome in invasive breast cancer", *Breast cancer research and treatment*, 181(3), pp. 541-551. doi:10.1007/S10549-020-05646-X.
- Beklen, H., Yildirim, E., Kori, M., Turanli, B. y Yalcin Arga, K. (2021) "Systems-level biomarkers identification and drug repositioning in colorectal cancer Conflict-of-interest statement", *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(7), pp. 638-661. doi:10.4251/wjgo.v13.i7.638.
- Brodowska, K., Moujahed, A., Marmalidou, A., Meyer Zu Horste, M., Cichy, J., Miller, J. W., Gragoudas, E. y Vavvas, D. G. (2014) "The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation", *Experimental Eye Research*, 124, pp. 67-73. doi:10.1016/j.exer.2014.04.011.

- Burris, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., Hoff, D. D. Von y Hoff, V. (1997) "Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial", *Journal of Clinical Oncology*, 15(6), pp. 2403-2413.
- Carbotti, G., Petretto, A., Naschberger, E., Stürzl, M., Martini, S., Mingari, M. C., Filaci, G., Ferrini, S. y Fabbi, M. (2020) "Cytokine-Induced Guanylate Binding Protein 1 (GBP1) Release from Human Ovarian Cancer Cells", *Cancers*, 12(488), pp. 1-20. doi:10.3390/cancers12020488.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. y Kroemer, G. (2004) "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition", *Oncogene*, 23, pp. 2825-2837. doi:10.1038/sj.onc.1207528.
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K. y Varambally, S. (2017) "UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses", *Neoplasia*, 19(8), pp. 649-658. doi:10.1016/J.NEO.2017.05.002.
- Chen, R.-H., Xiao, Z.-W., Yan, X.-Q., Han, P., Liang, F.-Y., Wang, J.-Y., Yu, S.-T., Zhang, T.-Z., Chen, S.-Q., Zhong, Q. y Huang, X.-M. (2020) "Tumor Cell-Secreted ISG15 Promotes Tumor Cell Migration and Immune Suppression by Inducing the Macrophage M2-Like Phenotype", *Frontiers in Immunology*, 11, pp. 1-13. doi:10.3389/FIMMU.2020.594775.
- Dave, B., Granados-Principal, S., Zhu, R., Benz, S., Rabizadeh, S., Soon-Shiong, P., Yu, K.-D., Shao, Z., Li, X., Gilcrease, M., Lai, Z., Chen, Y., Huang, T. H.-M., Shen, H., Liu, X., Ferrari, M., Zhan, M., Wong, S. T. C., Kumaraswami, M., Mittal, V., Chen, X., Gross, S. S. y Chang, J. C. (2014) "Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), pp. 8838-8843. doi:10.1073/PNAS.1320769111.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. y Wallace, M. B. (2019) "Colorectal cancer", *The Lancet*, 394, pp. 1467-1480. doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- Desai, S. D. (2015) "ISG15: A double edged sword in cancer", *Oncolmmunology*, 4(12), pp. 1-2. doi:10.1080/2162402X.2015.1052935.
- Eom, Y.-W., Kim, M. A., Park, S. S., Goo, M. J., Kwon, H. J., Sohn, S., Kim, W.-H., Yoon, G. y Choi, K. S. (2005) "Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype", *Oncogene*, 24, pp. 4765-4777. doi:10.1038/sj.onc.1208627.
- Fan, J., Peng, Z., Zhou, C., Qiu, G., Tang, H., Sun, Y., Wang, X., Li, Q., Le, X. y Xie, K. (2008) "Gene-expression profiling in Chinese patients with colon cancer by coupling experimental and bioinformatic genomewide gene-expression analyses: Identification and validation of IFITM3 as a biomarker of early colon carcinogenesis", *Cancer*, 113(2), pp. 266-275. doi:10.1002/CNCR.23551.
- Fumoto, S., Shimokuni, T., Tanimoto, K., Hiyama, K., Otani, K., Ohtaki, M., Hihara, J., Yoshida, K., Hiyama, E., Noguchi, T. y Nishiyama, M. (2008) "Selection of a novel drug-response predictor in esophageal cancer: A novel screening method using microarray and identification of IFITM1 as a potent marker gene of CDDP response", *International Journal of Oncology*, 32(2), pp. 413-423. doi:10.3892/IJO.32.2.413.
- Gao, M., Lin, Y., Liu, X., Li, Y., Zhang, C., Wang, Zheng, Wang, Zhiliang, Wang, Y. y Guo, Z. (2018) "ISG20 promotes local tumor immunity and contributes to poor survival in human glioma", *Oncolmmunology*, 8(2), pp. 1-10. doi:10.1080/2162402X.2018.1534038.

- Gresser, I. y Bourali, C. (1969) "Exogenous Interferon and Inducers of Interferon in the Treatment of Balb/c Mice inoculated with RC19 Tumour Cells", *Nature*, 223, pp. 844-845.
- Guo, C., Pirozzi, C. J., Lopez, G. Y. y Yan, H. (2011) "Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: Mechanisms, biomarkers and therapeutic target", *Current Opinion in Neurology*, 24(6), pp. 648-652. doi:10.1097/WCO.0B013E32834CD415.
- Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., Larion, M., Gilbert, M. R. y Yang, C. (2020) "IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets", *British Journal of Cancer*, 122, pp. 1580-1589. doi:10.1038/s41416-020-0814-x.
- He, J. D., Luo, H. L., Li, J., Feng, W. T. y Chen, L. B. (2012) "Influences of the interferon induced transmembrane protein 1 on the proliferation, invasion, and metastasis of the colorectal cancer SW480 cell lines", *Chinese Medical Journal*, 125(3), pp. 517-522. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.03.021.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C. y Stupp, R. (2005) "MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma", *The New England Journal of Medicine*, 352, pp. 997-1003. doi:10.1056/NEJM0A043331.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. y Hassabis, D. (2021) "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold", *Nature*, pp. 1-11. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
- Lapointe, S., Perry, A. y Butowski, N. A. (2018) "Primary brain tumours in adults", *The Lancet*, 392, pp. 432-446. doi:10.1016/S0140-6736(18)30990-5.
- Lazear, H. M., Nice, T. J. y Diamond, M. S. (2015) "Interferon-λ: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond", *Immunity*, 43(1), pp. 15-28. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.001.
- Lee, H. R., No, H. K., Ryu, C. J. y Park, H.-J. (2013) "Brahma-related gene 1-associated expression of 9-27 and IFI-27 is involved in acquired cisplatin resistance of gastric cancer cells", *Molecular Medicine Reports*, 8(3), pp. 747-750. doi:10.3892/MMR.2013.1576.
- Lewis, M. A., Sharabash, N., Miao, Z.-F., Lyons, L. N., Piccirillo, J., Kallogjeri, D., Schootman, M., Mutch, M., Yan, Y., Levin, M. S., Castells, A., Cuatrecasas, M., Mills, J. C., Wang, Z.-N. y Rubin, D. C. (2017) "Increased IFRD1 Expression in Human Colon Cancers Predicts Reduced Patient Survival", *Digestive Diseases and Sciences*, 62(12), pp. 3460-3467. doi:10.1007/S10620-017-4819-0.
- Li, S., Xie, Y., Zhang, W., Gao, J., Wang, M., Zheng, G., Yin, X., Xia, H. y Tao, X. (2015) "Interferon alpha-inducible protein 27 promotes epithelial-mesenchymal transition and induces ovarian tumorigenicity and stemness", *The Journal of surgical research*, 193(1), pp. 255-264. doi:10.1016/J.JSS.2014.06.055.
- Liang, R., Li, X. y Zhu, X. (2020) "Deciphering the Roles of IFITM1 in Tumors", *Molecular Diagnosis and Therapy*, 24(4), pp. 433-441. doi:10.1007/s40291-020-00469-4.
- Liu, Z., Gu, S., Lu, T., Wu, K., Li, L., Dong, C. y Zhou, Y. (2020) "IFI6 depletion inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression through reactive oxygen species accumulation via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress", *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), pp. 1-28. doi:10.1186/S13046-020-01646-3.

Longley, D. B., Harkin, D. P. y Johnston, P. G. (2003) "5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies", *Nature Reviews Cancer*, 3(5), pp. 330-338. doi:10.1038/nrc1074.

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. y Ellison, D. W. (2016) "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary", *Acta Neuropathologica*, 131, pp. 803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.

Martin, M., Sun, M., Motolani, A. y Lu, T. (2021) "Molecular Sciences The Pivotal Player: Components of NF- κ B Pathway as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7429), pp. 1-11. doi:10.3390/ijms22147429.

Matsumoto, A. K., Martin, D. R., Carter, R. H., Klickstein, L. B., Ahearn, J. M. y Fearon, D. T. (1993) "Functional Dissection of the CD21/CD19/ TAPA-1/Leu-13 Complex of B Lymphocytes", *Journal of Experimental Medicine*, 178, pp. 1407-1417.

Miyashita, H., Fukumoto, Motoi, Kuwahara, Y., Takahashi, T. y Fukumoto, Manabu (2020) "ISG20 is overexpressed in clinically relevant radioresistant oral cancer cells", *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(7), pp. 1633-1639.

Ogony, J., Choi, H. J., Lui, A., Cristofanilli, M. y Lewis-Wambi, J. (2016) "Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) overexpression enhances the aggressive phenotype of SUM149 inflammatory breast cancer cells in a signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2)-dependent manner", *Breast Cancer Research*, 18(25), pp. 1-19. doi:10.1186/s13058-016-0683-7.

Oronsky, B., Reid, T. R., Oronsky, A., Sandhu, N. y Knox, S. J. (2021) "A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma", *Frontiers in Oncology*, 10, pp. 1-10. doi:10.3389/fonc.2020.574012.

Padariya, M., Sznarkowska, A., Kote, S., Gómez-Herranz, M., Mikac, S., Pilch, M., Alfaro, J., Fahraeus, R., Hupp, T. y Kalathiya, U. (2021) "Functional Interfaces, Biological Pathways, and Regulations of Interferon-Related DNA Damage Resistance Signature (IRDS) Genes", *Biomolecules*, 11(622), pp. 1-29. doi:10.3390/biom11050622.

Pan, H., Wang, X., Huang, Weiqiang, Dai, Y., Yang, M., Liang, H., Wu, X., Zhang, L., Huang, Wenqi, Yuan, L., Wu, Y., Wang, Y., Liao, L., Huang, J. y Guan, J. (2020) "Interferon-Induced Protein 44 Correlated With Immune Infiltration Serves as a Potential Prognostic Indicator in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma", *Frontiers in Oncology*. Frontiers, 10, pp. 1-13. doi:10.3389/FONC.2020.557157.

Parker, B. S., Rautela, J. y Hertzog, P. J. (2016) "Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy". *Nature Reviews*, 16, pp. 131-144. doi:10.1038/nrc.2016.14.

Pelengaris, S. y Khan, M. (2006) *The Molecular Biology of Cancer*. Blackwell Publishing.

Pestka, S., Krause, C. D. y Walter, M. R. (2004) "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors", *Immunological Reviews*, 202, pp. 8-32. doi:10.1111/J.0105-2896.2004.00204.X.

Petrova, N. S., Zenkova, M. A. y Chernolovskaya, E. L. (2013) "Structure - Functions Relations in Small Interfering RNAs". En: Andrade, A. *Practical Applications in Biomedical Engineering*. IntechOpen. doi:10.5772/53945.

Pidugu, V. K., Pidugu, H. B., Wu, M.-M., Liu, C.-J. y Lee, T.-C. (2019) "Emerging Functions of Human IFIT Proteins in Cancer", *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, pp. 1-16. doi:10.3389/FMOLB.2019.00148.

Popson, S. A., Ziegler, M. E., Chen, X., Holderfield, M. T., Shaaban, C. I., Fong, A. H., Welch-Reardon, K. M., Papkoff, J. y Hughes, C. C. W. (2014) "Interferon-induced transmembrane protein 1 regulates

endothelial lumen formation during angiogenesis", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(5), pp. 1011-1019. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303352.

Prabha, N., Sannasimuthu, A., Kumaresan, V., Elumalai, P. y Arockiaraj, J. (2019) "Intensifying the Anticancer Potential of Cationic Peptide Derived from Serine Threonine Protein Kinase of Teleost by Tagging with Oligo Tryptophan", *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), pp. 75-83. doi:10.1007/S10989-019-09817-3.

Rajapaksa, U. S., Jin, C. y Dong, T. (2020) "Malignancy and IFITM3: Friend or Foe?", *Frontiers in Immunology*, 10, pp. 1-10. doi:10.3389/fonc.2020.593245.

Rawla, P., Sunkara, T. y Barsouk, A. (2019) "Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors", *Gastroenterology Review*, 14(2), pp. 89-103. doi:10.5114/pg.2018.81072.

Salvagno, C. y Cubillos-Ruiz, J. R. (2021) "Optineurin Guards IFN γ Signaling in Cancer Cells", *Cancer Discovery*, 11(7), pp. 1623-1628. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0362.

Sari, I. N., Yang, Y. G., Phi, L. T. H., Kim, H., Baek, M. J., Jeong, D. y Kwon, H. Y. (2016) "Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) is required for the progression of colorectal cancer", *Oncotarget*, 7(52), pp. 86039-86050. doi:10.18632/oncotarget.13325.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. y Bray, F. (2021) "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), pp. 209-249. doi:10.3322/CAAC.21660.

Taylor, O. G., Brzozowski, J. S. y Skelding, K. A. (2019) "Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets", *Frontiers in Oncology*, 9, pp. 1-11. doi:10.3389/FONC.2019.00963.

Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H. y Lenz, H.-J. (2017) "CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy", *Cancer treatment reviews*, 63 (2018), pp. 40-47. doi:10.1016/J.CTRV.2017.11.007.

Ventero, M. P., Fuentes-Baile, M., Quereda, C., Perez-Valeciano, E., Alenda, C., Garcia-Morales, P., Esposito, D., Dorado, P., Barbera, V. M. y Saceda, M. (2019) "Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3", *PLOS ONE*, 14(2), pp. 1-21. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0212581.

Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. y Kroemer, G. (2011) "Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability", *Nature Publishing Group*, 12, pp. 1-8. doi:10.1038/nrm3115.

Wang, H., Qiu, X., Lin, S., Chen, X., Wang, T. y Liao, T. (2018) "Knockdown of IFI27 inhibits cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma", *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), pp. 1-7. doi:10.1186/S12957-018-1371-0.

Wei, C. y Li, X. (2020) "The Role of Photoactivated and Non-Photoactivated Verteporfin on Tumor", *Frontiers in Pharmacology*, 11, pp. 1-15. doi:10.3389/fphar.2020.557429.

Xiao, Z. Z., Wang, Z. F., Lan, T., Huang, W. H., Zhao, Y. H., Ma, C. y Li, Z. Q. (2020) "Carmustine as a Supplementary Therapeutic Option for Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Frontiers in Neurology*, 11, pp. 1-11. doi:10.3389/fneur.2020.01036.

Yanai, H., Negishi, H. y Taniguchi, T. (2012) "The IRF family of transcription factors", *Oncolmmunology*, 1(8), pp. 1376-1386. doi:10.4161/onci.22475.

Yáñez, D. C., Ross, S. y Crompton, T. (2019) "The IFITM protein family in adaptive immunity", *Immunology*, 159, pp. 365-372. doi:10.1111/imm.13163.

Yu, F., M Ng, S. S., C Chow, B. K., Sze, J., Lu, G., Sang Poon, W., Kung, H.-F. y M Lin, M. C. (2011)

"Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) inhibits proliferation, migration, and invasion of glioma cells", *Journal of Neuro-Oncology*, 103, pp. 187-195. doi:10.1007/s11060-010-0377-4.

Zhao, B., Wang, H. y Li, P. (2013) "The role of IFITM3 in the growth and migration of human glioma cells", *BMC Neurology*, 13(210), pp. 1-9. doi:10.1186/1471-2377-13-210

Zhu, C., Chen, X., Guan, G., Zou, C., Guo, Q., Cheng, P., Cheng, W. y Wu, A. (2020) "IFI30 Is a Novel Immune-Related Target with Predicting Value of Prognosis and Treatment Response in Glioblastoma", *OncoTargets and Therapy*, 13, pp. 1129-1143. doi:10.2147/OTT.S237162.

Zuo, C., Sheng, X., Ma, M., Xia, M., Ouyang, L., Zuo, C., Sheng, X., Ma, M., Xia, M. y Ouyang, L. (2016) "ISG15 in the tumorigenesis and treatment of cancer: An emerging role in malignancies of the digestive system", *Oncotarget*, 7(45), pp. 74393-74409. doi:10.18632/ONCOTARGET.11911.

ANEXOS

| Genes | Expresión (p-valor) | Supervivencia (p-valor) |
|---------|---------------------|-------------------------|
| EIF2AK2 | SE (<1E-12) | SD (0,30) |
| IFIT5 | SD (1,97E-01) | SD (0,97) |
| IFITM1 | SE (1,62E-12) | SD (0,39) |
| IFITM2 | SD (8,79E-01) | SD (0,096) |
| IFNGR1 | IE (<1E-12) | SD (0,71) |
| IFRD1 | IE (2,26E-12) | SD (0,89) |
| IRF3 | SE (1,62E-12) | SD (0,89) |
| IRF7 | SE (<1E-12) | SD (0,31) |
| IRF9 | SE (1,62E-12) | SD (0,36) |
| ISG15 | SE (1,62E-12) | SD (0,81) |
| ISG20 | SE (1,62E-12) | SD (0,30) |

Tabla S1. Expresión y supervivencia de los genes relacionados con el IFN y la adquisición de resistencia a paclitaxel. Valores de expresión génica con respecto al tejido no tumoral obtenidos en el array de carcinoma de mama. ND, no diferencias; SE, sobreexpresión (rojo) e IE, infraexpresión (azul).

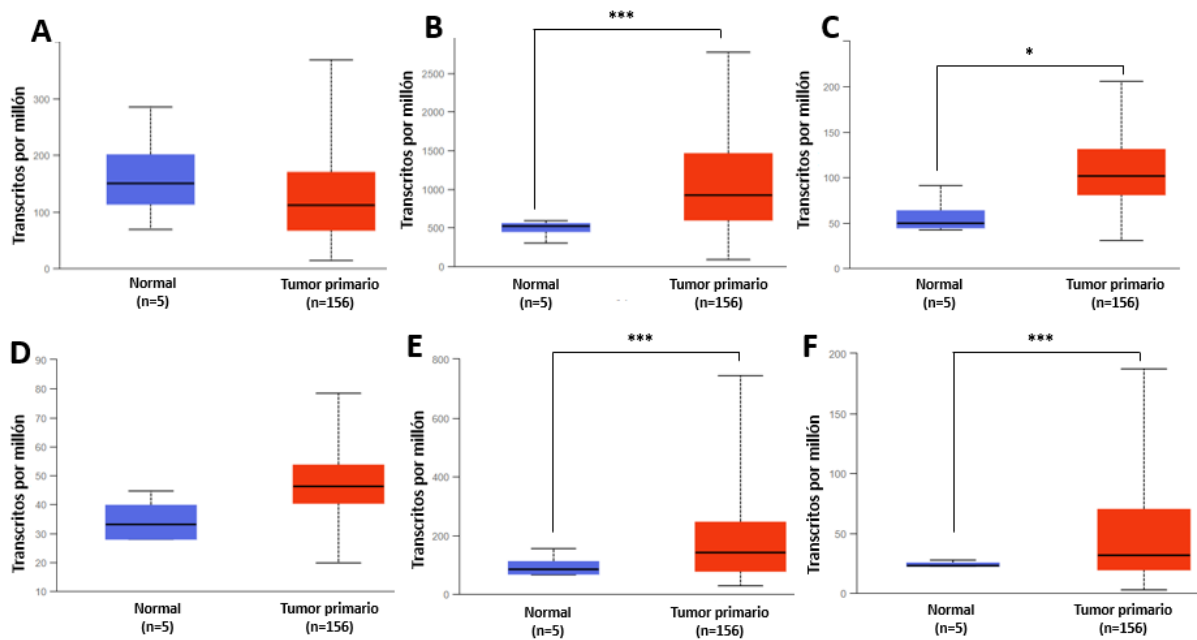


Figura S1. Expresión génica y supervivencia de los genes objetivo en GBM. Niveles de expresión génica de *IFITM1* (A), *IFITM3* (B), *IFNGR1* (C), *IRF3* (D), *ISG15* (E) y *MX1* (F) en tejido tumoral (caja roja) comparado con el tejido normal (caja azul). * p-valor < 0,05 y *** p-valor < 0,001. (Modificado de UALCAN).

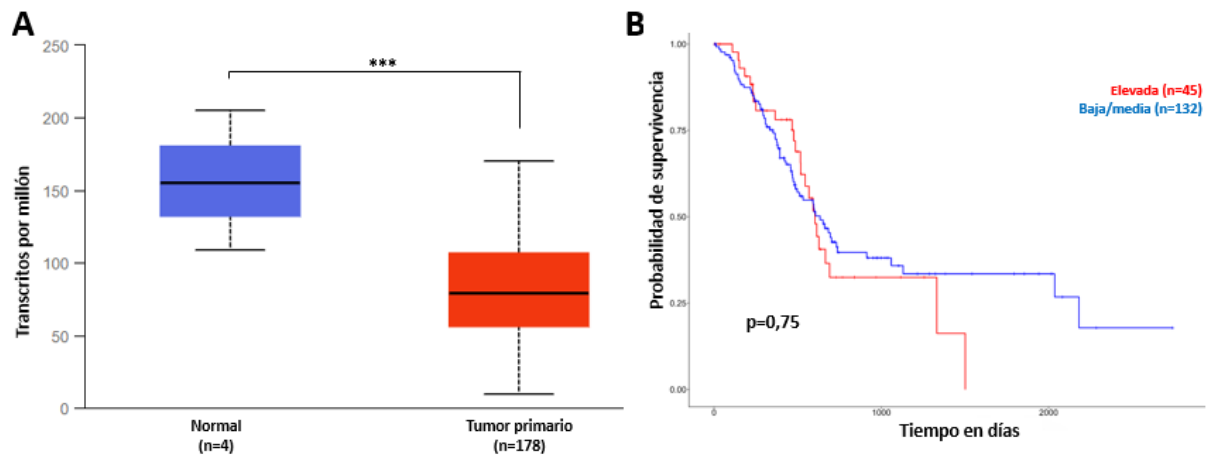


Figura S2. Expresión génica y supervivencia de *IFNGR1* en PAAD. La expresión relativa de *IFNGR1* (A) es significativamente inferior en tejido tumoral (caja roja) comparado con el tejido normal (caja azul). Los análisis de las curvas Kaplan-Meier revelan que no existe relación entre la diferencia de expresión del gen y la supervivencia del paciente. *** p-valor<0,001. (Modificado de UALCAN).