

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO DE FIN DE GRADO EN MEDICINA



**EXPRESIÓN DE NG2, α -SMA, TAU Y RECEPTOR DE IL13 EN EL
GLIOBLASTOMA MULTIFORME.**

Autor: Serralta Ferrer, Lucía.

Tutor: Martínez Pérez, Salvador.

Departamento y: Departamento de Histología y

Anatomía. **Área:** Área de Anatomía y Embriología humana.

Curso académico: 2022/2023.

Convocatoria de: febrero 2023.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| TÍTULO..... | 1 |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 5 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 6 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDIO | 6 |
| 3.2 MUESTRAS Y TÉCNICAS UTILIZADAS | 6 |
| 3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO | 9 |
| 4. RESULTADOS..... | 12 |
| 4.1 MALFORMACIÓN VASCULAR..... | 12 |
| 4.2 MICROAMBIENTE PERITUMORAL E INTERACCIÓN CÉLULAS TUMORALES-PERICITOS | 12 |
| 4.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU | 13 |
| 4.4 EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA 2 DEL RECEPTOR DE LA IL13 | 14 |
| 5. DISCUSIÓN | 16 |
| 5.1 MALFORMACIÓN VASCULAR..... | 16 |
| 5.2 MICROAMBIENTE PERITUMORAL E INTERACCIÓN CÉLULAS TUMORALES-PERICITOS | 18 |
| 5.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU | 20 |
| 5.4 EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA 2 DEL RECEPTOR DE LA IL13 | 21 |
| 5.5 VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 23 |
| 6. CONCLUSIONES | 24 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 25 |

TÍTULO

Expresión de NG2, α -SMA, TAU y receptor de IL13 en el glioblastoma multiforme.

RESUMEN

Introducción

El glioblastoma es la neoplasia cerebral más agresiva y de peor pronóstico, con una esperanza de vida de entre 12-15 meses. La ausencia de un tratamiento eficaz en la actualidad justifica la necesidad de estudios de investigación que caractericen el comportamiento de este tumor.

Material y métodos

El estudio se basa en la realización de un análisis molecular y celular del tumor en la zona de infiltración. El análisis inmunohistoquímico incluyó un total de 104 muestras de gliomas de grado 4 (glioblastoma multiforme [GBM]), procedentes de 16 pacientes, que se procesaron tanto para microscopía óptica con diaminobencidina, como para inmunofluorescencia con marcadores fluorescentes, analizándose la expresión de las proteínas TAU, IL13RA2, NG2 y α SMA.

Resultados y discusión

El análisis de las muestras histológicas evidenció la presencia de una vascularización aberrante, además de un contacto físico entre la célula tumoral y los pericitos, células perivasculares implicadas en la inmunotolerancia frente al tumor. De igual modo, se observa un predominio de la expresión de TAU en la periferia de los vasos, que sugiere que los pericitos podrían estar implicados en su regulación y secreción. Igualmente, se corrobora la expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 en las células del GBM,

describiéndose por primera vez una expresión de este receptor en los pericitos del frente de infiltración tumoral.

Conclusión

Esta investigación demuestra la importancia de analizar las relaciones celulares y moleculares en el microambiente de la zona de infiltración del GBM. Asimismo, se ha puesto a punto un protocolo satisfactorio para la inmunohistoquímica simple y combinada de IL13RA2, que permitirá una mayor eficiencia en la tipificación del GBM. Por tanto, este trabajo aporta una visión global del comportamiento del glioblastoma en las zonas de avance tumoral, necesaria para entender sus mecanismos invasivos y condicionamiento inmunológico.

Palabras clave

Glioblastoma, Pericitos, Unidad neurovascular, Frente de Infiltración, Proteína TAU, IL13RA2.

ABSTRACT

Introduction

The glioblastoma is the most aggressive brain neoplasm and the one with the worst prognosis, having a life expectancy of 12-15 months. The absence of an effective treatment justifies the need for research studies to characterize the behavior of this tumor.

Material and methods

The study is based on molecular and cellular analysis of the tumor in the infiltration zone. Immunohistochemical analysis included a total of 104 grade 4 glioma (glioblastoma

multiforme [GBM]) samples from 16 patients. These were processed with both optical microscopy, with diaminobenzidine, and immunofluorescence, with fluorescent markers, analyzing the expression of TAU, IL13RA2, NG2 and α SMA proteins.

Results and discussion

Analysis of histological samples revealed the presence of aberrant vascularization, as well as physical contact between the tumor cell and pericytes, perivascular cells involved in immunotolerance for the tumor. Similarly, a predominance of TAU expression is observed in the periphery of the vessels, suggesting that pericytes may be involved in its regulation and secretion. Likewise, the expression of the IL13 receptor alpha 2 subunit in GBM cells is corroborated, describing for the first time, an expression of this receptor in the pericytes of the tumor infiltration front.

Conclusion

This research demonstrates the importance of analyzing cellular and molecular relationships in the microenvironment of the GBM infiltration zone. Furthermore, a satisfactory protocol for single and combined IL13RA2 immunohistochemistry has been developed, which will allow more efficient typification of GBM. Therefore, this work provides insight into the behavior of glioblastoma in areas of tumor progression, which is necessary to understand its invasive mechanisms and immunological conditioning.

Key words

Glioblastoma, Pericytes, Neurovascular unit, Infiltration zone, TAU protein, IL13RA2.

1. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma multiforme es considerado la forma más agresiva de neoplasia cerebral, tanto por su letalidad, como por la ausencia de un tratamiento eficaz¹⁻⁴. La media de supervivencia de estos pacientes es de entre 12 a 15 meses, debido a la escasa respuesta al tratamiento convencional (cirugía, radioterapia y quimioterapia)^{1,4}.

Se trata de una neoplasia primaria de las células macrogliales, de crecimiento rápido y gran invasividad, que escapa al control del sistema inmune innato¹. Los mecanismos de crecimiento e infiltración en el GBM son poco conocidos⁵. Por lo tanto, son necesarios más estudios que definan su comportamiento para poder explicar la agresividad del tumor e identificar posibles dianas terapéuticas.

Actualmente, se conoce que las células tumorales invaden siguiendo los espacios perivasculares, interactuando con las células presentes en este espacio conocidas como *pericitos*. Como resultado de esta interacción, conocida como coaptación vascular⁶, se estimula la proliferación de pericitos, la distorsión de los vasos previos y la formación de nuevos vasos^{1,3-7}.

Para el análisis del comportamiento tumoral, se deben distinguir dos zonas; el área intratumoral y la peritumoral, siendo esta última donde se produce la infiltración de las células del GBM en el parénquima sano a través de los espacios perivasculares. Este angiotropismo del GBM está implicado en la inmunotolerancia generada por el tumor, a través del condicionamiento de los pericitos³⁻⁷.

Los pericitos son células estromales que recubren la superficie de los capilares cerebrales y controlan el flujo sanguíneo mediante la regulación del tono vascular^{1,3,8}. Además,

presentan un papel relevante en la defensa inmunológica, intervienen en el mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica^{1,8} y presentan capacidad para adquirir funciones similares a las células madre mesenquimales¹.

Los pericitos resultan relevantes en el estudio del glioblastoma dado que se han aislado en las zonas de invasión de las células tumorales, *los espacios perivasculares*, por lo que se sospechó la implicación de estos en el crecimiento tumoral³⁻⁶. Dependiendo del área del tumor estudiada, el origen y propiedades de los pericitos varían. Se cree que los pericitos intratumorales derivan de las células madre del glioblastoma por un proceso de transdiferenciación, promoviendo la angiogénesis y proliferación tumoral. Sin embargo, los peritumorales no provienen de las células tumorales, pero se ven influidos por el contacto estrecho con las mismas, generando un cambio en su funcionalidad que facilitará el crecimiento del tumor^{1,3-7}.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La necesidad de clarificar el papel de los pericitos peritumorales y sus implicaciones en la patogenia del GBM, lleva a plantear la hipótesis principal del trabajo. Se propone que, el estudio de la interacción entre las células tumorales del glioblastoma y los pericitos en el frente de infiltración, puede permitir identificar proteínas implicadas en la agresividad del tumor y descubrir nuevas dianas terapéuticas.

Como objetivos se plantea de un lado, describir histológicamente la gran malformación vascular característica del GBM.

Por otro lado, verificar la presencia de una interacción física directa entre las células tumorales y los pericitos que explique el nicho de inmunotolerancia propio de este tumor.

Asimismo, dado que estudios sobre el secretoma diferencial de los pericitos condicionados por el GBM han mostrado que TAU podría estar implicada en la respuesta antitumoral^{3,4}, se propone analizar por primera vez la posible secreción de TAU por los pericitos en el microambiente peritumoral.

Como último objetivo, dado que las recientes publicaciones acerca del GBM se centran en la subunidad alfa 2 del receptor de IL13¹³⁻¹⁷ como marcador específico de este tumor, se decidió corroborar la expresión inmunohistoquímica de este receptor en la zona de infiltración y su posible utilidad en el desarrollo de nuevos tratamientos.

A diferencia de gran parte de los estudios que tratan de dilucidar cuál es el comportamiento del glioblastoma en el área intratumoral⁹⁻¹², el presente estudio se basa en analizar el microambiente peritumoral, siendo en esta frontera dónde se está produciendo la respuesta inmune frente al tumor. La inmunidad del microambiente peritumoral en el GBM está reprimida por varios mecanismos. Se cree que el principal desencadenante es la interacción física y molecular entre la célula tumoral y los pericitos³⁻⁷.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Este trabajo consiste en un análisis descriptivo histopatológico de 16 de casos diagnosticados de glioma grado 4, conocido como glioblastoma multiforme.

3.2 MUESTRAS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

Se estudiaron las muestras de 16 pacientes diagnosticados de glioma grado 4, que fueron tratados quirúrgicamente con extirpación de la masa tumoral. Se obtuvieron biopsias de

las regiones identificadas en la Resonancia Magnética Nuclear con mayor malformación vascular peritumoral. Las muestras de 14 de los pacientes fueron obtenidas de la colección de glioblastoma del IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria). Las muestras del decimoquinto paciente provenían del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Elche, y las de la decimosexta, fueron remitidas desde el Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid para la inclusión de una paciente en un ensayo clínico estadounidense. Todas las muestras cumplen con los requisitos éticos necesarios (aprobación del Comité Ético de Experimentación Clínica del Hospital correspondiente); consentimiento informado, aleatorización de datos y calidad de la muestra.

Se analizaron un total de 104 portaobjetos con secciones de parafina de las biopsias tumorales correspondientes. De los primeros 15 pacientes se analizó un promedio de 6 muestras/paciente, identificadas como series paralelas, mientras que del paciente número 16 sólo se disponía de 4 muestras.

Durante la experimentación se sometieron seis muestras de cada paciente a las seis técnicas que se exponen en la **Tabla 1**. A excepción del paciente número 16, que al sólo disponer de cuatro muestras y al haber sido remitido para el estudio específico de la expresión de IL13RA2, se utilizaron todas ellas en el análisis de la expresión de este receptor.

Para la visualización de la vascularización en la zona peritumoral se utilizaron como dianas antígenos específicos de los pericitos; NG2 (proteoglicano condroitínsulfato de la membrana) y la actina de músculo liso, α SMA (proteína contráctil de los pericitos), que se procesaron hacia color marrón en la técnica visible (revelado con diaminobencidina, DAB) y rojo en la inmunofluorescencia.

| TÉCNICA | ANTICUERPO PRIMARIO | ANTICUERPO SECUNDARIO | OBJETIVOS |
|---|---|---|--|
| Inmunohistoquímica visible con DAB: anti-NG2 (marcador de pericitos) | Rabbit anti-NG2 chondroitin sulfate proteoglycan Polyclonal Antibody. | Anti-Rabbit IgG Goat BA-1000. | <ul style="list-style-type: none"> Descripción de la malformación vascular en la zona peritumoral. |
| Inmunohistoquímica visible con DAB: anti-TAU (marcador proteína TAU) | Rabbit anti-Tau (Ser262) Polyclonal Antibody. | Anti-Rabbit IgG Goat BA-1000. | <ul style="list-style-type: none"> Análisis de la expresión de la proteína TAU en el área perivascular. |
| Inmunohistoquímica visible con DAB doble: anti- α SMA (marcador de pericitos) y anti-TAU (marcador proteína TAU) | Mouse Anti-alpha smooth muscle actin Polyclonal Antibody. Rabbit anti-Tau (Ser262) Polyclonal Antibody. | Anti-Mouse IgG BA-9200. Anti-Rabbit IgG Goat BA-1000. | <ul style="list-style-type: none"> Expresión de la proteína TAU en el área perivascular y análisis de la posible implicación de los pericitos en su secreción. Descripción de la malformación vascular en la zona peritumoral. |
| Inmunofluorescencia doble: anti- α SMA (marcador de pericitos) y anti-TAU (marcador proteína TAU) | Mouse Anti-alpha smooth muscle actin Polyclonal Antibody. Rabbit anti-Tau (Ser262) Polyclonal Antibody. | Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594 (red) A 11032. Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 (green) A 21206. | <ul style="list-style-type: none"> Expresión de la proteína TAU en el área perivascular y análisis de la posible implicación de los pericitos en su secreción. Descripción de la malformación vascular en la zona peritumoral. |
| Inmunohistoquímica visible con DAB: anti-IL3RA2 (marcador de células tumorales de glioblastoma) | Goat anti- IL-13 α 2 Antigen Affinity-purified Polyclonal Antibody. | Anti-Goat IgG Donkey ab6880. | <ul style="list-style-type: none"> Análisis de la expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 por las células tumorales. |
| Inmunofluorescencia doble: anti-NG2 (marcador de pericitos) y anti-IL3RA2 (marcador de células tumorales de glioblastoma) | Rabbit anti-NG2 chondroitin sulfate proteoglycan Polyclonal Antibody. Goat anti- IL-13 α 2 Antigen Affinity-purified Polyclonal Antibody. | Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594 (red) ab150076. Anti-Goat IgG Alexa Fluor 488 (green) A 11039. | <ul style="list-style-type: none"> Análisis de la expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 por las células tumorales. Verificar la presencia de una interacción física directa entre las células tumorales y los pericitos. Descripción de la malformación vascular en la zona peritumoral. |

Tabla 1: Técnicas realizadas, anticuerpos y objetivos de cada una de ellas.

Dada la relevancia del contacto físico entre el pericito y la célula tumoral, se realizaron inmunohistoquímicas dobles usando marcadores fluorescentes, en las que se efectuó un marcaje de los pericitos con anticuerpos frente a NG2 (color rojo) y un marcaje de la célula tumoral con anticuerpos frente la subunidad alfa 2 del receptor de IL13, IL13RA2 (verde).

Ambos son antígenos específicos de cada una de estas células y nos permite analizar un posible contacto entre ellas.

Para observar la implicación de los pericitos en la secreción de la proteína TAU se han realizado varias tinciones inmunohistoquímicas; visibles con DAB con marcaje único de TAU (color marrón), visibles con DAB con un doble marcaje tanto de la proteína TAU (color rojo) como de los pericitos (marcaje de α SMA, color marrón) e inmunofluorescencia con marcaje doble (TAU en color verde y pericitos en color rojo).

Asimismo, se ha analizado la expresión del receptor alfa 2 de IL13 (IL13RA2) en el glioblastoma mediante la realización de inmunohistoquímicas tanto visibles con DAB con marcaje de IL13RA2 (color marrón), como inmunofluorescencias con marcaje de IL13RA2 (en color verde) y de los pericitos con anticuerpos anti-NG2 (color rojo).

3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO

1.1.1 Materiales:

Además de los compuestos habituales, se utilizó PBS (solución salina isotónica de tampón fosfato pH 7, 0,1M), Tritón (detergente permeabilizador de membrana), Citrato sódico (solución desenmascaradora de antígenos), H₂O₂ (catalizador de la reacción de precipitado de DAB), BSA (albúmina sérica bovina), DAKO (diluyente de anticuerpos), Diaminobencidina (sustrato de la peroxidasa marcador de los antígenos), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), Eukitt (para montaje en microscopia convencional), Mowiol (para montaje en microscopia de fluorescencia), Anticuerpos primarios y secundarios (**Tabla 1**).

1.1.2 Inmunohistoquímica convencional con luz visible

Partiendo de las muestras incluidas en parafina se deben calentar en estufa y rehidratar con baños progresivos en Xilol y etanoles. Tras lavados con PBS, se debe desenmascarar con tampón citrato, para exponer de nuevo los antígenos que hayan podido quedar ocultos. Para ello, se hierven las preparaciones en una disolución 0,1 M de tampón citrato sódico a pH 6. Tras esto, se realizan tres lavados con PBS-Tritón (PBS-T). Posteriormente, se realiza el bloqueo de la peroxidasa incubando la muestra con PBS-T y H₂O₂ al 3%, para mitigar la tinción de fondo y los falsos positivos generados por la peroxidasa endógena. Tras esto, se vuelven a realizar lavados con PBS-T y se coloca el bloqueo con BSA durante 1h 30 min, para prevenir la unión no específica de los anticuerpos a antígenos inespecíficos. El último paso del primer día es la preparación del anticuerpo primario diluido en DAKO y la incubación sobre los portaobjetos en oscuridad durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se inicia con lavados de PBT y se realiza la preparación e incubación durante 1 hora del anticuerpo secundario conjugado a biotina diluido en PBS-T. Tras esto, volverán a realizarse lavados de PBS-T y se colocará el complejo ABC (avidina-biotina-peroxidasa) durante 1 hora, que se une al anticuerpo secundario de manera específica. Tras esto, volverán a realizarse lavados primero con PBS-T y posteriormente con PBS sin tritón, para finalmente realizar el revelado con DAB (diaminobencidina). El revelado consiste en colocar las preparaciones en un medio que contiene PBS, 1% DAB y 0,002% de H₂O₂. La diaminobencidina reacciona con la enzima peroxidasa del complejo ABC, dando lugar a un producto de color marrón. Finalmente, se parará la reacción

introduciendo los portaobjetos en PBS, se deshidratarán las muestras y se montarán en Eukitt.

1.1.3 Inmunofluorescencia

El protocolo al inicio es el mismo que en la inmunohistoquímica visible, hasta llegar a la incubación del anticuerpo secundario. Dado que el anticuerpo secundario está conjugado a un fluorocromo, las muestras deben estar en oscuridad a partir de este paso. Tras la incubación, se realizarán lavados en PBT y seguidamente en PBS. Finalmente, se colocará el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), marcador fluorescente que se une a la adenina y timina del ADN, por lo que permite marcar el núcleo celular. Se volverán a realizar lavados con PBS y montaje con Mowiol.

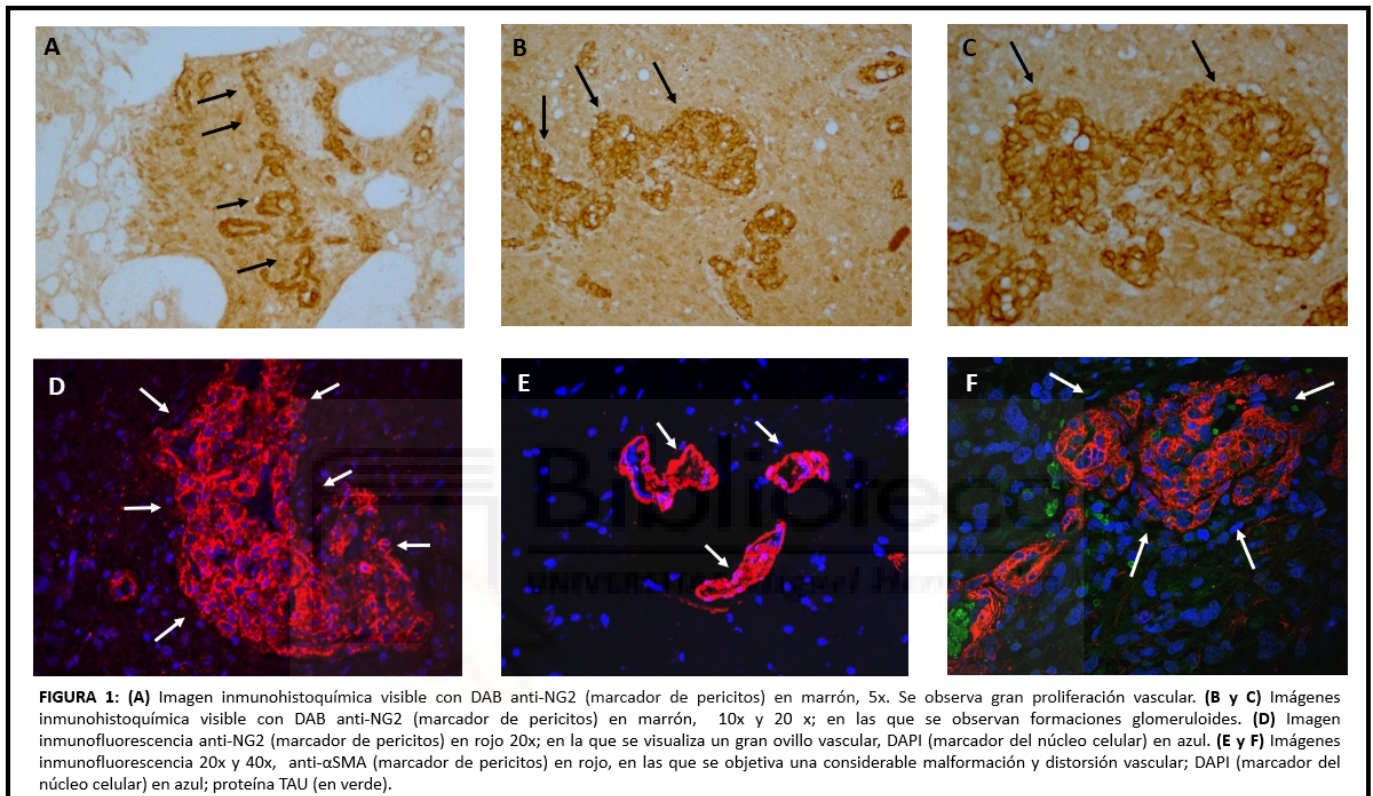
1.1.4 Visualización y análisis al microscopio

Una vez finalizado el protocolo, se visualizaron las muestras al microscopio por dos observadores (autora y tutor del trabajo) y en caso de acuerdo entre ambos, se dio la muestra como positiva y se pasó a la obtención de las imágenes.

4. RESULTADOS

4.1 MALFORMACIÓN VASCULAR

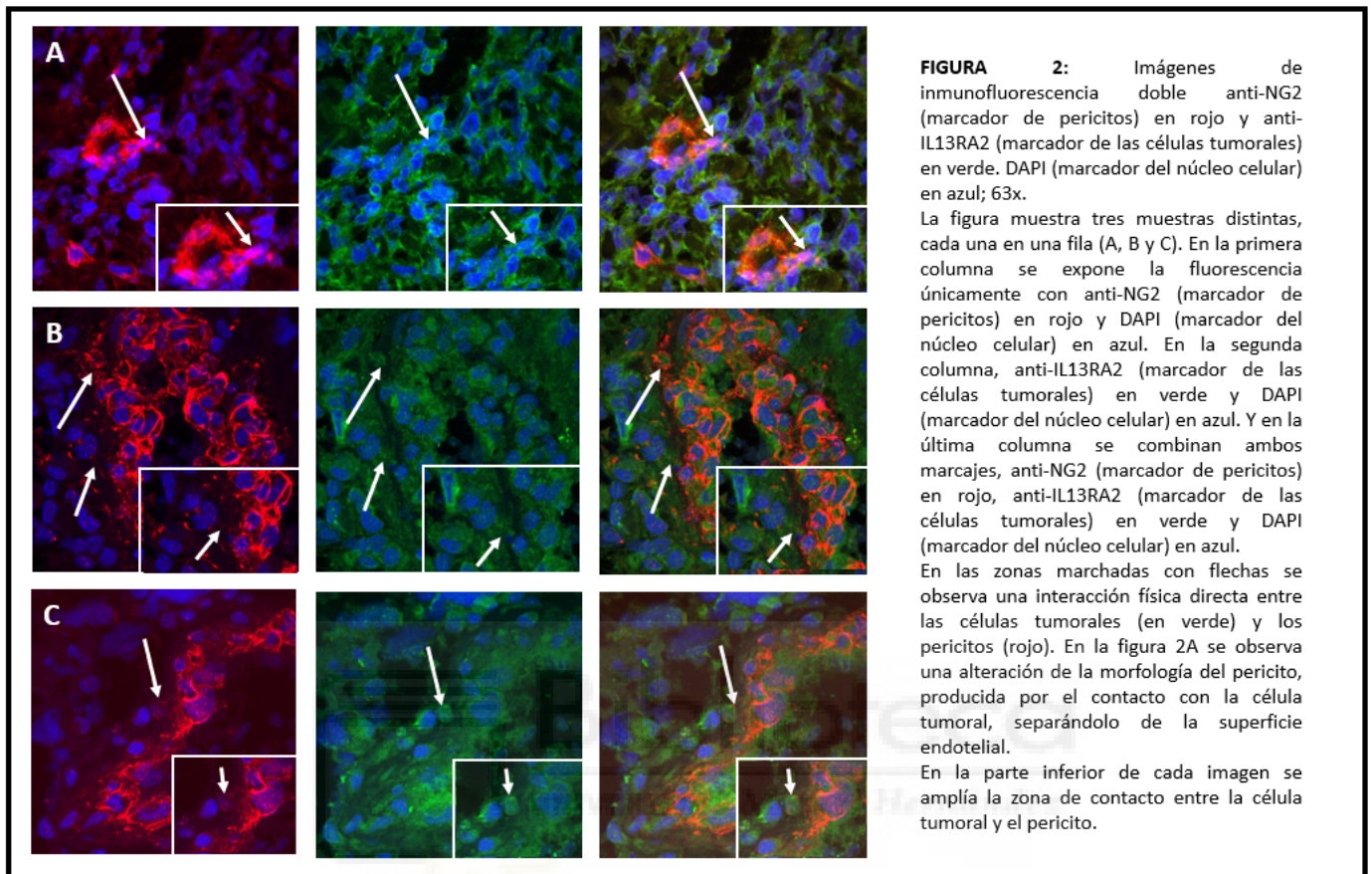
La malformación vascular propia del glioblastoma y las formaciones glomeruloides están presente de manera inequívoca en las muestras expuestas en la **Figura 1**. A mayor aumento, se objetiva la presencia de tortuosidad y malformación de los vasos.



4.2 MICROAMBIENTE PERITUMORAL E INTERACCIÓN CÉLULAS TUMORALES-PERICITOS

En las imágenes de inmunohistoquímica presentadas en la **Figura 2** se observa cómo las células tumorales, marcadas con el anticuerpo contra IL13RA2, emiten unas prolongaciones alargadas de tipo pseudopodial (flectopodios según Capani et al. ⁶) que contactan con los pericitos, marcados con anti-NG2. En las zonas de contacto se observa

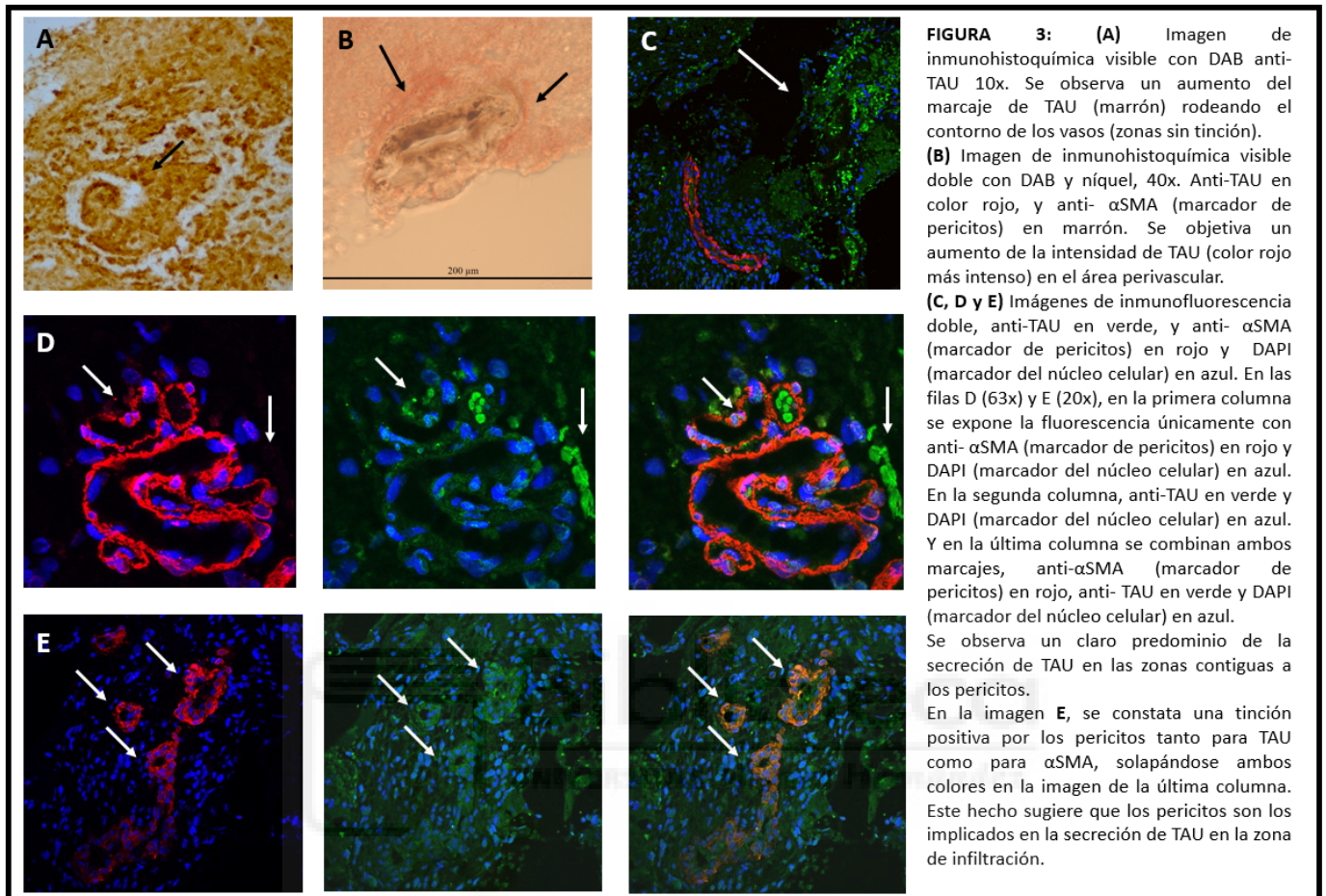
una alteración de la morfología del pericito, separándolo de la superficie endotelial (flecha blanca en **Figura 2A**).



4.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU

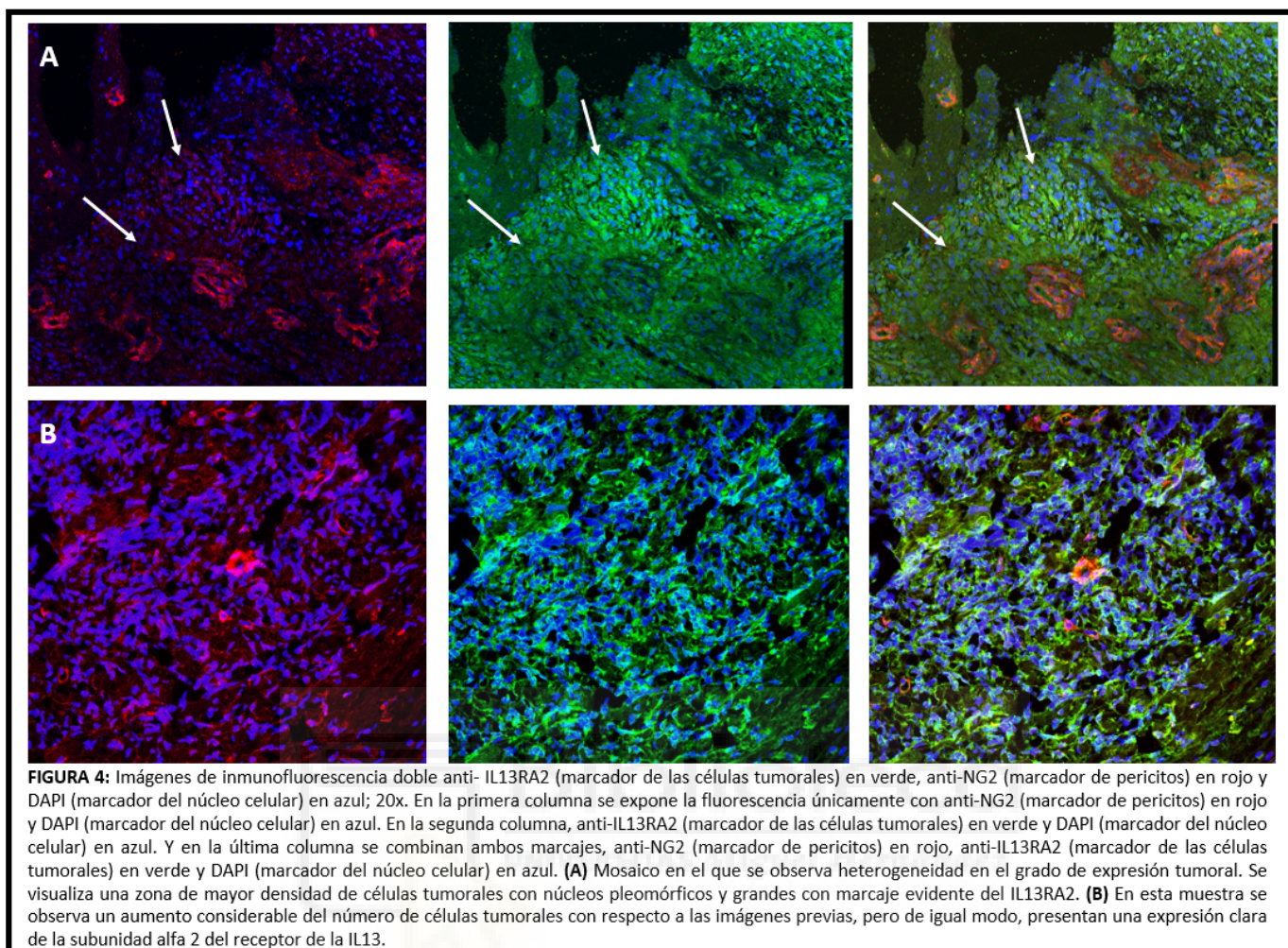
Tal y como se observa en las muestras presentadas en la **Figura 3**, en el tejido cerebral normal, se ve reducida tanto la expresión de proteína TAU como la expresión de NG2 en pericitos. Sin embargo, en la zona de infiltración tumoral existe un claro incremento de la proteína TAU en la zona perivascular en comparación con el resto de tejido tumoral. A mayores aumentos se objetiva cómo células que expresan α SMA (rojo) y que por tanto son pericitos, también expresan la proteína TAU (verde), hecho que sugiere que estas

células pueden estar implicadas en la secreción de esta proteína en las regiones perivasculares del área de infiltración.



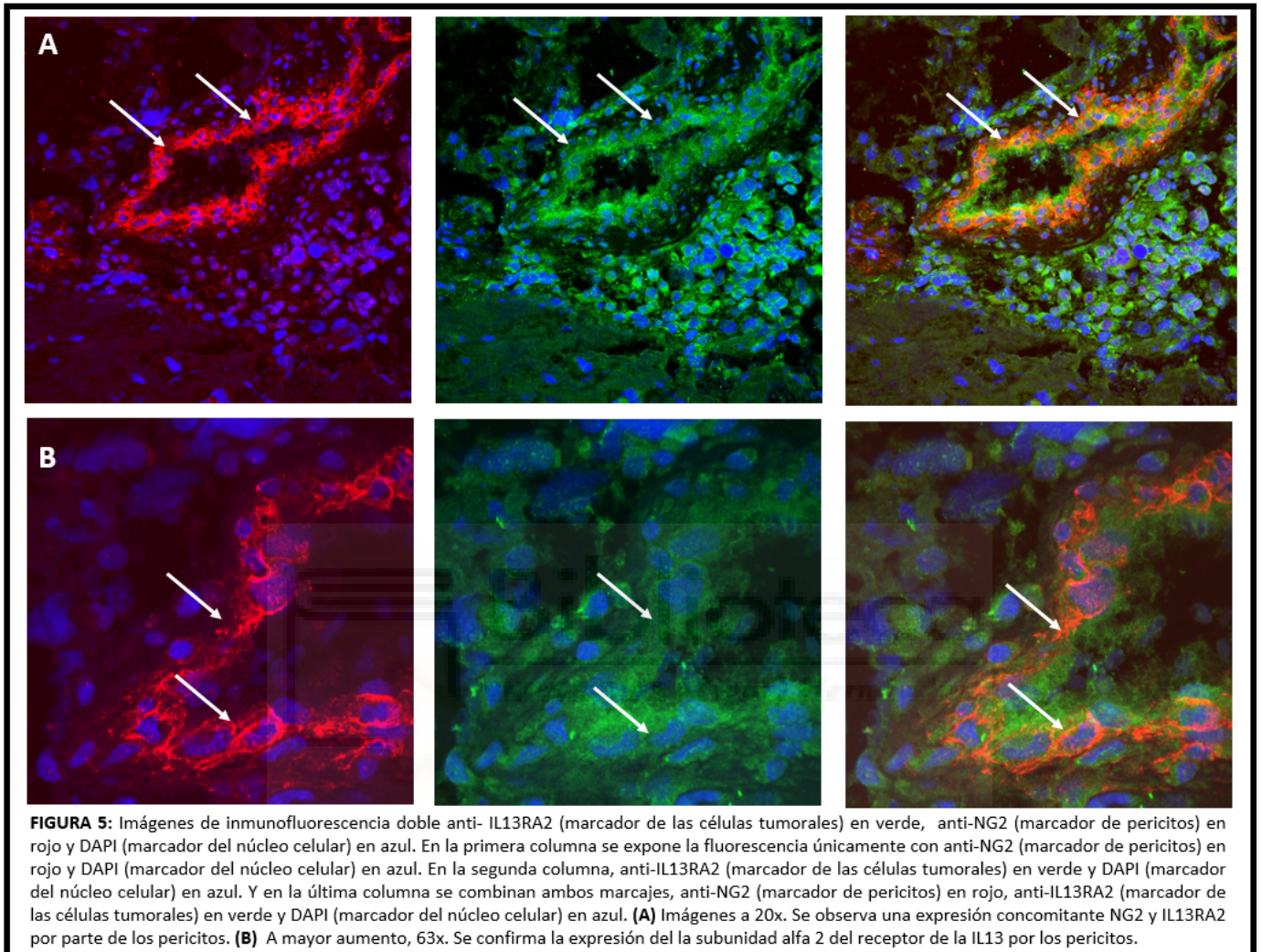
4.4 EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA 2 DEL RECEPTOR DE LA IL13

En las imágenes de la **Figura 4**, se identifican de manera clara células tumorales con núcleos pleomórficos y en fase de división; que están expresando IL13RA2 y se objetiva una predominancia de las células tumorales en la zona perivascular. Por lo tanto, se confirma que las células tumorales del glioblastoma presentan esta subunidad del receptor en su superficie.



En las muestras sometidas a esta técnica también se halló un resultado inesperado no documentado en otros estudios. Las células que presentaban una expresión de NG2 (rojo) y que por tanto, son compatibles con pericitos, también presentan una expresión del IL13RA2. Tal y cómo se muestra en las imágenes de la **Figura 5**, existen unas células con núcleos agrandados que expresan únicamente IL13RA2 (verde) compatibles con células tumorales. Sin embargo, existen otras células perivasculares (pericitos) con núcleos de aspecto normal que expresan tanto NG2 (rojo) como IL13RA2 (verde), dando una imagen

de color amarillo por la coexpresión de ambos colores. Por tanto, los pericitos también expresan IL13RA en su superficie.



5. DISCUSIÓN

5.1 MALFORMACIÓN VASCULAR

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con lo publicado hasta el momento acerca de la vascularización de los gliomas. En concreto, se ha constatado que está presente la malformación vascular anómala que dota a este tumor de una mayor agresividad en comparación con otras neoplasias (**Figura 1**).

Los gliomas de alto grado se caracterizan por la presencia de una vascularización aberrante que promueve la invasión tumoral, existiendo una relación entre el grado de proliferación vascular y la agresividad del tumor ^{2,6,8,18-20}.

Se cree que inicialmente los glioblastomas se agrupan y proliferan en zonas perivasculares dada su gran necesidad de aporte de oxígeno y nutrientes. En fases posteriores, a través de la secreción de factores de crecimiento tipo VEGF, inducen la neoformación de vasos inducida por la hipoxia. Todo esto se traduce en vasos tortuosos, dilatados y con morfología aberrante^{8,18}.

Muchos estudios apuntan a un predominio del proceso de neoangiogénesis como principal causante de la anomalía vascular característica del GBM^{18,20}. Sin embargo, otros trabajos respaldan que el proceso de malformación es subsecuente a la coaptación vascular por el contacto con el GBM⁶, más que por un proceso de neoangiogénesis; al menos al inicio de la interacción del GBM con la unidad neurovascular.

Existen múltiples estudios que defienden que la expresión de EGFR en las células tumorales se asocia a una mayor capacidad de proliferación y de migración tumoral^{8,18,20}.

En base a lo descrito, ya ha sido aprobado un fármaco neutralizador del factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) conocido como bevacizumab, pero no se ha objetivado un aumento de la supervivencia⁸. Este hecho respalda que de inicio la malformación vascular sea debida a la interacción del GBM con el pericito y no a la neoangiogénesis.

Recientemente se ha demostrado la alta expresión de la proteína N-MYC en los glioblastomas y la posibilidad de inhibirla mediante un péptico conocido como IDP-410, permitiendo reducir la vascularización y el crecimiento del tumor ²¹.

En base a lo expuesto, la interacción entre las células tumorales y las células de la unidad neurovascular, se considera un posible objetivo terapéutico prometedor.

5.2 MICROAMBIENTE PERITUMORAL E INTERACCIÓN CÉLULAS TUMORALES-PERICITOS

El microambiente peritumoral sigue siendo un área con grandes incógnitas y a la vez, una zona con grandes implicaciones terapéuticas.

La interacción entre los pericitos y las células tumorales es un punto clave en la generación de la inmunotolerancia³⁻⁷, sin embargo, no es muy bien conocida. Mediante el análisis inmunohistoquímico realizado en este trabajo se observan datos que sugieren una interacción intercelular directa entre las células tumorales y los pericitos (**Figura 2**). Las células del glioblastoma emiten unas prolongaciones hacia el pericito (flectopodias) estableciéndose el contacto entre ambos⁶.

Muchos estudios se centran en el área intratumoral⁹⁻¹², sin embargo, para poder encontrar nuevas dianas terapéuticas hay que centrarse en la periferia, dónde el sistema inmune trata de sobreponerse y delimitar el avance tumoral. Las células T de la periferia presentan la capacidad de destruir a las células tumorales, sin embargo, se ven inhibidas mediante distintos mecanismos de control³⁻⁷. Por este motivo, en el presente trabajo se analiza el comportamiento del tumor en la zona de infiltración, dónde los pericitos están siendo condicionados por las células tumorales.

Este nicho de inmunotolerancia viene propiciado por el contacto entre el pericito y la célula tumoral, que origina un cambio en la funcionalidad del pericito, pasando de proinflamatorio a antiinflamatorio y consecuentemente, de actividad antitumoral a protumoral. Se ha demostrado que la inducción de propiedades inmunotolerantes requiere el contacto físico célula-célula entre los pericitos y las células tumorales³⁻⁷. Sin

embargo, los mecanismos que regulan dicha interacción son desconocidos. Por ello, este trabajo trata de definir histológicamente la interacción entre ambas células.

Caspani et al.⁶ propusieron que existe una inyección de Cdc42 del tumor al pericito que podría explicar los cambios conformacionales de este y la estabilización del contacto intercelular.

Tras el condicionamiento del pericito se ha descrito un aumento en la secreción de citoquinas antiinflamatorias y una disminución de las proinflamatorias. Igualmente, aumenta la expresión del ligando PDL1 en los pericitos y en las células tumorales, inhibiendo la acción de los linfocitos T^{3,5,7}. Además, se ha descrito tanto una reducción de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II como de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en los pericitos, siendo indispensables para la activación de los linfocitos T^{3,5,7}.

Se ha demostrado que todos estos cambios son debidos al aumento de la autofagia mediada por chaperonas (CMA). Se produce un repunte de los niveles de LAMP2A (principal regulador de la CMA) tras el estallido de estrés oxidativo desencadenado por el contacto de las células tumorales con los pericitos³⁻⁷. Se ha comprobado que el bloqueo genético de esta autofagia, mediante el bloqueo de LAMP2A, reduce la tolerancia inmune y capacita a los pericitos para destruir a las células tumorales; obteniéndose una reducción considerable del tumor³. Todo ello sugiere que existen proteínas antitumorales que son secretadas por el pericito cuando no está condicionado por el tumor. Por tanto, el aumento de la CMA provoca una degradación de moléculas antitumorales secretadas por el pericito.

Por todo ello, la autofagia mediada por chaperonas es una diana terapéutica que podría resultar de gran utilidad en el tratamiento del glioblastoma multiforme.

5.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU

Hasta el presente estudio no se había analizado la expresión de la proteína TAU en el ambiente peritumoral, dónde podría tener un papel relevante en las propiedades antitumorales de los pericitos. Las imágenes de inmunofluorescencia presentadas demuestran un predominio de esta proteína en las zonas perivasculares adyacentes a los pericitos (**Figura 3**). Asimismo, se ha observado una tinción positiva para TAU en el interior de los pericitos. Estos hallazgos, junto con la presencia de esta proteína en el secretoma del pericito con CMA bloqueada^{3,4}, sugieren que los pericitos son las células implicadas en la secreción de la proteína TAU y que es una de las proteínas con propiedades antitumorales implicadas en la destrucción del tumor.

La activación de la CMA suprime la secreción de proteínas antitumorales por parte del pericito. En base a ese hecho, en un estudio recientemente publicado⁴, se procedió a analizar el secretoma del pericito en presencia de células tumorales, con y sin bloqueo de la autofagia. Al bloquear LAMP2A, en el secretoma del pericito se encontraron proteínas con posible implicación en propiedades antitumorales, entre las que se encontraba TAU⁴.

TAU es una proteína implicada en la estabilización, mantenimiento y transporte axonal. Es bien conocida por su implicación en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer, pero también tiene implicación en la transmisión sináptica en el sistema nervioso sano.

Los estudios que han tratado de describir la implicación de esta proteína en el glioblastoma se han centrado en el área intratumoral⁹⁻¹². Se ha demostrado que la

cantidad de esta proteína es superior en los glioblastomas con mutaciones IDH1/2 (isocitrato deshidrogenasa), asociándose con tumores de bajo grado. Por tanto, unos niveles superiores de esta proteína se han vinculado con un mejor pronóstico⁹⁻¹². Asimismo, se ha descrito la capacidad de TAU de inhibir el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de bloquear la transdiferenciación de las células tumorales a células similares a los pericitos, reduciendo la vascularización tumoral. Por tanto, según los estudios realizados en el área intratumoral, el aumento de expresión de esta proteína se correlaciona con un mejor pronóstico al oponerse a la señalización mediada por EGFR^{9,12}.

Son necesarios más estudios como el presente que profundicen el grado de expresión de esta proteína en el frente de infiltración y su más que probable relación con los pericitos y con un efecto antitumoral.

5.4 EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA 2 DEL RECEPTOR DE LA IL13

El protocolo terapéutico actual para el manejo del glioblastoma se basa en la cirugía, radioterapia y quimioterapia con temozolamida, pero el pronóstico sigue siendo fatal^{1,4,9}.

Por este motivo, la investigación se está enfocando en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. Dado el éxito de la inmunoterapia en muchos tumores, los estudios han tratado de identificar un antígeno específico de este tumor. Actualmente, es el receptor alfa 2 de IL13 (IL13RA2) el antígeno que ha demostrado una mayor especificidad^{13-17, 22-26}.

Pese a que la presencia de este antígeno en la membrana de las células tumorales del glioblastoma ha sido descrita por varias técnicas, escasos estudios han realizado análisis inmunohistoquímicos que muestren esta expresión. En este trabajo se confirma

histológicamente que esta subunidad del receptor se expresa en las células del glioblastoma (**Figura 4**).

En las células tumorales, la IL-13 se une con alta afinidad a la subunidad alfa 2 (IL13RA2), desencadenando una cascada intracelular que deriva en una mayor proliferación, invasión y metástasis tumoral; por lo que resulta una diana terapéutica de gran relevancia^{13-17,22,23}. Asimismo, la sobreexpresión de este receptor se ha asociado con mayor resistencia a la temozolamida ²⁶.

Se han diseñado múltiples métodos de inmunoterapia frente a este receptor, desde inmunotoxinas, vacunas, anticuerpos monoclonales, péptidos conjugados y células CART. Los primeros estudios utilizaron una proteína quimérica formada por IL13 y un derivado de exotoxina de pseudomonas; con la que se observó una considerable regresión del tumor^{15,17}.

A raíz del éxito de las células CART, se consideró la posibilidad de utilizar esta técnica frente a esta neoplasia. Mediante este procedimiento se crean células T citotóxicas específicas frente al receptor alfa 2 de IL13 (IL13RA2) permitiendo una destrucción selectiva de la célula tumoral. Esta técnica ha demostrado una considerable regresión del tumor y ya se han iniciado ensayos clínicos para evaluar su seguridad y toxicidad ²⁴⁻²⁶.

Los artículos publicados hasta el momento defienden que la expresión de IL13RA2 está presente exclusivamente en las células tumorales ^{16,25,26}. Sin embargo, en este trabajo (**Figura 5**) se demuestra que hay una clara expresión de este receptor en la superficie de los pericitos de la zona de infiltración que no había sido descrita hasta el momento. Esto implica también el que al usar células CART anti IL13RA2 se desarrolle una inmunoterapia

dual, contra la células del GBM y contra células de nicho tumoral, que están ayudando a la progresión tumoral.

5.5 VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como ventajas de este estudio, cabe destacar, la visión global del comportamiento del glioblastoma, que ayudará al diseño de estudios posteriores más específicos. Asimismo, se ha centrado el estudio en un área escasamente analizada y con grandes implicaciones terapéuticas, la zona de infiltración y su relación con la unidad neurovascular. Por otro lado, otorga una demostración histológica de la expresión de IL13RA2 en las células tumorales, y datos histológicos que sugieren que los pericitos son las células implicadas en la secreción de TAU; además de aportar nuevos hallazgos aún no descritos en la literatura como es la expresión de este receptor en los pericitos.

Como principal limitación se encuentra el tamaño muestral. Sin embargo, dada la baja incidencia de este tumor y la corta esperanza de vida de los pacientes, la disponibilidad de muestras es menor que en otras neoplasias. Asimismo, los procedimientos realizados sobre las muestras suponen un alto coste económico.

Cabe destacar que varias de las muestras se utilizaron para la creación de un protocolo satisfactorio para la inmunohistoquímica de IL13RA2. Esto último, más que una limitación supuso una ventaja, dado que ha permitido la creación de un protocolo que ha sido solicitado por grupos de investigadores españoles y estadounidenses.

6. CONCLUSIONES

En el presente estudio de investigación se ha demostrado la importancia de analizar el comportamiento de las células tumorales y su relación con los pericitos en la zona de infiltración. Es esta localización, una de las principales particularidades que lleva a que este estudio difiera de lo investigado hasta el momento.

Se ha constatado la presencia de una vascularización de morfología aberrante y con patrón glomeruloide, característico de este tumor. Asimismo, se ha demostrado histológicamente la presencia de un contacto físico entre la célula tumoral y los pericitos, implicado en la inmunotolerancia. Además, se exponen imágenes que muestran un predominio de la expresión de la proteína TAU tanto en la periferia de los vasos infiltrados como en el interior de los pericitos, datos que sustentan que estas células están implicadas en la secreción de esta proteína. Igualmente, se corrobora la expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 por las células tumorales, describiéndose por primera vez la expresión de este receptor en los pericitos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Molina ML, Valdor R. The Effect of Glioblastoma on Pericytes. *Curr. Tissue Microenviron Rep.* 2020; 1: 171-181. Doi: 10.1007/s43152-020-00016-7
2. Sanchís JM. Tumores gliales astrocitarios de alto grado. Caracterización clínica, radiológica y neuropatológica. Valoración de la importancia en el diagnóstico y pronóstico. Valencia: Departamento de Patología, Universidad de Valencia; 2009
3. Valdor R, García-Bernal D, Riquelme D, Martínez CM, Moraleta JM, Cuervo AM, et al. Glioblastoma ablates pericytes antitumor immune function through aberrant up-regulation of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019; 116(41): 20655-65. doi: 10.1073/pnas.1903542116.
4. Molina ML, García-Bernal D, Salinas MD, Rubio G, Aparicio P, Moraleta JM, et al. Chaperone-Mediated Autophagy Ablation in Pericytes Reveals New Glioblastoma Prognostic Markers and Efficient Treatment Against Tumor Progression. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10: 797945. doi: 10.3389/fcell.2022.797945.
5. Valdor R, García-Bernal D, Bueno C, Ródenas M, Moraleta JM, Macian F, et al. Glioblastoma progression is assisted by induction of immunosuppressive function of pericytes through interaction with tumor cells. *Oncotarget.* 2017; 8(40): 68614-26. doi: 10.18632/oncotarget.19804.
6. Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martínez S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PLoS One.* 2014; 9(7): e101402. doi: 10.1371/journal.pone.0101402.

7. Molina ML, García-Bernal D, Martínez S, Valdor R. Autophagy in the Immunosuppressive Perivascular Microenvironment of Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2019; 12(1): 102. doi: 10.3390/cancers12010102.
8. Guijarro I. Implicaciones funcionales del pericito en la respuesta inmune y en angiogénesis. Identificación de potenciales marcadores predictivos de respuesta a terapias antiangiogénicas. Madrid: Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid; 2013.
9. Segura B. IDH-TAU-EGFR determinan el fenotipo vascular y la patología del glioma [tesis doctoral]. Madrid: Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Universidad Autónoma de Madrid; 2019
10. Gargini R, Segura-Collar B, Sánchez-Gómez P. Novel Functions of the Neurodegenerative-Related Gene Tau in Cancer. *Front Aging Neurosci*. 2019; 11: 231. doi: 10.3389/fnagi.2019.00231.
11. Cejalvo T, Gargini R, Segura-Collar B, Mata-Martínez P, Herranz B, Cantero D, et al. Immune Profiling of Gliomas Reveals a Connection with IDH1/2 Mutations, Tau Function and the Vascular Phenotype. *Cancers*. 2020; 12(11): 3230. Doi: 10.3390/cancers12113230
12. Gargini R, Segura-Collar B, Herránz B, García-Escudero V, Romero-Bravo A, Núñez FJ, et al. The IDH-TAU-EGFR triad defines the neovascular landscape of diffuse gliomas. *Sci Transl Med*. 2020 ;12(527): eaax1501. doi: 10.1126/scitranslmed.aax1501.
13. Sengupta S, Thaci B, Crawford AC, Sampath P. Interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma immunotherapy. *Biomed Res Int*. 2014; 1-8. doi: 10.1155/2014/952128.

14. Thaci B, Brown CE, Binello E, Werbaneth K, Sampath P, Sengupta S. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma therapy. *Neuro Oncol.* 2014; 16(10): 1304-12. doi: 10.1093/neuonc/nou045.
15. Debinski W, Obiri NI, Pastan I, Puri RK. A novel chimeric protein composed of interleukin 13 and Pseudomonas exotoxin is highly cytotoxic to human carcinoma cells expressing receptors for interleukin 13 and interleukin 4. *J Biol Chem.* 1995; 270(28): 16775-80. doi: 10.1074/jbc.270.28.16775.
16. Debinski W, Obiri NI, Powers SK, Pastan I, Puri RK. Human glioma cells overexpress receptors for interleukin 13 and are extremely sensitive to a novel chimeric protein composed of interleukin 13 and pseudomonas exotoxin. *Clin Cancer Res.* 1995; 1(11): 1253-8.
17. Debinski W, Miner R, Leland P, Obiri NI, Puri RK. Receptor for interleukin (IL) 13 does not interact with IL4 but receptor for IL4 interacts with IL13 on human glioma cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(37): 22428-33. doi: 10.1074/jbc.271.37.22428.
18. Tang J, Li Y, Liu B, Liang W, Hu S, Shi M, et al. Uncovering a Key Role of ETS1 on Vascular Abnormality in Glioblastoma. *Pathol Oncol Res.* 2021; 27: 1609997. doi: 10.3389/pore.2021.1609997.
19. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* 2020; 20(1): 26-41. doi: 10.1038/s41568-019-0205-x.
20. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2020; 57(5): 2461-78. doi: 10.1007/s12035-020-01892-8.

21. Gargini R, Segura-Collar B, Garranzo-Asensio M, Hortigüela R, Iglesias-Hernández P, Lobato-Alonso D, et al. IDP-410: a Novel Therapeutic Peptide that Alters N-MYC Stability and Reduces Angiogenesis and Tumor Progression in Glioblastomas. *Neurotherapeutics*. 2022; 19(1): 408-20. doi: 10.1007/s13311-021-01176-6.
22. Mintz A, Gibo DM, Slagle-Webb B, Christensen ND, Debinski W. IL-13R α 2 is a glioma-restricted receptor for interleukin-13. *Neoplasia*. 2002; 4(5): 388-99. doi: 10.1038/sj.neo.7900234.
23. Caput D, Laurent P, Kaghad M, Lelias JM, Lefort S, Vita N, et al. Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain. *J Biol Chem*. 1996; 271(28): 16921-6. doi: 10.1074/jbc.271.28.16921.
24. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*. 2016; 375(26): 2561-9. doi: 10.1056/NEJMoa1610497.
25. Kahlon KS, Brown C, Cooper LJ, Raubitschek A, Forman SJ, Jensen MC. Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res*. 2004; 64(24): 9160-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0454.
26. Knudson KM, Hwang S, McCann MS, Joshi BH, Husain SR, Puri RK. Recent Advances in IL-13R α 2-Directed Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2022; 13: 878365. doi: 10.3389/fimmu.2022.878365.



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 23 de octubre del 2022

| | |
|--|---|
| Nombre del tutor/a | SALVADOR MARTÍNEZ PÉREZ |
| Nombre del alumno/a | LUCÍA SERRALTA FERRER |
| Tipo de actividad | Adherido a proyecto |
| Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado) | Expresión de NG2, alfa-smooth, TAU y receptor de IL13 en el glioblastoma multiforme |
| Código/s GIS estancias | |
| Evaluación Riesgos Laborales | No procede |
| Evaluación Ética | No procede |
| Registro provisional | 221022114527 |
| Código de Investigación Responsable | TFG.GME.SMP.LSF.221022 |
| Caducidad | 2 años |

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Expresión de NG2, alfa-smooth, TAU y receptor de IL13 en el glioblastoma multiforme** ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.



La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández en el curso académico 2020/2021. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/tfg-tfm/>

