



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2023-24

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Evaluación de un conjunto de genes como posibles biomarcadores diagnósticos y/o dianas terapéuticas para el glioblastoma multiforme.

Autor: Elisa Chihaiia Rodríguez

Tutor académico: Prof. Dr. Miguel Saceda Sánchez

Co-tutora: Dra. María Fuentes Baile

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

D. Miguel Saceda Sánchez, Doctor y Profesor Asociado del área de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche **Dña. María Fuentes Baile**, Doctora en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche de la Universidad Miguel Hernández.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“Evaluación de un conjunto de genes como posibles biomarcadores diagnósticos y/o dianas terapéuticas para el glioblastoma multiforme.”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta: **Dña. Elisa Chihai Rodríguez** ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 26 de junio de 2020

Fdo.: Prof. Miguel Saceda Sánchez

Fdo.: Dra. María Fuentes Baile

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Se estimó una incidencia de alrededor de 20 millones de casos durante el año 2022 y se prevé un incremento del 76% para el año 2050. Por ello, surge la necesidad de encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan mejorar su diagnóstico y tratamiento, especialmente en los tumores más agresivos como el glioblastoma multiforme (GBM), que tiene una supervivencia promedio de alrededor de 15 meses después del diagnóstico.

El presente trabajo se centró en la evaluación de una lista de genes relacionados con la supervivencia del paciente, obtenida en diferentes bases de datos públicas, como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del GBM. Para ello, se realizó un análisis transcriptómico con 142 muestras de pacientes que padecían algún tipo de tumor del sistema nervioso central. Como resultado, se identificaron 13 potenciales biomarcadores moleculares y/o dianas terapéuticas para el GBM.

Posteriormente, se evaluaron tres potenciales dianas terapéuticas: PTX3, GPR126 y CDK5, en líneas celulares de GBM (HGUE-GB-16, HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48). Para ello, se analizó el silenciamiento de estos genes, tanto de forma individual como en combinación con carmustina (BCNU), utilizando ARNs pequeños de interferencia (siRNA, del inglés "small interfering RNA"). Además, se evaluó el efecto de los inhibidores químicos CP-681301 y H89, individualmente y en combinación con BCNU, con el fin de observar si mimetizaban el efecto del silenciamiento de CDK5 y GPR126, respectivamente. Finalmente, se realizaron ensayos de RTq-PCR para determinar si existe regulación cruzada entre estos genes y otros relacionados con la respuesta a la hipoxia, angiogénesis y resistencia a la quimio y radioterapia.

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales mostraron que PTX3, GPR126 y CDK5 están implicados en varios procesos tumorales como la proliferación celular, el desarrollo de resistencia a radioterapia, la angiogénesis y la respuesta a la hipoxia. La combinación del silenciamiento de GPR126 con BCNU ocasionó una ligera protección frente a este fármaco, mientras que el silenciamiento de CDK5 en combinación con este agente alquilante mostró una potenciación de su efecto sobre la línea HGUE-GB-16 (resistente a la BCNU). Por otro lado, el efecto observado en ambos inhibidores sobre la expresión de los genes estudiados no es comparable al del silenciamiento, demostrando efectos inespecíficos por parte de los mismos.

En conclusión, PTX3, GPR126 y CDK5 pueden constituirse como potenciales biomarcadores moleculares y dianas terapéuticas para el GBM.

Palabras clave: glioblastoma; biomarcadores; dianas terapéuticas; quimiorresistencia; carmustina.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. An incidence of around 20 million cases was estimated for the year 2022 and an increase of 76% is predicted for the year 2050. Therefore, the need to find new therapeutic targets arises to improve its diagnosis and treatment, especially in the most aggressive tumors such as glioblastoma multiforme (GBM), which has a median survival of about 15 months after diagnosis.

This work was focused on the evaluation of a list of genes related to patient survival, obtained from different public databases, as potential therapeutic targets for the treatment of GBM. For this purpose, a transcriptomic analysis was performed with 142 samples from patients suffering from some type of central nervous system tumor. As a result, 13 potential molecular biomarkers and/or therapeutic targets for GBM were identified.

Subsequently, three potential therapeutic targets, PTX3, GPR126 and CDK5, were evaluated in GBM cell lines (HGUE-GB-16, HGUE-GB-18 and HGUE-GB-48). To this end, the silencing of these genes, both individually and in combination with carmustine (BCNU), was analyzed using small interfering RNAs (siRNA). In addition, the effect of the chemical inhibitors CP-681301 and H89, individually and in combination with BCNU, was evaluated to see whether they mimicked the effect of CDK5 and GPR126 silencing, respectively. Finally, RTq-PCR assays were performed to determine whether there is cross-regulation between these genes and others involved in the response to hypoxia, angiogenesis and resistance to chemo- and radiotherapy.

Results obtained in experimental trials showed that PTX3, GPR126 and CDK5 are involved in several tumor processes such as cell proliferation, development of radiotherapy resistance, angiogenesis and response to hypoxia. The combination of GPR126 silencing with BCNU resulted in a slight protection of this drug, while CDK5 silencing in combination with this DNA alkylating agent revealed a potentiation of its effect on the HGUE-GB-16 cell line (resistant to BCNU). On the other hand, the effect observed for both inhibitors on the expression of the genes studied is not comparable to that of silencing, displaying nonspecific effects.

In conclusion, PTX3, GPR126 and CDK5 may constitute potential molecular biomarkers and therapeutic targets for GBM.

Keywords: glioblastoma; biomarkers; therapeutic targets; chemoresistance; carmustine.

Índice.

1.	Introducción.....	7
2.	Antecedentes.....	11
3.	Objetivos.....	15
4.	Procedimiento experimental.....	16
	4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.	16
	4.2. Tratamientos utilizados.	16
	4.3. Proliferación celular.	16
	4.4. Transfección con RNA de interferencia.	17
	4.5. Análisis de expresión génica.	19
	4.5.1. Extracción de RNA.....	20
	4.5.2. Transcripción reversa (RT-PCR).....	21
	4.5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).	22
	4.6. Análisis del ciclo celular.	23
	4.7. Ensayo de migración.	25
	4.8. Análisis transcriptómico.....	25
	4.9. Análisis estadístico.....	26
5.	Resultados	26
	Objetivo 1: Analizar la correlación de la lista de genes obtenida con UALCAN con la supervivencia de los pacientes.	26
	Objetivo 2: Determinar la posible relación entre los genes PTX3, GPR126 y CDK5 y la supervivencia o la resistencia a fármacos.....	30
	5.2.1. Selección de los modelos celulares.	30
	5.2.2. Análisis del papel de PTX3 sobre la proliferación y resistencia a fármacos.	31
	5.2.3. Análisis del papel de CDK5 sobre la capacidad de proliferación, migración de las células y la resistencia a fármacos.	33
	5.2.4. Análisis del papel de GPR126 sobre la capacidad de proliferación y la resistencia a fármacos.....	37

Objetivo 3: Determinar si existe regulación cruzada entre los genes seleccionados o con otros genes.....	42
6. Discusión.....	45
7. Conclusiones.....	50
8. Bibliografía.....	51

1. Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que puede aparecer en cualquier órgano del cuerpo y está causado por cambios en los genes que controlan las funciones de las células, en concreto, su división y crecimiento. Estos cambios genéticos, o mutaciones, pueden estar causados por factores ambientales o factores hereditarios. Como consecuencia, las células cancerosas se multiplican descontroladamente y adquieren la habilidad de migrar o invadir tejidos cercanos, así como de expandirse a otros tejidos a través del sistema vascular, lo que se conoce como metástasis (1-3).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Desde hace unas décadas, la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado exponencialmente debido, probablemente, a cambios en el estilo de vida y al incremento de la esperanza de vida en la población mundial (3).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on cancer*) y los informes del Observatorio Global del Cáncer (GCO del inglés, *Global Cancer Observatory*) estimaron una incidencia de alrededor de 20 millones de casos y 9,7 millones de muertes durante el año 2022. Además, se estima un aumento del 76% de nuevos casos alcanzando una cifra de 35,3 millones para el año 2050 (4, 5). Los tumores del sistema nervioso central (SNC) fueron la doceava causa de muerte por cáncer en el año 2022, suponiendo un 2,6% de los distintos tipos de tumores registrados (4).

Los gliomas son tumores del SNC que derivan de las células gliales, que son el soporte no neuronal del cerebro. Son los tumores primarios más comunes del SNC, representando un 60% de todos los casos. Existen diferentes tipos de células gliales, a partir de las cuales podemos diferenciar entre astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y gliomas de tronco encefálico.

Durante muchos años, la clasificación clásica de los gliomas se ha basado en características histopatológicas y grados de malignidad (6, 7). Los avances en genética molecular alcanzados durante esta última década han demostrado la relevancia de las alteraciones moleculares en la patogénesis de los distintos tipos de tumores. Por ello, en el año 2021, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una clasificación actualizada de los gliomas (OMS CNS5), que incorpora nuevos marcadores biomoleculares relevantes para la clínica. Dentro de esta clasificación, el glioblastoma multiforme (GBM) se sitúa en el grupo de gliomas difusos de grado IV, con IDH de tipo silvestre. Entre los marcadores moleculares comunes del GBM, se encuentran las amplificaciones o mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*),

la metilación del promotor MGMT (O^6 -methylguanine-DNA methyltransferasa), así como ganancias en el cromosoma 7 y pérdidas en el 10 (8, 9).

El GBM es el tumor primario más común y agresivo del SNC en la población adulta, siendo uno de los tumores con peor pronóstico y con una supervivencia de alrededor de 15 meses después del diagnóstico. Representa el 57% de todos los gliomas y el 48% de los tumores primarios del SNC, con una incidencia global de 10 personas por cada 100.000. La edad media de diagnóstico es de 64 años y es 1,6 veces más común en hombres que en mujeres (6, 10).

La terapia estándar para este tipo de tumores se basa en la resección del tumor, seguida de radioterapia y quimioterapia con agentes alquilantes. La radioterapia emplea radiación ionizante para generar radicales hidroxilo, los cuales dañan las purinas y pirimidinas del ADN, así como los azúcares y las uniones fosfodiéster. A pesar de su efectividad limitada en el tratamiento del GBM, la radioterapia puede potenciarse cuando se combina con quimioterapia, lo que mejora su eficacia y reduce el riesgo de daño en tejidos sanos (10).

La quimioterapia citotóxica es la más utilizada para este tipo de tumores. Uno de los fármacos más usados es la temozolomida (TMZ), un agente alquilante que daña directamente el ADN mediante metilaciones de las bases nitrogenadas, resultando en una disminución de la reparación del ADN y, como consecuencia, induciendo procesos de apoptosis, autofagia y senescencia celular. Este daño, como producto de la alquilación del ADN, puede ser revertido mediante la acción de la enzima MGMT eliminando las metilaciones O^6 -metilguanosina. La metilación del promotor de MGMT y sus niveles de expresión presentan una gran relevancia clínica, ya que se ha asociado con la eficacia de los fármacos alquilantes en los modelos celulares de GBM (11). Por el contrario, la desmetilación de este promotor está vinculada al desarrollo de resistencia frente a este tipo de fármacos. Actualmente, el estado de metilación del promotor se utiliza como un marcador para el pronóstico y la respuesta a estos tratamientos en GBM. Por otro lado, se ha visto que el tratamiento con TMZ durante la exposición a radiación aumenta la sensibilidad a la radioterapia, incrementando las roturas de doble hebra del ADN inducidas por esta terapia (10-12).

La carmustina (BCNU, [1,3-bis (2-chloroetil)-1-nitrosourea]), un derivado de la nitrosourea, es otro agente alquilante que bloquea la replicación y reparación del ADN. Es usada tras la resección del tumor y suele administrarse por vía intravenosa o por implantación en la cavidad de la resección de parches biodegradables que contienen el fármaco, como alternativa a la administración sistémica para mejorar su eficacia y disminuir su toxicidad (11, 13).

Sin embargo, la probabilidad de recurrencia es elevada debido a la baja eficacia de estos tratamientos. La mayoría de las veces, estas terapias convencionales no son suficientes para el tratamiento de este tipo de tumor. Esto se atribuye a múltiples factores, como la tendencia de las células tumorales a migrar hacia los tejidos sanos cercanos, impidiendo la completa resección del tumor; la presencia o aparición de fenotipos resistentes a la radioterapia y quimioterapia; una amplia heterogeneidad molecular; el privilegio inmune del cerebro; y la presencia de la barrera hematoencefálica, que se caracteriza por estar formada por una monocapa de células endoteliales que impiden el paso de sustancias extrañas hacia las células del sistema nervioso central, dificultando el transporte de los fármacos hacia las células tumorales (10, 14, 15).

Todo ello lleva a la necesidad de encontrar tratamientos más eficaces, identificando genes implicados en el desarrollo y progresión del GBM, que puedan adquirir el papel de dianas terapéuticas y que permitan el desarrollo de terapias más precisas y dirigidas (16). Actualmente, los avances en la investigación de la patogénesis molecular del GBM se han trasladado rápidamente a ensayos clínicos con diversos tratamientos basados en la caracterización genómica, epigenética, transcriptómica y proteómica del GBM, así como las interacciones del microambiente tumoral y el sistema inmune (14).

El SNC es inmunoprivilegiado, con un acceso limitado para las células del sistema inmune, en concreto, los linfocitos T. Sin embargo, el GBM genera un ambiente proangiogénico e inflamatorio que lleva al aumento en la expresión de genes que codifican moléculas de adhesión en las células endoteliales. Debido a esto, disminuye el número de uniones entre estas células y aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Estos cambios facilitan que algunas células del sistema inmune, como leucocitos, natural killer (NK) y monocitos, extravasen el endotelio del cerebro e infiltren en la masa tumoral. Los monocitos, una vez en el tumor, se convierten en macrófagos asociados al tumor (TAMs, del inglés "*Tumor Associated Macrophages*") y se ha observado que junto con los leucocitos y NKs, presentan un papel crítico para la progresión del GBM (17).

Por ello, la inmunoterapia para el tratamiento del GBM podría ser otra alternativa a las terapias convencionales. Por ejemplo, el bloqueo de algunos puntos de control del sistema inmune mediante inhibidores podría disminuir la inmunosupresión intrínseca al tumor para que las células del sistema inmune que consiguen infiltrar el tumor, como los linfocitos T, reconozcan sus dianas y, de esta forma, participen en la eliminación del tumor. Por otro lado, la terapia con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T, del inglés "*chimeric antigen receptor- Tcell*") representa otro enfoque novedoso para dirigirse a antígenos específicos de GBM con el objetivo de producir una respuesta inmune antitumoral continua y, como consecuencia, inducir la muerte de las células tumorales (18, 19).

Por otro lado, los virus genéticamente modificados han sido estudiados como otro potencial tratamiento para los gliomas desde el año 1991. Estos virus son de gran interés debido a que pueden dirigirse específicamente hacia las células tumorales y producir una oncolisis directa mediante su replicación intratumoral. Además, su uso como vector puede ser útil para el transporte de transgenes que afectan a las células tumorales, iniciando la citotoxicidad y desencadenando una respuesta inmune contra las células tumorales. Sin embargo, aún no se ha demostrado que este tipo de tratamientos sean significativamente útiles por sí mismos o combinados con otras terapias (19).

Como alternativa a la radioterapia basada en iones para aquellos pacientes que tengan resistencia, se ha estudiado el posible uso de radioterapia basada en carbono. Esta terapia produce roturas de doble cadena en el ADN y se ha observado que, al usar partículas pesadas de carbono, tiene la capacidad de administrar una dosis más alta al paciente y limitar la dosis a los tejidos normales circundantes. Sin embargo, este tipo de terapias aún siguen en las fases I y II de algunos ensayos clínicos.

Otra forma de abarcar el tratamiento para el GBM es encontrar dianas terapéuticas o inhibidores para los factores de transducción de vías de señalización que están desreguladas en las células de GBM y que se encuentran directamente relacionados con la proliferación tumoral, migración e invasión, así como la angiogénesis. Algunos de estos factores, que se encuentran actualmente en fases clínicas, son el receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR, del inglés “Epidermal Growth Factor Receptor”), BRAF que es un miembro de la familia de las quinasas, las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs, del inglés “*cyclin dependent kinases*”) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés “*Vascular Endothelial Growth Factor*”), entre otros (11, 14, 19).

El uso de ARN pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*) para estas dianas terapéuticas podría ser una aproximación efectiva para el tratamiento del GBM. El siRNA es una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que modula la expresión del ARNm mediante la escisión de genes post-transcripcional. Es una herramienta muy conocida en el campo de la investigación biomédica y ha ganado atención en ella desde su descubrimiento debido a su potencial aplicación como terapia para el cáncer, ya que podría ser muy útil para suprimir las vías moleculares promotoras de tumores. Por ello, el uso de siRNAs en diversos tipos de gliomas podría potenciar la sensibilidad a la radioterapia y quimioterapia en las células resistentes, así como silenciar diversos genes, inhibiendo la proliferación celular, entre otros procesos tumorales (16, 20-22).

A pesar de que existen múltiples ensayos clínicos, la FDA (del inglés “*Food and Drugs Administrations*”) todavía no ha aprobado ninguna de estas terapias debido a la amplia heterogeneidad molecular del

GBM, que es la principal causa del desarrollo de resistencias frente a las terapias. Todo ello supone un desafío clínico para el desarrollo de este tipo de tratamientos en estos tumores (14).

En consecuencia, la búsqueda de un posible perfil génico para identificar marcadores moleculares y dirigir las terapias hacia éstos supondría un gran avance para el tratamiento del GBM.

2. Antecedentes

En el laboratorio del Dr. Miguel Saceda Sánchez se realizó un estudio *in silico* mediante la base de datos UALCAN (del inglés, “*The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal*”) (23). Ésta base de datos es un recurso importante para este trabajo, ya que integra datos ómicos sobre cáncer que se encuentran disponibles públicamente en otras bases de datos como el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, del inglés *The Cancer Genome Atlas Program*) y el Consorcio de Análisis Proteómico Clínico de Tumores (CPTAC, del inglés *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium*). Este recurso web tiene múltiples aplicaciones entre las que se encuentra la identificación *in silico* de genes de interés como potenciales biomarcadores, mediante gráficos y diagramas que representan su perfil de expresión y la supervivencia de los pacientes.

Como resultado, se obtuvo una lista de 29 genes (**Tabla 1**) cuya expresión afectaba a la supervivencia de los pacientes de GBM

PTX3	CMKLR2 (GPR1)	COL5A1	F2RL2	GPR137
GPR141	ADAMTS1	MMP19	ADGRD1 (GPR133)	ADGRG3 (GPR97)
GPR89B (GPR89C)	CDK5	GPR146	TRIM3	GRPASP1
GPR6	GPR15	ADGRF1 (GPR110)	PRMT5	NKX3-1
GPRC5D	GRP143	GRP162	GPRC5A	GPR171
GPR87	ADGRG6 (GPR126)	SOCS3	GPR153	

Tabla 1. Genes seleccionados para su estudio en este trabajo mediante su análisis en la base de datos UALCAN.

En esta lista se incluyeron algunos genes estudiados previamente en el laboratorio, debido a su papel en la progresión del tumor y/o el desarrollo de resistencia a fármacos, además de cumplir con los requisitos de supervivencia mencionados anteriormente según los datos aportados por UALCAN. Entre ellos se encuentran SOCS3, cuya expresión está relacionada con el desarrollo de resistencia a la radioterapia (12); PRMT5, que participa en la metilación de histonas para impedir la expresión de algunos genes y cuya sobreexpresión podría estar implicada en procesos de proliferación, senescencia e invasión celular (24); y MMP19, que también se sobreexpresa en GBM en comparación con células

sanas y se ha observado que podría tener un papel proinflamatorio y participar en procesos de migración e invasión celular (25).

Además, como se puede observar en la **Tabla 1**, la mayoría de los genes que constituyen esta lista pertenecen a la familia de los GPCR (del inglés “*G protein coupled receptors*”). Éstos codifican proteínas G acopladas a receptores que regulan múltiples vías de señalización intracelulares, produciendo una gran variedad de respuestas fisiológicas. Las diferentes subunidades de las proteínas G pueden modular los niveles de AMP cíclico (AMPC), el cual estimula a la proteína-quinasa A (PKA), que fosforila sustratos como CREB, Raf, Bad y GSK3, regulando procesos como la migración, supervivencia y expresión génica (**Figura 1**). Varios estudios han reportado un aumento o disminución de la expresión de estos genes en diferentes tipos de cáncer. En consecuencia, la desregulación de las vías de señalización en las que se encuentran implicados podría dar lugar al desarrollo de diversos procesos tumorales como la angiogénesis, la proliferación celular y la metástasis (1, 26, 27).

Se ha demostrado la sobreexpresión de los GPCRs en muestras de GBM en comparación con otros gliomas menos agresivos y muestras de tejido sano. Esto sugiere la posible utilidad de estos genes como marcadores moleculares para la prognosis de la supervivencia del paciente o como dianas terapéuticas. Por lo tanto, su uso en combinación con estas terapias y otros fármacos dirigidos podría mejorar la eficacia de los tratamientos actuales (28, 29).

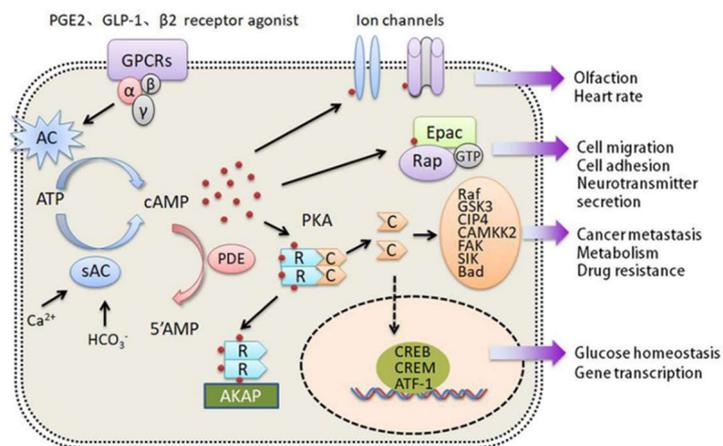


Figura 1. Vía de señalización del AMPc iniciada por receptores GPCRs. Representación de algunas de las vías de señalización y los procesos que regulan en la célula. Figura obtenida de (1).

ADGR-G6 o GPR126 es uno de los 29 genes de la lista que se ha estudiado experimentalmente en este trabajo. A pesar de que existe poca literatura sobre su papel en el GBM, se ha demostrado que participa en la iniciación de la mielinización de las células de Schwann. Además, se ha reportado que la deficiencia en la expresión de este gen lleva a procesos de diferenciación celular, migración y brotes

angiogénicos tridimensionales (30, 31). Esto se correlaciona con los datos de supervivencia de UALCAN, que muestran que los pacientes con baja expresión de este gen presentan un peor pronóstico. Por el contrario, no existen diferencias significativas al comparar los datos de expresión entre pacientes sanos y con GBM (**Figura 2**).

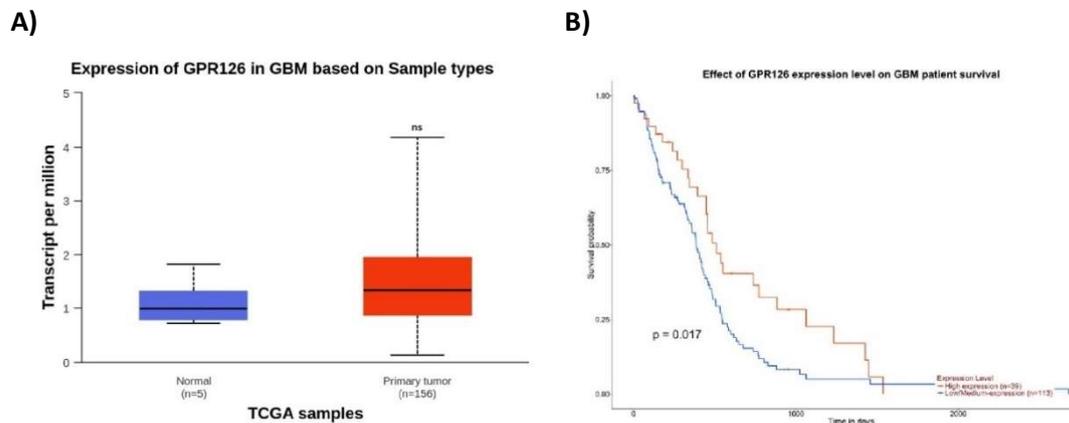


Figura 2. Datos de la expresión y supervivencia de GPR126 obtenidos a partir de la base de datos UALCAN.

A) Expresión de GPR126 en tejido normal (azul) vs tumor primario (rojo) en muestras de la base de datos TGCA. ns indica “no significativo”. **B)** Se representa la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo en días registrado en pacientes con niveles de expresión bajos/medios (azul) vs niveles de expresión elevados (rojo).

El crecimiento del tumor es el resultado de una desregulación en el balance entre la proliferación y la muerte celular. Las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs, del inglés *ciclyn dependent kinases*) son las principales proteínas reguladoras de la proliferación celular. Actúan coordinando la progresión hacia las diferentes fases del ciclo celular; cada subtipo de CDK es activado por otra ciclina y son desactivados mediante inhibidores de CDK. La progresión del ciclo celular depende del equilibrio entre estas interacciones y, a su vez, su transcripción depende de la actividad de las proteínas aguas arriba de la vía de señalización, entre las que se incluyen las GPCRs (32).

El CDK5 se encuentra mayoritariamente activo en las células post mitóticas y, a diferencia de otras quinasas, juega un papel fundamental en funciones neuronales como la transmisión sináptica, morfogénesis, migración y supervivencia neuronal. En varios estudios, se ha descrito hiperactividad de CDK5 en múltiples enfermedades neurodegenerativas y cada vez más estudios describen una regulación positiva o hiperactivación en muchos tipos de cáncer, incluido el GBM (33). Esta hiperactivación posiblemente se deba a la localización de CDK5 en el cromosoma 7, que es uno de los sitios con mayor frecuencia de alteraciones en el número de copias en GBM.

Se ha reportado la activación de CDK5 en células cancerosas sometidas a terapias convencionales que dañan el ADN, incluidas las radiaciones ionizantes. En ese escenario, CDK5 activa los puntos de control

del ciclo celular. Además, su fosforilación está mediada por transductores de señales implicados en las vías de señalización mediadas por las GPCRs. Esta fosforilación resulta en la activación de AKT, mediando la migración inducida por factores de crecimiento y la invasión de las células de glioblastoma. Más recientemente, además de considerarse una diana farmacológica para el tratamiento del GBM, el CDK5 se ha identificado como un valioso marcador predictivo de la tumorigénesis y progresión del GBM (33-36).

Según los datos proporcionados por UALCAN, la expresión de CDK5 no muestra diferencias significativas en comparación con las muestras sanas, pero se observa una tendencia hacia una disminución en su expresión (**Figura 3A**). Sin embargo, la supervivencia de los pacientes que presentan una baja/media expresión de CDK5 aumenta significativamente en comparación con aquellos en los que este gen se encuentra sobreexpresado (**Figura 3B**).

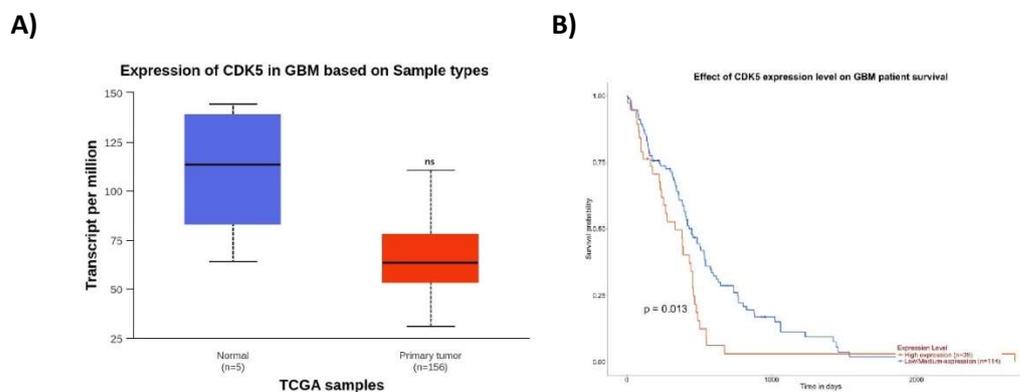


Figura 3. Datos de la expresión y supervivencia de CDK5 obtenidos a partir de la base de datos UALCAN. A) Expresión de CDK5 en tejido normal (azul) vs tumor primario (rojo) en muestras de la base de datos TGCA. * indica un p-valor < 0,05. **B)** Se representa la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo en días registrado en pacientes con niveles de expresión bajos/medios (azul) vs niveles de expresión elevados (rojo).

Por último, la pentraxina 3 (PTX3 del inglés, *pentraxine 3*) pertenece a una superfamilia de pentraxinas que se encuentran implicadas en las interacciones con la matriz extracelular. En concreto, PTX3 es un gen que se encuentra muy relacionado con el microambiente, ya que codifica para un factor soluble inflamatorio, la pentraxina 3, el cual interacciona con múltiples ligandos jugando un papel crítico en la inmunidad innata, procesos inflamatorios y la dinámica de la matriz extracelular. En los gliomas es secretado por los macrófagos asociados al tumor (TAM del inglés, *tumour-associated macrophages*). El papel de PTX3 en el GBM aún no se ha definido, pero forma parte de uno de los posibles biomarcadores y dianas terapéuticas que están emergiendo. A pesar de los limitados estudios, se ha observado que la expresión de este gen podría influir en el crecimiento del tumor y su invasión hacia tejidos sanos (37-39).

Este gen se encuentra significativamente sobreexpresado en muestras de GBM en comparación con muestras sanas (**Figura 4A**) y, al igual que en el caso anterior, en los pacientes que presentan baja/media expresión la probabilidad de supervivencia aumenta significativamente (**Figura 4B**).

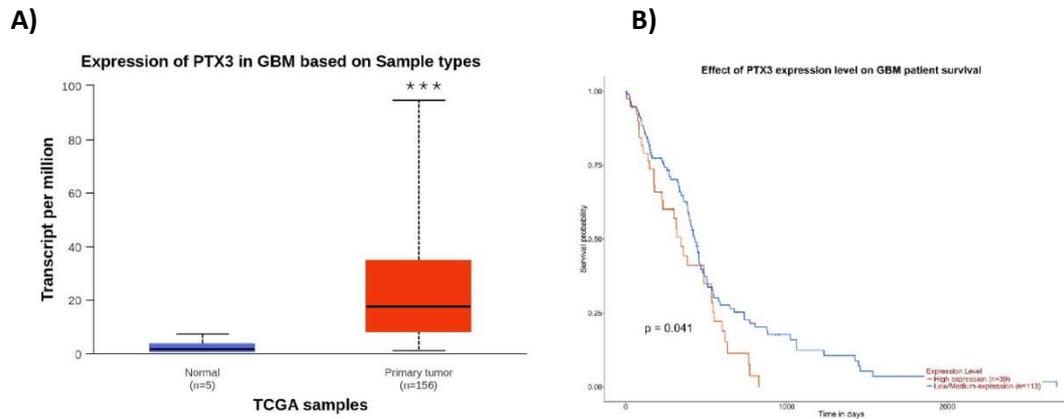


Figura 4. Datos de la expresión y supervivencia de PTX3 obtenidos a partir de la base de datos UALCAN. A) Expresión de PTX3 en tejido normal (azul) vs tumor primario (rojo) en muestras de la base de datos TGCA. *** indica un p-valor < 0,001. **B)** Se representa la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo en días registrado en pacientes con niveles de expresión bajos/medios (azul) vs niveles de expresión elevados (rojo).

En este trabajo, se pretende validar los resultados obtenidos *in silico* mediante un análisis transcriptómico con muestras de pacientes con GBM del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA). Además, debido a la complejidad que supone el estudio experimental de la lista completa de genes, este trabajo se ha centrado en tres de estas posibles dianas terapéuticas con el fin de estudiar los mecanismos en los que se encuentran implicadas: CDK5, GPR126 o ADGR-G6 y PTX3.

3. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo principal validar una lista de 29 genes como posible predictor de la supervivencia de los pacientes de glioblastoma multiforme. Para realizar este objetivo general, se han establecido varios objetivos específicos:

1. Analizar la correlación de la lista de genes obtenida con UALCAN con la supervivencia de los pacientes.
2. Determinar la posible relación entre los genes PTX3, GPR126 y CDK5 y la supervivencia o la resistencia a fármacos.
 - 2.1. Analizar el papel de PTX3 sobre la proliferación y resistencia a fármacos.
 - 2.2. Analizar el papel de CDK5 sobre la capacidad de proliferación, migración de las células y la resistencia a fármacos.

- 2.3. Analizar el papel de GPR126 sobre la capacidad de proliferación y la resistencia a fármacos.
3. Determinar si existe regulación cruzada entre los genes seleccionados o con otros genes.

4. Procedimiento experimental

4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Se han utilizado las líneas celulares de glioblastoma multiforme (HGUE-GB-16, HGUE-GB-18, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40, HGUE-GB-42, HGUE-GB-48) previamente generadas por el grupo de investigación de Oncología Molecular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE). Todas las líneas han sido obtenidas en el Hospital Universitario de Elche (HGUE) mediante cultivos primarios generados a partir del aspirado cerebral obtenido tras la resección del tumor de pacientes con glioblastoma multiforme.

Para su mantenimiento se han utilizado incubadores con una temperatura de 37°C, un 5% de CO₂ y ambiente húmedo, en frascos T25 (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con medio de cultivo DMEM-F12 (del inglés, “*Dulbecco's Modified Eagle Medium F12*”; Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v) y con una mezcla de dos antibióticos, penicilina y estreptomycin, al 1% (v/v) (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos).

4.2. Tratamientos utilizados.

En este trabajo se han realizado diversos tratamientos con el fin de testar su efecto sobre las líneas celulares de GBM. En la **Tabla 2** se muestran los detalles sobre los fármacos utilizados.

Fármaco	Concentración	Función	Casa comercial
Carmustina	10-25µM	Agente alquilante	Sigma Aldrich®
H89	10µM	Inhibidor de protein kinasa A	Sigma Aldrich®
CP-681301	5-10µM	Inhibidor de CDK5	Sigma Aldrich®

Tabla 2. Fármacos empleados con sus respectivas concentraciones, su función y casa comercial de la que se han obtenido.

4.3. Proliferación celular.

Se realizó un ensayo colorimétrico basado en la actividad metabólica de las células. Las células metabólicamente activas contienen una enzima mitocondrial, la succinato deshidrogenasa, que reduce una sal de tetrazolio amarilla, 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a cristales de

formazán insolubles que son de color morado. La formación de estos cristales es directamente proporcional a la cantidad de células viables, permitiendo la cuantificación de la actividad metabólica mediante su absorbancia.

El MTT es una de las técnicas más utilizadas para el testado de fármacos sobre cultivos celulares (40, 41). Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron las células en placas de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) a una densidad de 3.000-4.000 células por pocillo y se incubaron con una temperatura de 37°C y un 5% de CO₂, en ambiente húmedo. Pasadas 24 horas, se trataron las células con diferentes concentraciones de fármaco por sextuplicado y se volvió a realizar una incubación de 72 horas en las mismas condiciones. Tras este tiempo, se añadió el reactivo MTT (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a una concentración de 0,25 mg/mL y se volvió a incubar durante 3 horas. Posteriormente, para solubilizar los cristales de formazán, se retiró el contenido de la placa y se echaron 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) en cada pocillo (**Figura 5**). Las placas se mantuvieron durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y, finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm en el lector de placas Gen5™ (BioTeK®, Winooski, VT, Estados Unidos).

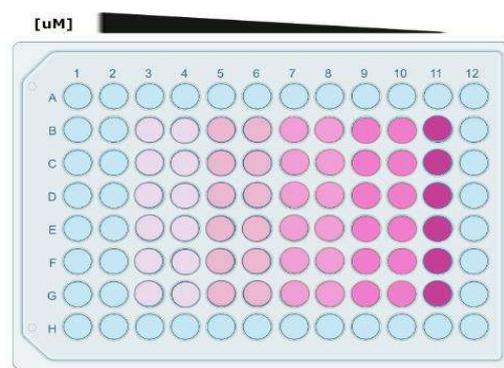


Figura 5. Representación del efecto del fármaco sobre las líneas celulares tras realizar el protocolo de MTT.

Se muestra el gradiente de color obtenido en función del efecto de cada concentración del fármaco (de mayor a menor concentración) sobre la proliferación celular. Cuando el fármaco tiene efecto sobre la proliferación celular, se observa como la densidad celular disminuye a medida que aumenta la concentración del fármaco. Figura creada con BioRender.com.

4.4. Transfección con RNA de interferencia.

La transfección de siRNA mediante vectores lipídicos es una técnica habitualmente empleada para estudiar la función génica *in vitro*. En este trabajo se utilizó lipofectamina como vector lipídico para llevar a cabo la transfección. Las propiedades catiónicas de este lípido facilitan la encapsulación del

siRNA en su interior, aprovechando su carga negativa, y facilitan el transporte intracelular protegiendo al siRNA de la degradación por endonucleasas celulares.

Una vez en el citoplasma, el siRNA se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés “*RNA-induced silencing complex*”) que degrada una de las hebras. La otra cadena es complementaria al ARN mensajero (ARNm) codificado por el gen objeto de estudio y actúa como guía para dirigir el complejo RISC hacia el ARNm. Como resultado, RISC actúa sobre el ARNm degradándolo y, por tanto, impidiendo la expresión del gen (**Figura 6**) (42).

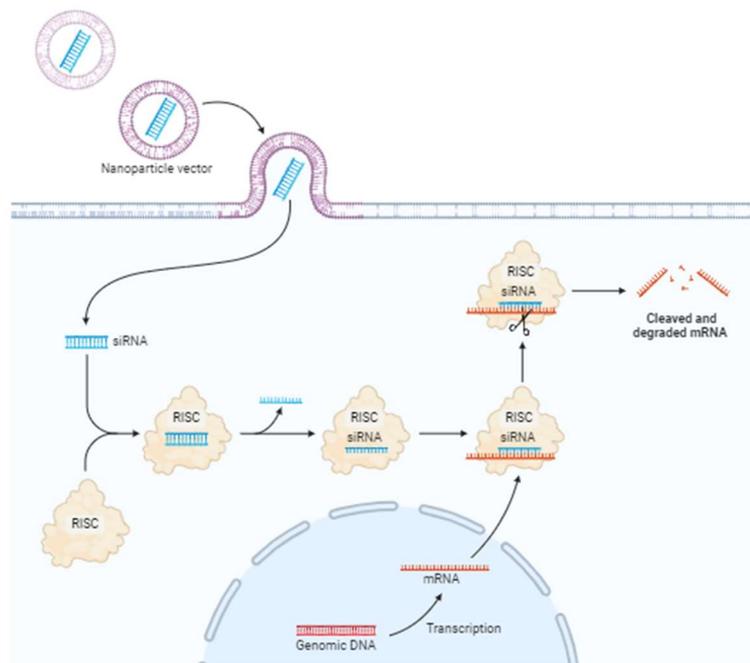


Figura 6. Representación gráfica del mecanismo de acción del siRNA para el silenciamiento de genes.

Figura obtenida de BioRender.com.

La transfección se llevó a cabo en ausencia de antibióticos ya que la permeabilización de la membrana celular mediante la acción de la lipofectamina permite la entrada de los antibióticos al interior celular, resultando en un efecto citotóxico.

Inicialmente se sembraron las líneas celulares en placas de 6 pocillos (Sarsted, Nümbrecht, Alemania) a una densidad de 110.000-125.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas con una temperatura de 37°C, un 5% de CO₂ y en ambiente húmedo. Para cada gen silenciado se realizó un control negativo con una transfección mediante un siRNA no específico.

Para realizar la transfección se prepararon dos disoluciones en medio de suero reducido OPTI-MEM® (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), una de ellas con 50 pmol/mL de siRNA o de un siRNA no específico como control (Ambion® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

Estados Unidos) y otra con 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de lipofectamina (Lipofectamine[®] RNAiMAX (Invitrogen[™], Waltham, MA, Estados Unidos). Ambas disoluciones se resuspendieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Para formar el complejo lipofectamina-siRNA se mezclaron las disoluciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadieron 375 μL de la mezcla a cada pocillo, alcanzando una concentración final de 5 pmol/mL de siRNA y de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de lipofectamina por pocillo. Tras ello, la interacción del siRNA con el ARN mensajero se da durante 48 horas de incubación a 37°C, con un 5% de CO₂ y en ambiente húmedo. Finalmente, se realizó el tratamiento correspondiente y se volvió a incubar durante 24 horas en las mismas condiciones (**Figura 7**).

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento se analizó la expresión génica, para corroborar el silenciamiento del gen, y la distribución de las células en las fases del ciclo celular por citometría de flujo, con el fin de determinar si el efecto del tratamiento se modifica tras el silenciamiento del gen.

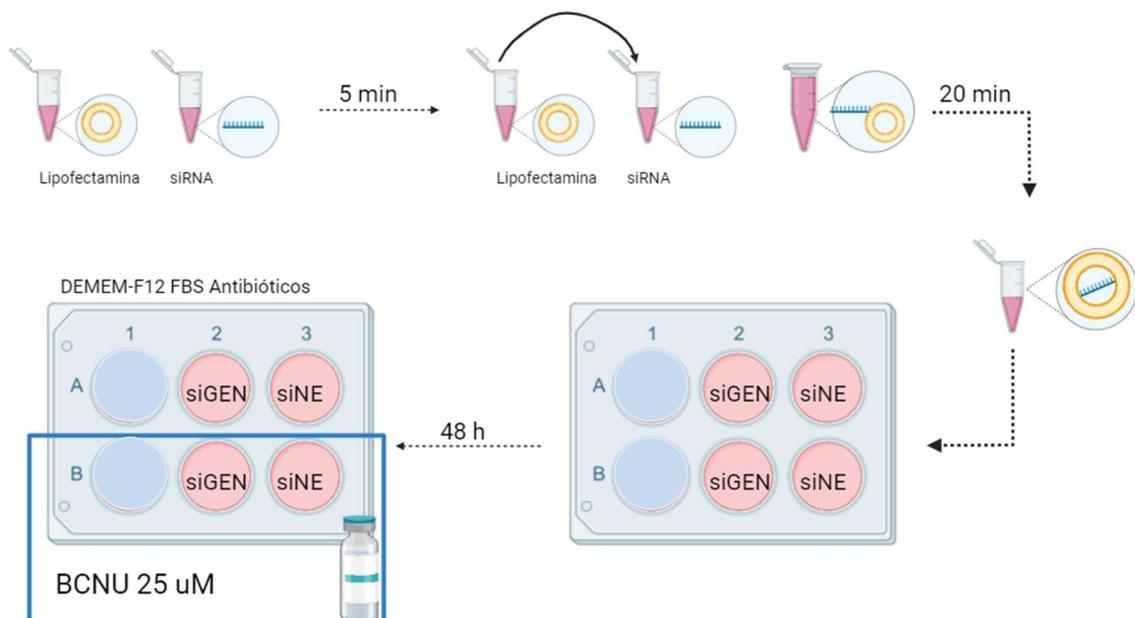


Figura 7. Esquema representativo de la metodología empleada para realizar la transfección con siRNA.

Figura creada con BioRender.com

4.5. Análisis de expresión génica.

Este análisis se ha realizado con el fin de: determinar la expresión génica basal para seleccionar las líneas celulares que se utilizarían en el silenciamiento, cuantificar la variación de la expresión de los genes tras tratamientos realizados con fármacos convencionales y comprobar la efectividad del siRNA tras su transfección. Adicionalmente, se hicieron análisis de expresión génica para estudiar la posible

correlación entre el conjunto de genes estudiado en este trabajo, así como otros genes relacionados con procesos tumorales, como invasividad y angiogénesis, entre otros.

Generalmente, para llevar a cabo este análisis, primero se realiza un lisado celular, seguido de la extracción del ARN, que permite realizar una transcripción reversa y obtener su ADN complementario (ADNc). Finalmente, se realiza una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), que permite cuantificar la expresión de cada gen.

4.5.1. Extracción de RNA.

Para el primer paso de este ensayo, se ha utilizado el kit de aislamiento NZY (Nzy Total RNA Isolation kit, NZYtech, Lisboa, Portugal).

Previamente a la extracción de RNA se lisaron las células con una mezcla de tampón NR del kit de aislamiento y β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a una dilución 1:100. Con este paso se consiguió permeabilizar la membrana plasmática, romper los orgánulos celulares e inactivar las RNAsas. Tras ello, se trasvasó el líquido de lisis por una columna de homogeneización y, para que el líquido pasara por la columna, se centrifugó a 11.000 xg durante un minuto.

Posteriormente, se añadieron 350 μ L de etanol al 70% al sobrenadante y se homogeneizó la mezcla para, seguidamente, transferirlo a una columna de unión. La adición de etanol seguido de una centrifugación a 11.000 xg durante 30 segundos, permite que los ácidos nucleicos se unan a la membrana de la columna de unión, mientras que los otros componentes celulares se eluyen en el sobrenadante.

Tras realizar un lavado con 350 μ L de tampón de lavado NI seguido de su correspondiente centrifugación (11.000 xg durante 30 segundos), se añadieron 95 μ L de una mezcla que contiene tampón de digestión y DNAsa en una dilución 1:10, seguido de una incubación de 15 minutos durante la cual se produce la degradación del ADN que se encuentra embebido en la membrana de la columna.

A continuación, se realizaron varios lavados para eluir el ADN degradado de la columna: 200 μ L de tampón de lavado NWR1 seguido de dos lavados con 600 μ L y 200 μ L, respectivamente, de tampón de lavado NWR2 con sus correspondientes centrifugaciones (11.000 xg durante un minuto). Adicionalmente, se realizó una centrifugación en seco en las mismas condiciones para evaporar el etanol que contienen los tampones de lavado.

Para eluir el ARN de la columna en tubos de elución, se añadieron 40 μ L de agua libre de RNAsas del kit sobre la membrana de la columna y una centrifugación a 11.000 xg durante un minuto.

Finalmente, se midió la absorbancia mediante el espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) con el fin de determinar la concentración y pureza del ARN extraído. Se consideró una pureza óptima cuando los cocientes 260/280 y 260/230 alcanzaban valores cercanos a 2,1.

4.5.2. Transcripción reversa (RT-PCR).

La transcripción reversa se utiliza para la obtención del ADNc a partir del ARN mensajero (ARNm) (43).

Para la reacción, por cada 1 µg del ARN extraído, se añadió una mezcla que contenía: 2 µL de tampón de retrotranscripción, 2 µL de random primers, 0,8 µL de una mezcla de dNTP, 1 µL de inhibidor de RNasas y 1µL de transcriptasa reversa del Kit de Transcripción Reversa de ADNc de alta capacidad (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos), según las condiciones especificadas por el fabricante. Posteriormente, las muestras se introdujeron en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) y se incubaron en las condiciones que se muestran en la **Figura 8**. La unión aleatoria de los random primers dirige la retotranscripción del ARN por la acción de la transcriptasa reversa y, a su vez, el ADNc resultante se amplifica mediante la reacción PCR. De esta manera se consigue la síntesis y amplificación de moléculas ADNc.

Por último, la concentración de ADNc obtenida se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 considerando una pureza óptima cuando el cociente 260/280 alcanza valores cercanos a 1,8 y superiores a 2 para el cociente 260/230. Las muestras se diluyeron hasta obtener una concentración final de 200 ng/µL.

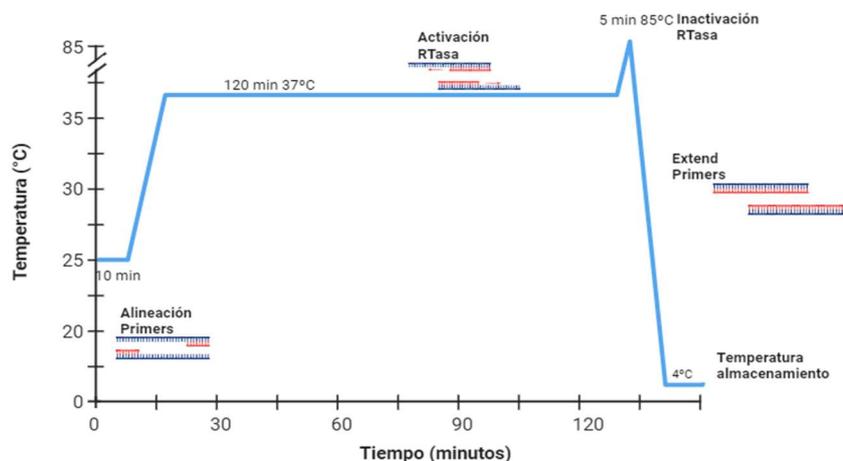


Figura 8. Representación gráfica del protocolo realizado con el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 para la transcripción reversa. Figura creada con BioRender.com.

4.5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

El uso de sondas fluorescentes TaqMan permite cuantificar la expresión génica a tiempo real a partir de ADNc, mediante su unión específica a la secuencia de los genes.

El ensayo Taqman consta de cebadores y una sonda específica para el gen de interés, con un fluoróforo en el extremo 5' y un supresor de fluorescencia en extremo 3'. De esta forma, se libera fluorescencia cuando la sonda es hidrolizada por la polimerasa Taq (*Thermus aquaticus*) al sintetizar la hebra complementaria. Por consiguiente, la intensidad de la fluorescencia aumenta en cada ciclo de la PCR de manera proporcional al número de moléculas amplificadas.

Para finalizar el análisis de la expresión génica de este trabajo, se cargaron 4 µL de muestra por triplicado en una placa de 96 pocillos para RTq-PCR (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) y se añadieron 16 µL de una mezcla compuesta por 10 µL NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (2x) (NZYtech, Lisboa, Portugal), 1 µL de sonda Taqman (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) y 5 µL de agua libre de nucleasas. Adicionalmente, se realizó un control negativo con 4 µL de agua libre de nucleasas para cada una de las sondas **Tabla 3**.

Gen	Descripción	Referencia sonda
GAPDH	Control endógeno	Hs02786624_g1
PTX3	En la lista de genes*	Hs00173615_m1
GPR126	En la lista de genes*	Hs01089210_m1
CDK5	En la lista de genes*	Hs00358991_g1
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular	Hs00900055_m1
HIF1	Factor de transcripción inducible por hipoxia	Hs00153153_m1
ELDT1	GPCR. Interviene en procesos de angiogénesis, crecimiento tumoral y metástadsis.	Hs00223377_m1
IRF3	En la lista de genes*	Hs01547283_m1
PRMT5	En la lista de genes*	Hs01047345_g1
SOCS3	Resistencia radioterapia (12)	Hs02330328_s1

Tabla 3. Genes estudiados mediante RTqPCR. Se muestra el nombre del gen, su descripción y el número de referencia de sonda TaqMan.

Para evitar la evaporación de las muestras, las placas se sellaron con un adhesivo específico para placas de PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Finalmente, la placa se introdujo en el equipo QuantStudio®3 Real-Time PCR (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) en las condiciones que se muestran en la **Figura 9**.

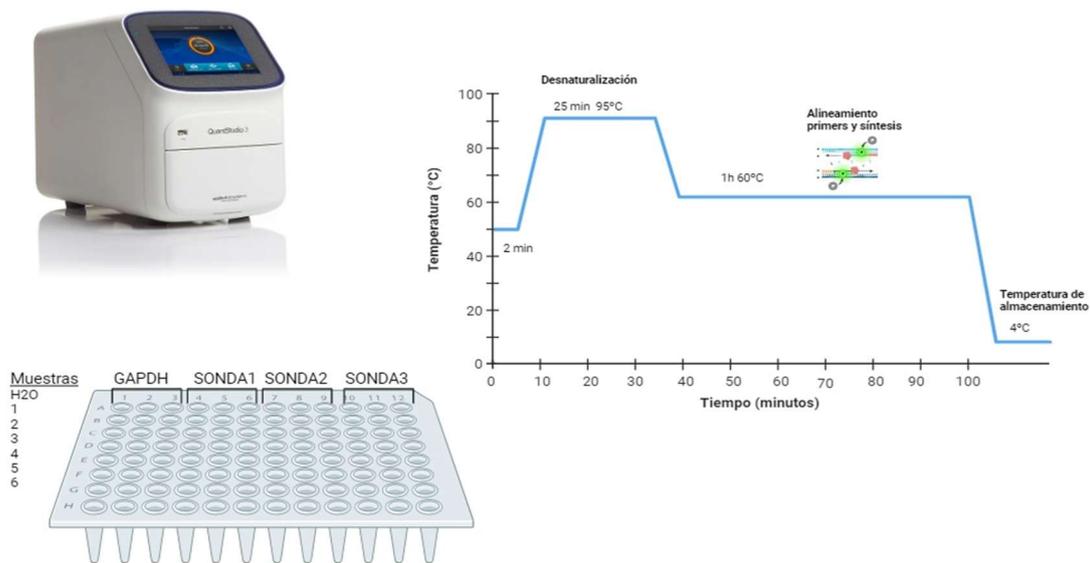


Figura 9. Representación gráfica del protocolo realizado con el equipo QuantStudio®3 Real-Time PCR.

Figura creada con BioRender.com.

4.6. Análisis del ciclo celular.

El ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M. En las células en proliferación, la replicación del ADN sucede durante la fase S (síntesis) y, después, la segregación de los cromosomas y la división celular ocurre en la fase M (mitosis). Además, los ciclos celulares disponen de fases preparativas como G1 y G2; durante G1 se sintetiza ARN y proteínas para prepararse para la síntesis de ADN y en G2 la célula presenta el doble del material genético y la célula se prepara para la mitosis (**Figura 10**) (44, 45).

La capacidad del yoduro de propidio para intercalarse entre las bases del ADN y emitir fluorescencia, permiten determinar por citometría de flujo el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular. Esto permite distinguir entre los tratamientos que tienen un efecto citotóxico (aumento de la muerte celular) y los que presentan un efecto citostático (bloqueo en una de las fases del ciclo) (46).

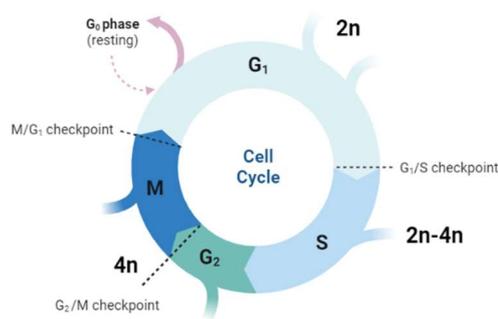


Figura 10. Representación esquemática de las fases en las que se divide el ciclo celular y su correspondiente contenido en material genético. Figura creada con Biorender.com.

Para evaluar el efecto de los tratamientos realizados sobre las líneas celulares, se realizó un análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. Inicialmente, se retiró el medio de cultivo de las placas transfectadas y/o tratadas, como se ha descrito en los apartados anteriores, y se transfirió a tubos de 15 mL (Sarsted, Nümbrecht, Alemania). Seguidamente, se realizó un lavado con 500 μ L de tampón fosfato salino 1x (PBS, del inglés "Phosphate Buffer Saline") con ácido etilendiaminotetraacético al 0,02% (EDTA; Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y se transfirió hacia el mismo tubo. El EDTA favorece la ruptura de las uniones de las células a la placa cuando se añade tripsina tripsina-EDTA (0,05%) (©Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania). Por ello, se añadieron 500 μ L de tripsina y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Tras el tiempo de incubación, se inactivó la tripsina con el medio de cultivo del tubo y se devolvió a éste. Los tubos correspondientes a cada pocillo se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm. Seguidamente, se decantaron y el pellet de células que queda tras la centrifugación, se resuspendió con etanol frío al 75% y se incubaron a una temperatura de -20°C durante, al menos, 1 hora para fijar las células.

Tras este tiempo de incubación, se volvieron a centrifugar los tubos en las mismas condiciones, se decantó el etanol y las células se resuspendieron en 400 μ L de una disolución de PBS que incluye Tritón X-100 al 0,5% (v/v) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos), 25 μ g/mL de ARNasa A (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y 25 μ g/mL de yoduro de propidio (Promocell®, Heidelberg, Alemania). Esto permite permeabilizar la membrana celular, facilitando la entrada de la ARNasa A que degrada el ARN y permitiendo la entrada del yoduro de propidio, que es impermeable a la membrana plasmática. Finalmente, después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, se realizó el análisis del ciclo celular con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).

4.7. Ensayo de migración.

El ensayo de migración por cicatrización de herida es uno de los primeros métodos diseñados para el estudio de la migración celular *in vitro* y el más utilizado por su sencillez. Se basa en la creación de una cicatriz sobre un monocapa celular, creando un hueco sin células que induce la migración de las células hacia éste. El seguimiento mediante técnicas de imagen a tiempo cero y durante intervalos de 24 horas permite el estudio del potencial migratorio de las líneas celulares tratadas con el fármaco a estudiar (47, 48).

En este trabajo, se ha utilizado este ensayo para testar la efectividad de fármacos convencionales para el GBM sobre el potencial migratorio de las líneas celulares. Para ello, se sembraron las células en placas de 96 pocillos (Sarstedt) a una densidad de 16.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas.

Tras este tiempo de incubación, se realizó una cicatriz con una punta de pipeta de 10 μ L. Además, se realizó un lavado con medio DMEM-F12 para eliminar las células residuales que se pudieran haber despegado y, posteriormente se echó en cada pocillo una disolución con 10 μ g/mL de Hoescht (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Se realizó una incubación en condiciones de oscuridad con una temperatura de 37°C, un 5% de CO₂ y en ambiente húmedo, durante 20 minutos y se realizó un lavado con medio de cultivo echando posteriormente el tratamiento correspondiente.

Al estar los núcleos marcados con Hoescht, se pueden visualizar a una longitud de onda de 350 nm. De esta manera, las placas fueron fotografiadas con el lector multimodal de microplacas Cytation™ 3 (BioTek Instruments Inc., EE.UU.) a diferentes tiempos: 0, 24 y 48 horas. Posteriormente, se midió el área de la cicatriz con el programa Image J.

4.8. Análisis transcriptómico.

En el HGUA se secuenció el ARN de 142 muestras de pacientes con gliomas de distintos grados utilizando el secuenciador NextSeq550 (Illumina Inc, San Diego, California, Estados Unidos). De esta forma, se obtuvieron los datos de expresión de los 29 genes de interés para cada grado de glioma. Con estos datos, se realizó un estudio comparativo de expresión génica entre los diferentes grados de malignidad. Además, se realizó un análisis de supervivencia utilizando los datos anatomopatológicos de los pacientes aportados por el HGUA.

Los análisis de expresión génica diferencial y de supervivencia fueron realizados con el programa R Studio v4.4.0. Para la evaluación de la expresión diferencial se usó el paquete “DESeq2”, diseñado para

la normalización, visualización y análisis diferencial de datos de recuento de alta dimensión utilizando técnicas empíricas de Bayes. Para el análisis de la supervivencia se utilizó el paquete “survival”, que estima la probabilidad de supervivencia mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier.

4.9. Análisis estadístico.

Para la representación y el análisis de los resultados experimentales se ha usado el programa GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad Software Inc.). Se realizaron análisis de estadística descriptiva mediante el cálculo de la media y la desviación estándar (DE), con un tamaño muestral mayor o igual a 3. Además, se han realizado pruebas de normalidad tipo Shapiro-Wilk, considerando una distribución normal cuando se obtuvo un p-valor superior a 0,05. Para determinar si se producían diferencias significativas entre los distintos tratamientos, si los datos que cumplían con una distribución normal y varianzas homogéneas, se aplicó la prueba T de Student. En aquellos casos, en los que los datos no presentaban una distribución normal, se realizó la prueba U Mann-Whitney.

5. Resultados

Objetivo 1: Analizar la correlación de la lista de genes obtenida con UALCAN con la supervivencia de los pacientes.

En primer lugar, se obtuvieron datos de RNA-seq a partir de 142 muestras de pacientes con gliomas de distintos grados. De estas muestras, 8 pertenecían a gliomas de grado I, 27 a gliomas de grado II, 20 a gliomas de grado III y 84 eran GBM. Las 3 muestras restantes se descartaron al pertenecer otro tipo de tumores del SNC. Con estos datos, se realizó un análisis de expresión diferencial entre los diferentes grados y posteriormente se estudió su impacto en la supervivencia de los pacientes.

El objetivo era corroborar si el análisis transcriptómico realizado en el laboratorio presentaba similitudes con los datos almacenados en la base pública UALCAN, que contiene información sobre la expresión de genes en muestras sanas y de 150 pacientes con GBM. De esta manera, se pretendía determinar si esta lista de genes podría ser de utilidad en el pronóstico de los pacientes o como posibles dianas terapéuticas. Al comparar la expresión de los 29 genes entre los GBM y los gliomas de bajo grado (grados I, II y III), se observaron diferencias significativas en 13 de ellos (**Tabla 4**). A continuación, se compararon los datos de expresión de estos genes con la base de datos UALCAN, obteniendo un total de 6 genes que coincidían en presentar diferencias significativas. Las diferencias obtenidas entre nuestros datos y los almacenados en UALCAN son en parte debidas a que en la base UALCAN se compara la expresión sobre cerebros no tumorales, mientras que en nuestra muestra la comparación se establece entre gliomas de diferente grado con respecto al GBM.

Gen	P-valor transcriptómico	Gen	P-valor transcriptómico
PTX3	S***	COL5A1	S***
SOCS3	S***	GPR133/ADGRD1	S***
MMP19	S***	CDK5	S**
GPR162	S***	F2RL2	S**
GPRC5A	S***	GPRC5D	S**
ADAMTS1	S***	GPR126/ADGRG6	S*
GRASP1	S***		

Tabla 4. Comparativa entre la expresión de los genes en GBM de alto grado vs el conjunto de bajo grado (grados I, II y III). Se muestran los genes que han mostrado diferencias significativas en análisis transcriptómico, ordenados de mayor a menor valor significativo. S* indica un p-valor <0,05, S** indica un p-valor <0,01 y S*** indica un p-valor <0,001.

En la **Figura 11** se representan los datos de expresión de los tres genes con mayor valor significativo, obtenidos tanto del análisis transcriptómico como de UALCAN. Estos resultados concluyen que se produce un aumento en la expresión de estos genes en el GBM con respecto al resto de gliomas y con respecto al cerebro no tumoral.

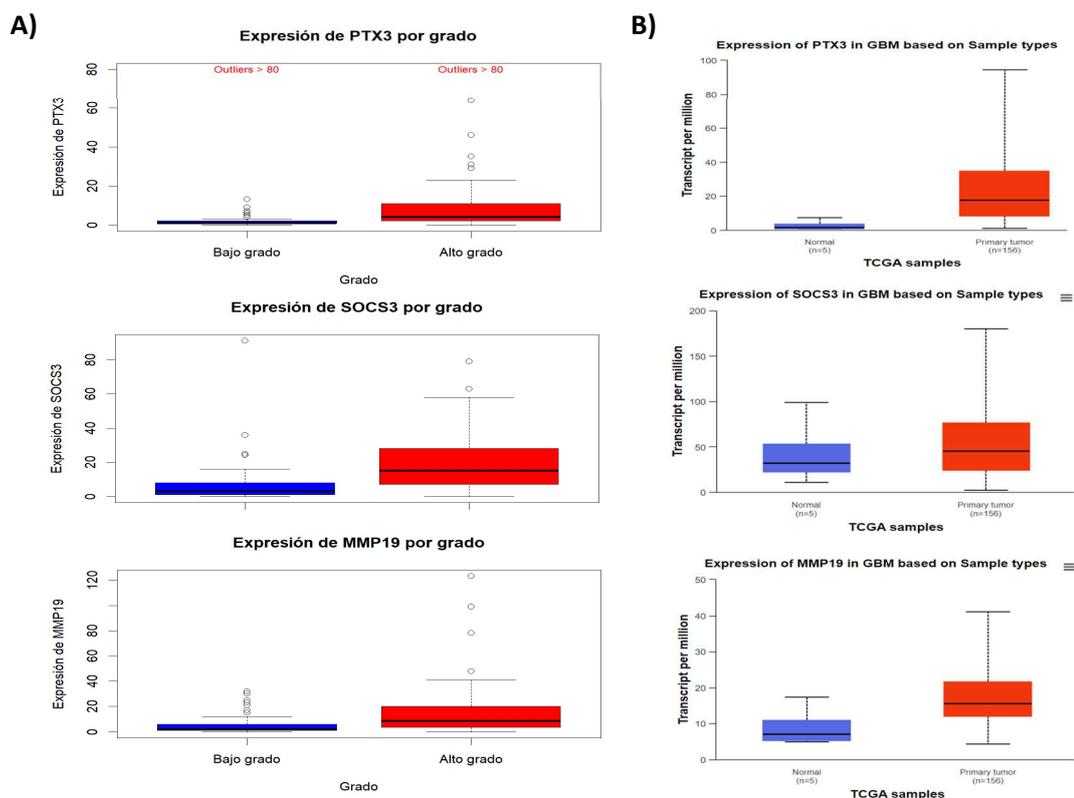


Figura 11. Análisis de expresión génica para PTX3, SOCS3 y MMP19. A) Análisis de expresión realizado por el laboratorio donde se compara el GBM de alto grado (rojo) con el conjunto de GBM de bajo grado (azul). B) Datos obtenidos en UALCAN donde se compara la expresión de muestras sanas (azul) con GBM (rojo). Todos los datos se muestran como la media y la desviación estándar.

La base de datos UALCAN utiliza como controles cinco muestras de cerebro normal, mientras que los datos obtenidos de la base de datos de nuestros colaboradores de ISABIAL solo dispone de valores de expresión en los diferentes grados de malignidad de los gliomas, desde el grado I hasta el IV, identificado como GBM. A pesar de la complejidad que supone la comparación de los datos UALCAN con los nuestros, se pretende determinar si la expresión diferencial de estos genes se observa exclusivamente en los GBM o también en los diferentes grados de malignidad. Por tanto, se realizó el mismo análisis comparando el GBM con cada uno de los diferentes grados de gliomas por separado.

En la **Tabla 5** se recogen los p-valores significativos obtenidos al comparar la expresión de los 13 genes mencionados entre cada uno de los grados de glioma. Estos valores muestran que la expresión de PTX3 se encuentra diferencialmente reducida en los tres grados de glioma en comparación con el GBM y, por el contrario, la expresión de GPR162 se encuentra significativamente aumentada en los tres grados de glioma en comparación con el GBM. Esto parece indicar que la expresión diferencial de estos dos genes está íntimamente asociada con el GBM.

Respecto a los valores obtenidos en el análisis de GPR126 y CDK5, en la **Tabla 4** se observa una diferencia notable entre su expresión en el GBM y en el conjunto de gliomas. Sin embargo, no hay diferencias significativas cuando se comparan por separado los diferentes grados de gliomas con el GBM (**Figura 12**).

Gen	P-valor transcriptómico			Gen	P-valor transcriptómico		
	GBM vs G.I	GBM vs G.II	GBM vs G.III		GBM vs G.I	GBM vs G.II	GBM vs G.III
PTX3	S***	S***	S**	COL5A1	ns	S*	S**
SOCS3	ns	S***	S***	GPR133/ADGRD1	ns	ns	ns
MMP19	ns	S***	S**	CDK5	ns	ns	ns
GPR162	S**	S***	S**	F2RL2	ns	S***	ns
GPRC5A	ns	S***	S**	GPRC5D	ns	ns	S**
ADAMTS1	ns	S***	ns	GPR126/ADGRG6	ns	ns	ns
GRASP1	S**	S**	ns	NXX3-1	S**	ns	ns

Tabla 5. Comparativa entre la expresión de los genes en GBM de alto grado vs grados I, II y III individualmente (G.I, G.II,G.III, respectivamente). S** indica un p-valor <0,01, s*** indica un p-valor <0,001 y ns indica “no significativo”.

Además, a pesar de que entre los grados I y IV es donde menos diferencias significativas se han encontrado, sí que se produce una diferencia en NKX3-1, que no tiene lugar al comparar el resto de los grados y el GBM. Es posible que la falta de diferencias significativas entre los GBM y los gliomas de grado I se deba a que el número de pacientes de este tipo muy bajo, con solo 8 muestras.

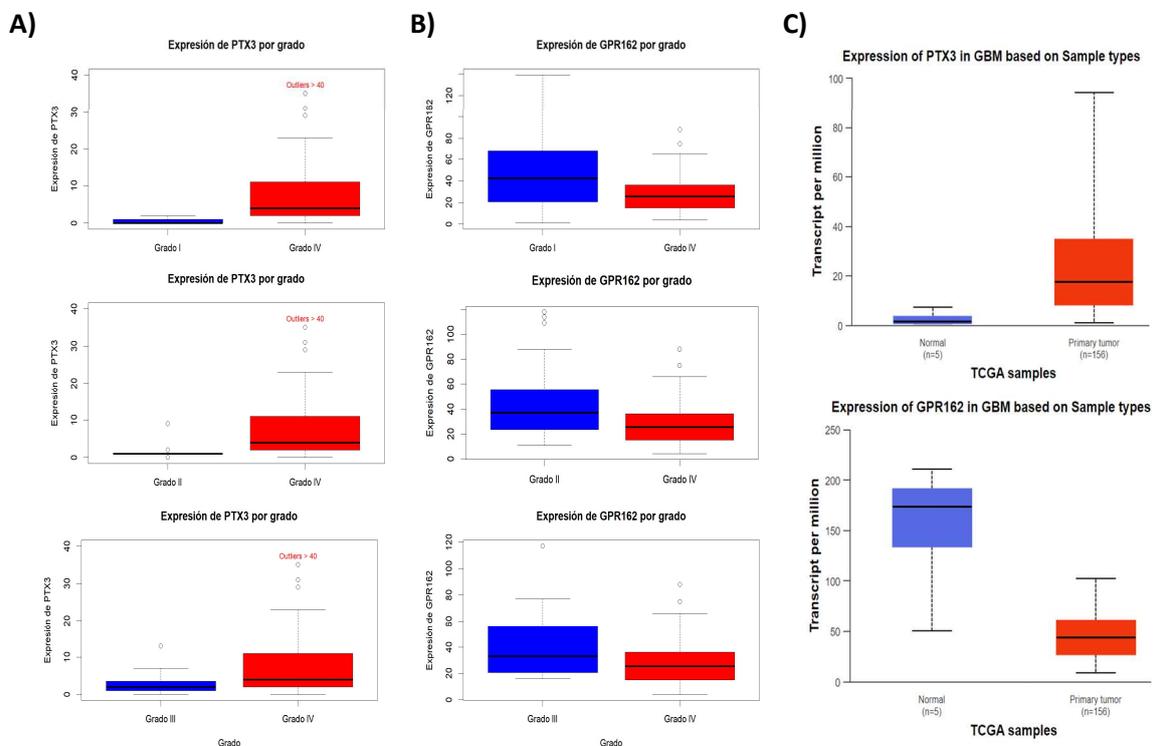


Figura 12. Análisis de expresión génica de PTX3 y GPR162, entre los diferentes grados de GBM. A) Análisis de expresión de PTX3 realizado por el laboratorio donde se compara el GBM de alto grado con los grados I, II y III por separado. **B)** Análisis de expresión de GPR162 realizado por el laboratorio donde se compara el GBM de alto grado (rojo) con los grados I, II y III (azul) por separado. **C)** Datos obtenidos en UALCAN donde se compara la expresión de muestras sanas con GBM. Todos los datos se muestran como la media y la desviación estándar y se representa el GBM en rojo y los gliomas de bajo grado en azul.

En el momento que se llevó a cabo el análisis de expresión génica, de los 142 pacientes incluidos, 77 habían fallecido y, de estos, 58 eran GBM. Como era de esperar, los análisis estadísticos realizados para comparar la supervivencia de los pacientes de alto grado con la del conjunto de los pacientes con bajo grado, revelaron que el GBM presenta significativamente un peor pronóstico. Además, al comparar la supervivencia entre los diferentes grados individualmente se observó que los pacientes con gliomas de grado I y II presentaban un mejor pronóstico que aquellos con grado III y IV (**Figura 13A**).

Posteriormente, se estudió si existen diferencias en la expresión de los 29 genes de la lista entre el 25% de pacientes con GBM que presentaron un menor tiempo de supervivencia y el 25% de los que mostraban el mayor tiempo de supervivencia. Como se puede observar en la **Figura 13B**, no se aprecian

diferencias significativas en ninguna de las comparaciones. A pesar de ello, en algunos genes, como ADAMST1, CDK5, ADGRD1, GPR162, MMP19, COL5A1, TRIM3 y GPR137, se observan diferencias en las medias de expresión entre los grupos de alta y baja supervivencia que probablemente alcanzarían significación estadística con una muestra de pacientes más alta.

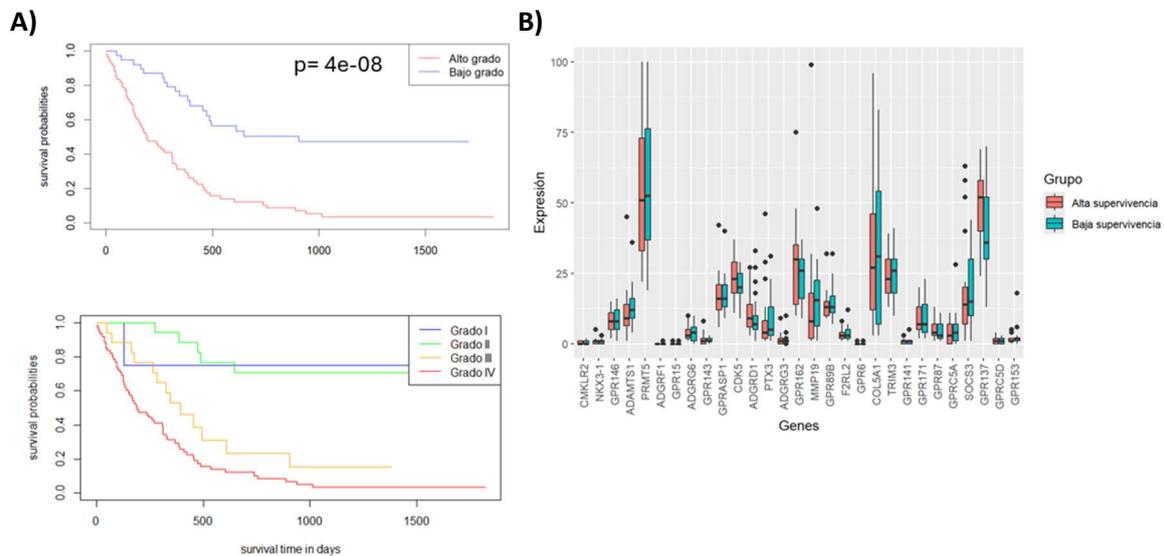


Figura 13. Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de los diferentes grados de glioma. A) Análisis de la supervivencia realizado por el laboratorio donde se compara el GBM (rojo) con el conjunto de gliomas de bajo grado (azul) y por separado (grado I en azul, grado II en verde y grado III en amarillo). **B)** Diagrama de cajas y bigotes donde se representa la expresión de cada gen en función de la supervivencia de los pacientes (alta supervivencia en rojo; baja supervivencia en azul). Todos los datos se muestran como la media y la desviación estándar.

Objetivo 2: Determinar la posible relación entre los genes PTX3, GPR126 y CDK5 y la supervivencia o la resistencia a fármacos.

Para determinar el impacto biológico de los genes de la lista sobre el GBM, se comenzó centrándose en los tres genes mencionados anteriormente.

5.2.1. Selección de los modelos celulares.

Para iniciar el estudio de los genes PTX3, GRP126 y CDK5, en primer lugar, se seleccionaron las líneas celulares de GBM en las que se iban a llevar a cabo los diferentes análisis en base a la expresión de los mismos.

Para ello, se realizaron análisis de expresión génica mediante RTq-PCR y se seleccionaron aquellos modelos celulares con mayor expresión del gen de interés. De este modo, se escogió HGUE-GB-18 para

el análisis de PTX3, HGUE-GB-16 para GPR126, y HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 para CDK5 (**Figura 14**). Cabe destacar que la línea celular HGUE-GB-16 no presenta metilación en el promotor de MGMT, siendo por tanto la más resistente a fármacos convencionales, como la BCNU. Así, la selección de HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 para el análisis del gen CDK5, permitirá determinar qué sucede en líneas celulares con sensibilidad diferencial a los agentes alquilantes como el BCNU.

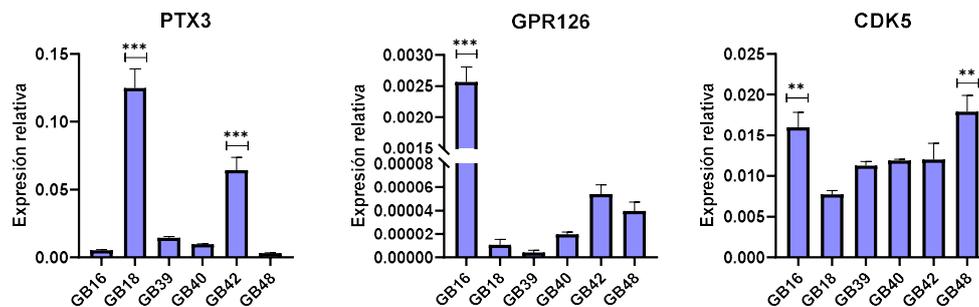


Figura 14. Análisis de expresión génica para PTX3, GPR126 y CDK5 en las líneas celulares de GBM. Se muestra la expresión relativa de cada gen frente al control endógeno ($2^{-\Delta Ct}$). Todos los datos se muestran como la media y la desviación estándar de la expresión relativa de los genes en cada línea celular. ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

5.2.2. Análisis del papel de PTX3 sobre la proliferación y resistencia a fármacos.

Para determinar cómo afecta este gen al crecimiento del tumor y a la resistencia a fármacos, se silenció PTX3 mediante la transfección con un siRNA en la línea celular HGUE-GB-18. A continuación, se confirmó la efectividad del silenciamiento mediante un análisis de expresión y, posteriormente, las células fueron tratadas o no con BCNU para evaluar si la expresión de PTX3 tenía un impacto en cómo el tratamiento afectaba a la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular. Como se muestra en la **Figura 15A**, se logró una reducción de la expresión de PTX3 de aproximadamente el 90%. Además, cabe destacar que el tratamiento con BCNU indujo un aumento significativo de la expresión de PTX3 en el control transfectado con el siRNA no específico. Dicho aumento no se producía en la muestra transfectada con el siRNA específico de PTX3.

El silenciamiento de PTX3 ocasionó una reducción del porcentaje de células en la fase S, asociado a un aumento del porcentaje de células muertas y en fase G2/M en comparación con el siRNA no específico (**Figura 15C**). Tras añadir el tratamiento con BCNU, aumentó el porcentaje de células ciclando, debido al efecto de este fármaco sobre el ciclo celular, que consiste en un bloqueo de las células en la fase G2/M previo a la muerte celular (**Figura 15B**). Sin embargo, al evaluar el efecto del fármaco tras el silenciamiento, se observó que los cambios son muy similares a los producidos únicamente por el silenciamiento de PTX3, aunque con una disminución significativa del porcentaje de células en la fase

G2/M (**Figura 15C**). En conjunto, estos datos sugieren que PTX3 juega un papel en la proliferación de las células tumorales, pero no induce grandes cambios en la efectividad del tratamiento.

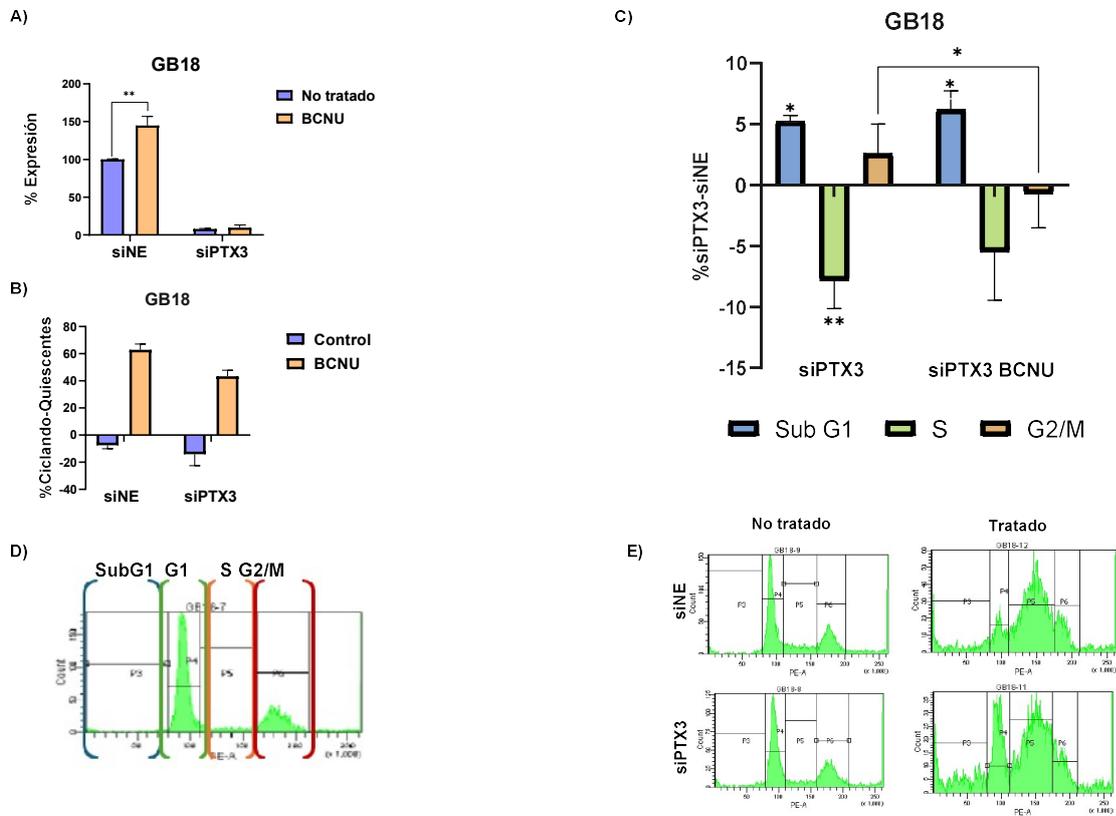


Figura 15. Análisis del efecto del silenciamiento de PTX3 y su combinación con BCNU. A) Análisis de expresión génica mediante RTq-PCR. Se muestra el porcentaje de la expresión de PTX3 frente al control transfectado con el siRNA no específico (siNE). En azul se muestra la expresión en las células sin tratar y en naranja las células tratadas con BCNU. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran ciclando con respecto a las quiescentes; en azul se representan las muestras no tratadas y en naranja, los tratamientos con BCNU. **C)** Representación del porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo con respecto a su control no específico. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución. Todos los datos se muestran como la media y la \pm DE en cada línea celular. * indica un p-valor <0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001. **D)** Histograma representativo de la distribución en el ciclo celular de las células HGUE-GB-18 en condiciones basales. **E)** Histogramas obtenidos por citometría de flujo, representativos del ciclo celular en cada una de las condiciones estudiadas.

5.2.3. Análisis del papel de CDK5 sobre la capacidad de proliferación, migración de las células y la resistencia a fármacos.

Para estudiar cómo afecta este gen a la proliferación celular y la resistencia a fármacos, se procedió exactamente igual que en el apartado anterior con PTX3, pero silenciando CDK5 en dos líneas celulares: HGUE-GB-16, que se caracteriza por ser resistente a la BCNU, y HGUE-GB-48, sensible a este fármaco.

Al transfectar las células con un siRNA frente a CDK5, en ambas líneas celulares se produjo una reducción de su expresión de aproximadamente el 90% frente a la expresión observada en el control transfectado con un siRNA no específico. Además, el tratamiento con BCNU indujo un aumento significativo de la expresión de CDK5 en la línea sensible HGUE-GB-48, mientras que en la línea celular resistente HGUE-GB-16 se produjo una disminución (**Figura 17A**).

Al analizar los efectos a nivel de ciclo celular, de nuevo se produjo un aumento del porcentaje de células ciclando tras el tratamiento con BCNU en ambas líneas celulares (**Figuras 16 y 17B**). Sin embargo, este aumento se ve reducido tras el silenciamiento de CDK5 en ambas líneas celulares, sugiriendo que el silenciamiento de este gen protege parcialmente del efecto inducido por la BCNU.

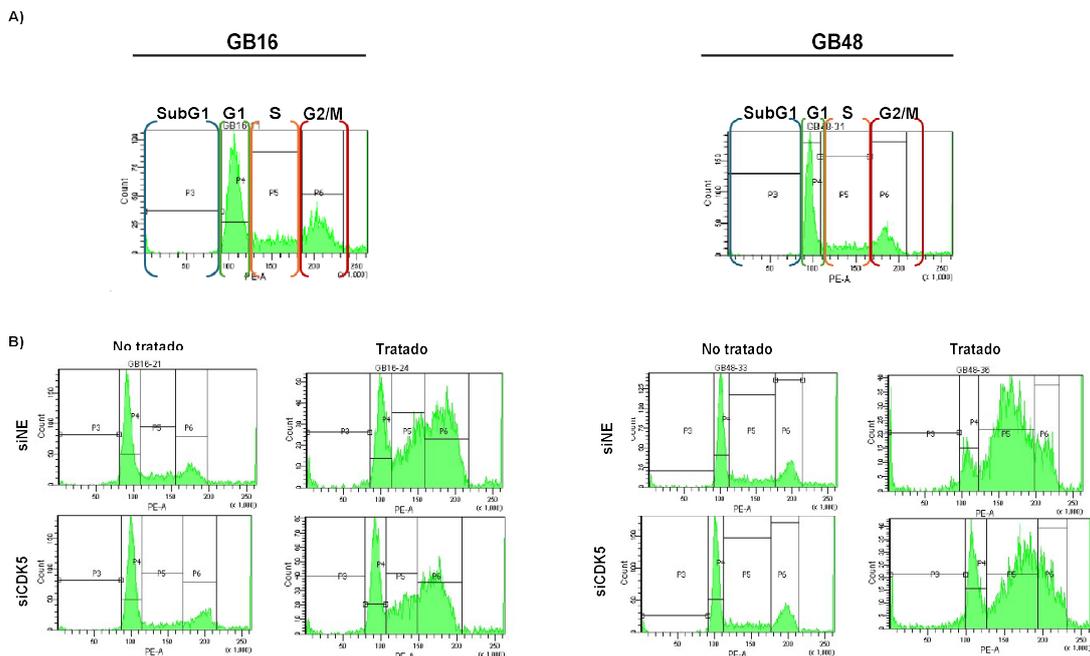


Figura 16. Histogramas obtenidos por citometría de flujo donde se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. A) Histogramas obtenidos con las líneas celulares sin tratar, en los que se señalan las respectivas fases del ciclo celular. **B)** Histogramas obtenidos en las diferentes condiciones estudiadas donde se observan los cambios producidos en el ciclo celular tras sus respectivos tratamientos.

En la línea celular HGUE-GB-16, el silenciamiento del gen causó un aumento del porcentaje de células en fase S, que no se observa en HGUE-GB-48 (**Figura 17C**). Este aumento está asociado a una

disminución del número de células muertas y en fase G2/M y se ve contrarrestado al añadir el tratamiento con BCNU.

En resumen, el silenciamiento de este gen en la línea celular más resistente al BCNU parece tener un efecto por sí mismo a nivel de ciclo celular, que se ve contrarrestado por el tratamiento con BCNU. A su vez, parece que la combinación de ambos protege parcialmente del efecto inducido por la BCNU, dado que aumenta el porcentaje de células quiescentes en comparación con el tratamiento sólo.

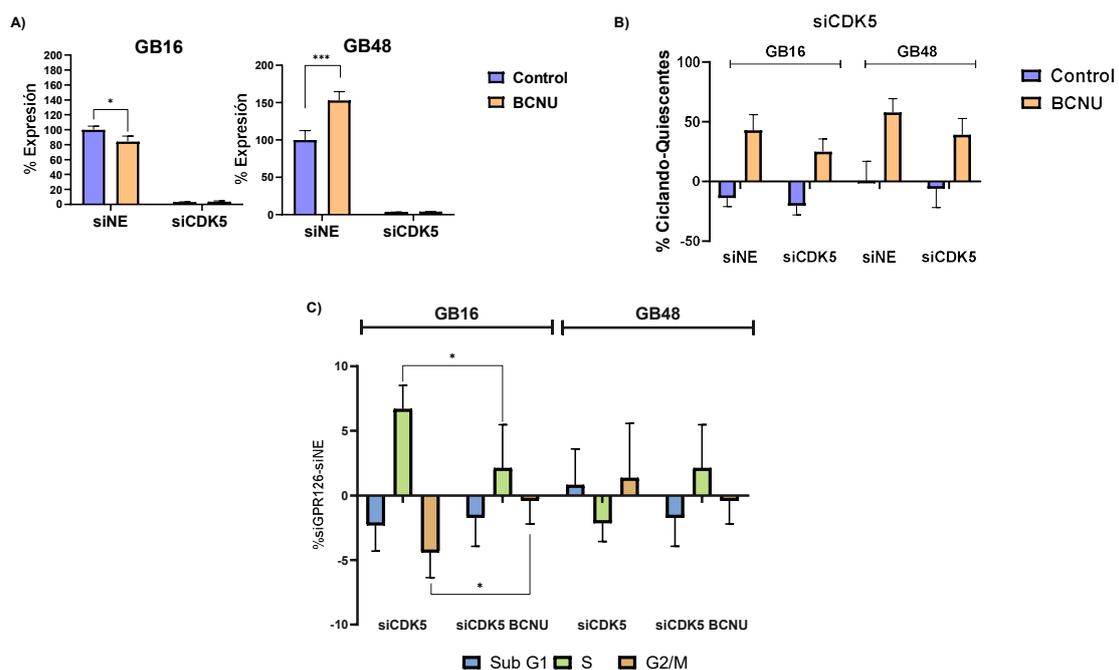


Figura 17. Análisis del efecto del silenciamiento de CDK5 y su combinación con BCNU. A) Análisis de expresión génica mediante RTq-PCR. Se muestra el porcentaje de la expresión de CDK5 frente al control transfectado con el siRNA no específico (siNE). En azul se muestra la expresión en las células sin tratar y en naranja las células tratadas con BCNU. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran ciclando respecto a las quiescentes; en azul se representan las muestras no tratadas y en naranja, los tratamientos con BCNU. **C)** Representación del porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo con respecto a su control no específico. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución. Todos los datos se muestran como la media y la DE en cada línea celular. * indica un p-valor <0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

Para determinar si estos cambios tenían lugar también a nivel de proteína, se utilizó CP-681301, un inhibidor de CDK5 (iCDK5), y se analizó su efecto sobre el crecimiento y la migración de las células tumorales, así como a la resistencia de fármacos. Además, de acuerdo con análisis previos realizados

por el laboratorio, se determinó que la concentración óptima para el tratamiento con iCDK5 era de 10 μ M.

Como se muestra en la **Figura 18A**, el tratamiento con iCDK5 en la línea celular HGUE-GB-16 provocó un incremento en el porcentaje células que se encuentran ciclando, en comparación con el porcentaje obtenido cuando se realizó el tratamiento únicamente con BCNU. Sin embargo, la combinación de estos dos fármacos no potenció este efecto. La **Figura 18B** confirma estos resultados mostrando un notable aumento del porcentaje de células en las fases S y G2/M y una disminución en G1 tras el tratamiento con el iCDK5 cuando se compara con el control. Además, la combinación de este inhibidor con BCNU no ocasionó cambios diferentes a los que produce el BCNU en monoterapia.

En contraste, el tratamiento con iCDK5 y su combinación con BCNU en HGUE-GB-48, en comparación con el efecto de la BCNU, causó una disminución en el porcentaje de células ciclando, que se traduce a una protección frente a este fármaco (**Figura 18A**). Por otro lado, el iCDK5 provocó un aumento del porcentaje de células ciclando en comparación con el control, asociado a un aumento de la muerte celular y de la fase G2/M, como se muestra en la **Figura 18C**. En comparación con el efecto del BCNU, su combinación con iCDK5 ocasionó una reducción en el porcentaje de las células ciclando debido al aumento de células en la fase G1 (**Figura 18C**).

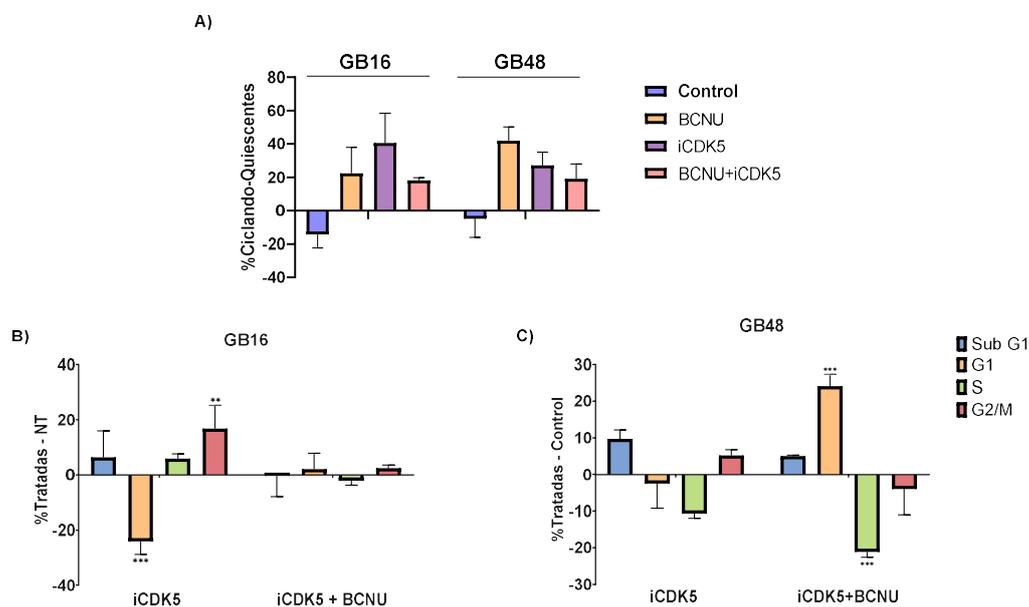


Figura 18. Representación gráfica de los efectos en el ciclo celular en las líneas HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48, tras el tratamiento con iCDK5 y BCNU. A) Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran ciclando respecto a las quiescentes; en azul se representan las muestras no tratadas y en naranja, los tratamientos con BCNU. **B y C)** Representación gráfica del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución con respecto a los controles: un control sin tratar para el análisis de iCDK5 y un control tratado con BCNU para la combinación de estos dos fármacos. Todos los datos se muestran como la media y la DE en cada línea celular. * indica un p-valor<0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

Estos resultados difieren de lo observado tras el silenciamiento del gen (**Figura 17C**). En la línea celular resistente a la BCNU, el tratamiento con el iCDK5 parece presentar mayor efectividad que el silenciamiento de CDK5. Además, el tratamiento realizado en la línea sensible mostró presentar mayor efectividad que el silenciamiento a nivel de muerte celular. Coincidiendo con el silenciamiento de CDK5 en la línea HGUE-GB18, cabe destacar el efecto protector generado por parte del iCDK5 frente a la BCNU.

En base al papel sugerido de CDK5 sobre la migración e invasividad de las células tumorales en la literatura, se decidió evaluar la migración celular tras el tratamiento con el inhibidor en HGUE-GB-16, HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48.

La **Figura 19** muestra que, en condiciones basales, el área de la herida se va reduciendo con el tiempo en los tres modelos celulares. Tras 72 horas, la reducción del área en la línea celular HGUE-GB-16 fue de aproximadamente el 85%, mientras que en las otras dos líneas celulares fue del 50% (**Figuras 19 y 20**). En cambio, tras el tratamiento con el inhibidor, se produjo una disminución significativa en la velocidad de cierre de la cicatriz en las tres líneas celulares, lo que respalda la participación de CDK5 en la migración celular.

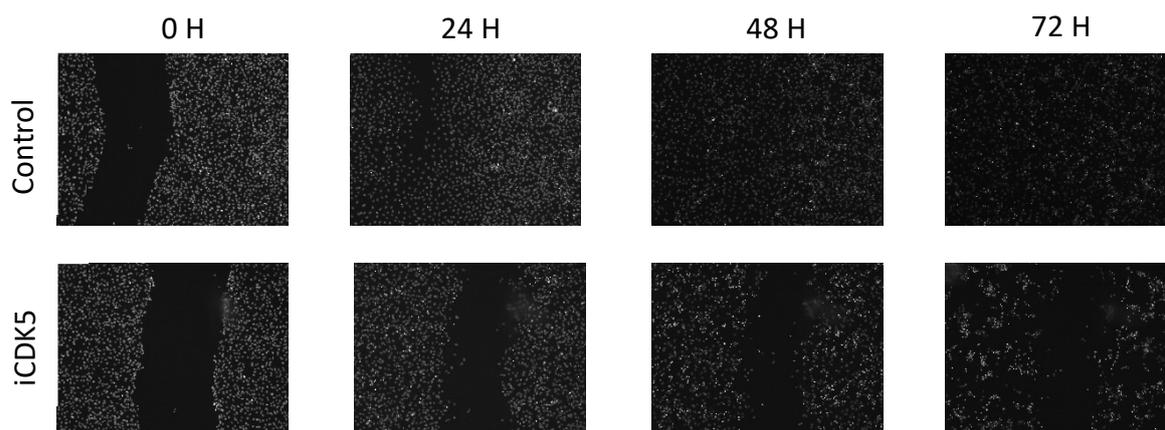


Figura 19. Imágenes del ensayo de migración sobre la línea HGUE-GB-16 obtenidas con el lector multimodal de microplacas Cytation™ 3 (BioTek Instruments Inc., EE.UU.) Se muestra la migración de la células hacia el interior de la cicatriz a lo largo de 72 horas mediante el marcaje de los núcleos celulares con Hoechst.

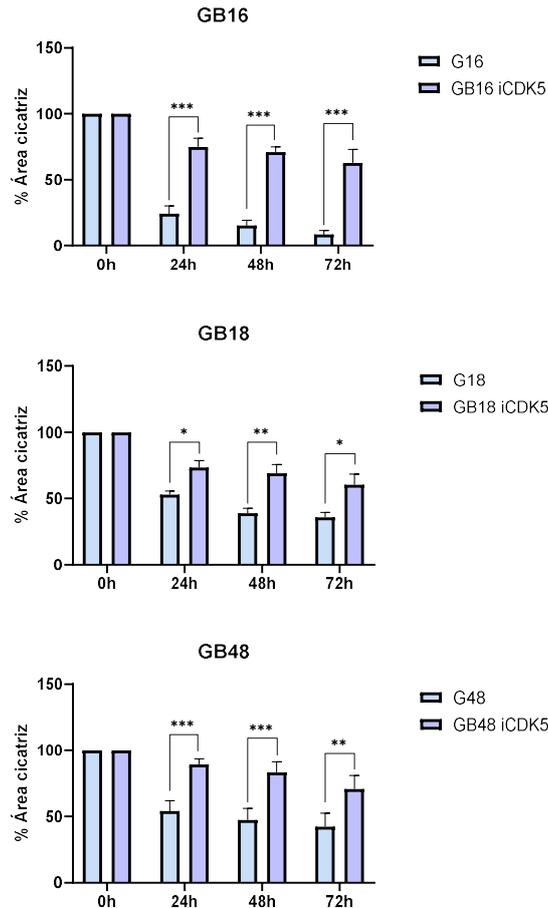


Figura 20. Representación gráfica del efecto del iCDK5 sobre la capacidad migratoria de las líneas HGUE-GB-16, HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48. Se muestra el área en porcentaje de la cicatriz realizada en el pocillo a tiempo 0 y los cambios producidos en ausencia (azul) y presencia del inhibidor (lila) durante 72 horas con un intervalo de 24 horas. Todos los datos se muestran como la media y la DE en cada línea celular. * indica un p-valor < 0,05, ** indica un p-valor < 0,01 y *** indica un p-valor < 0,001.

5.2.4. Análisis del papel de GPR126 sobre la capacidad de proliferación y la resistencia a fármacos.

De nuevo, para analizar el papel de GPR126, se determinaron los cambios a nivel de ciclo celular tras su silenciamiento en la línea celular HGUE-GB-16 por ser la que mayor expresión presenta basalmente.

La **Figura 21A** confirma que se logró una reducción de aproximadamente el 90% en la expresión de GPR126 con respecto a la transfección con el siRNA no específico. Sin embargo, a diferencia de los otros genes, observamos que la expresión de GPR126 no está regulada por la BCNU.

Como en los casos anteriores, el tratamiento con BCNU indujo un aumento en el porcentaje de células ciclando, que no se vio afectado tras el silenciamiento del gen (**Figura 20B**). Por sí mismo, el

silenciamiento de GPR126 resultó en aumento del porcentaje de células en la fase S, asociado principalmente a una reducción del porcentaje de células en fase G2/M, aunque estos cambios no fueron significativos. Sin embargo, el silenciamiento no indujo cambios en el efecto causado por la BCNU, aunque esta combinación redujo el efecto de la BCNU, lo que refleja el efecto protector del silenciamiento de este gen frente a la BCNU (**Figura 21C, 21E**).

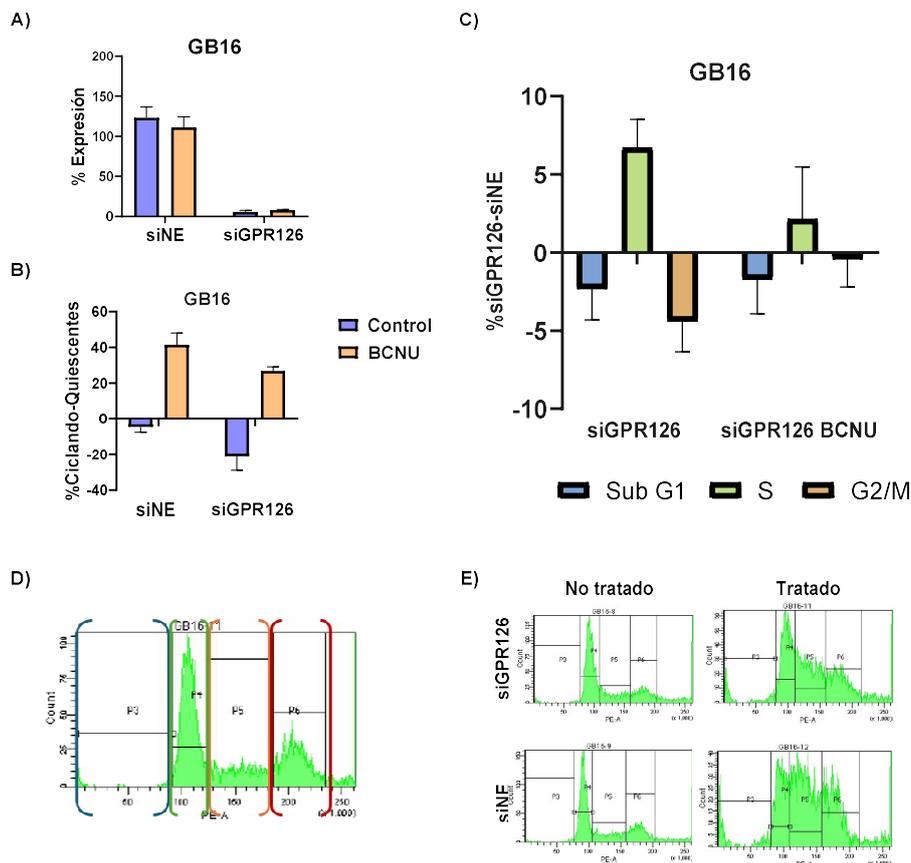


Figura 21. Análisis del efecto del silenciamiento de GPR126 y su combinación con BCNU. A) Análisis de expresión génica mediante RTq-PCR. Se muestra el porcentaje de la expresión de GPR126 frente al control transfectado con el siRNA no específico (siNE). En azul se muestra la expresión en las células sin tratar y en naranja las células tratadas con BCNU. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran ciclando respecto a las quiescentes; en azul se representan las muestras no tratadas y en naranja, los tratamientos con BCNU. **C)** Representación del porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo con respecto a su control no específico. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución. Todos los datos se muestran como la media y la DE en cada línea celular. * indica un p-valor <0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

Debido a que la PKA desempeña un papel fundamental en una de las vías de señalización activadas por los GPCRs, se decidió estudiar el efecto del H89, un inhibidor de esta enzima, sobre la proliferación celular y la resistencia a la BCNU.

Para ello, se realizaron análisis de proliferación celular utilizando el H89 y la combinación de H89 con BCNU. Como se ilustra en la **Figura 22A**, en la línea HGUE-GB-16, el tratamiento con H89 induce una reducción de la proliferación al aumentar la concentración hasta 2,5 μM , en cambio, con concentraciones mayores este efecto disminuye. Al combinarlo con BCNU, únicamente la concentración de 1 μM de H89 mostró un efecto aditivo del efecto antiproliferativo de ambos; el resto concentraciones mostraron un efecto equivalente al producido por el H89 sólo.

Al analizar qué ocurría a nivel de ciclo celular, se observó que el tratamiento con H89 y su combinación con BCNU no produjeron cambios notables en los porcentajes de células ciclando, con respecto al control y al propio tratamiento con BCNU, respectivamente (**Figura 22B**). Sin embargo, la **Figura 22C** revela un ligero aumento en el porcentaje de células muertas y una reducción en el porcentaje de células en fase S. Por su parte, la combinación de H89 con BCNU muestra una tendencia a potenciar el efecto inducido por este fármaco, aumentando el porcentaje de células acumuladas en todas las fases. Sin embargo, debido a la falta de réplicas en el ensayo experimental de la combinación de H89 y BCNU, los resultados obtenidos no son concluyentes.

Dado que la línea celular HGUE-GB-16, es la más resistente al tratamiento con BCNU, se comprobó qué sucedía al combinar H89 con BCNU en las otras dos líneas celulares utilizadas. Los análisis de proliferación celular mostraron que el tratamiento con H89 o bien no presentaba ningún efecto o causaba un aumento de la proliferación celular (**Figura 23A**). Al combinar H89 con BCNU, en ambas líneas celulares se observó un efecto antiproliferativo equivalente al producido por la BCNU sola.

Al analizar los efectos a nivel de ciclo celular sobre HGUE-GB-18, se observó que el H89 no modificaba los porcentajes de las células ciclando en comparación con los respectivos controles. En HGUE-GB-48, el uso de H89 ocasionó una ligera disminución de las células ciclando con respecto al control (**Figura 23B**).

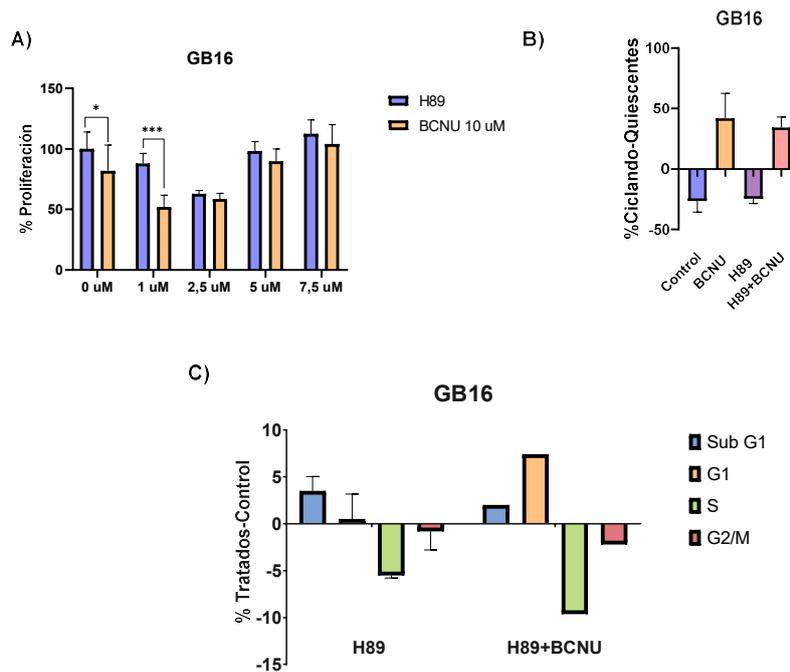


Figura 22. Representación gráfica del efecto del H89 por sí solo y en combinación con BCNU sobre la proliferación y el ciclo celular de HGUE-GB-16. A) Se representa el porcentaje de células metabólicamente activas en función de las diferentes concentraciones de H89 utilizadas. En este ensayo los tratamientos de BCNU se han realizado a una concentración de 10 μ M. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran ciclando respecto a las quiescentes; en azul se representan las muestras no tratadas y en naranja, los tratamientos con BCNU. **C)** Representación gráfica del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución con respecto a los controles: un control sin tratar para el análisis de H89 y un control tratado con BCNU para la combinación de estos dos fármacos. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución. Todos los datos se muestran como la media y la desviación estándar en cada línea celular. * indica un p-valor <0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

La **Figura 23C** muestra que el tratamiento con H89 induce una disminución en las fases S y G2/M, asociado a un aumento del porcentaje de células en fase G1 en ambos casos, aunque este aumento no fue significativo. Cuando se administró en combinación con BCNU, según la **Figura 23B**, no se observaron cambios en el efecto del fármaco sobre el porcentaje de células ciclando. Sin embargo, en ambas líneas celulares se observa un aumento de las fases G1, S y G2/M, destacando el efecto de esta combinación sobre la línea HGUE-GB-48 por aumentar el porcentaje de células que se encuentran en la fase de muerte celular.

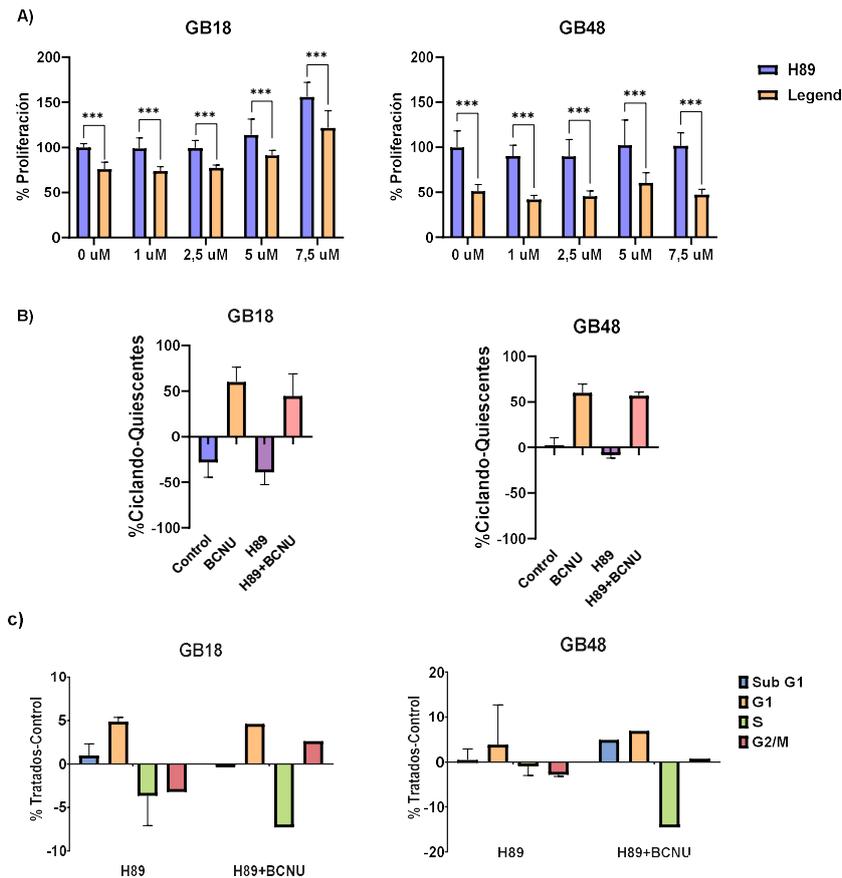


Figura 23. Representación gráfica del efecto del H89 por sí solo y en combinación con BCNU sobre la proliferación y el ciclo celular de HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48. **A)** Se representa el porcentaje de proliferación celular con respecto al control para las diferentes concentraciones de H89 utilizadas. En este ensayo los tratamientos de BCNU se han realizado a una concentración de 10 μ M. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran ciclando respecto a las quiescentes; en azul se representan las muestras no tratadas y en naranja, los tratamientos con BCNU. **C)** Representación gráfica del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución con respecto a los controles: un control sin tratar para el análisis de H89 y un control tratado con BCNU para la combinación de estos dos fármacos. Los valores positivos indican un aumento en el porcentaje de células, mientras que los valores negativos indican una disminución. Todos los datos se muestran como la media y la desviación estándar en cada línea celular. * indica un p-valor <0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

Por otro lado, el aumento del porcentaje de células en fase S tras el silenciamiento de GPR126 (**Figura 21C**) no coincide con el efecto del H89 sobre el ciclo celular de HGUE-GB-16, HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48 (**Figuras 22C y 23C**). Esto sugiere que el bloqueo del ciclo celular en la fase S producido por el silenciamiento de este gen no está mediado por el AMPc.

Objetivo 3: Determinar si existe regulación cruzada entre los genes seleccionados o con otros genes.

Finalmente, se evaluó la posibilidad de que estos genes pudieran estar regulados entre sí. Para ello, tras el silenciamiento de los genes, se realizaron análisis de expresión génica para determinar cómo variaba la expresión del resto de genes estudiados.

Como se ilustra en la **Figura 24**, el silenciamiento de PTX3 provocó un aumento significativo en la expresión de GPR126, mientras que el silenciamiento de GPR126 no tuvo impacto en la expresión de PTX3. Además, el silenciamiento de CDK5 resultó en un aumento de la expresión de PTX3, pero no se observó efecto inverso. Estos hallazgos indican una posible regulación negativa de PTX3 a GPR126 y de CDK5 a PTX3.

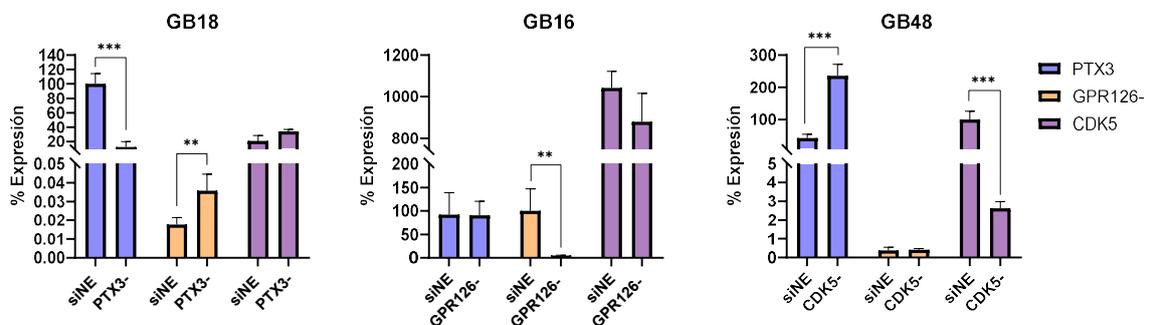


Figura 24. Análisis de expresión génica sobre las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 tras realizar los correspondientes silenciamientos. Se muestra el porcentaje de expresión de cada gen frente al siNE. Todos los datos representan la media y la DE del porcentaje de la expresión de los genes PTX3, GPR126 y CDK5 en cada línea celular. ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

A continuación, se decidió determinar si el inhibidor de CDK5 tenía el mismo efecto que el silenciamiento del gen sobre el resto de los genes estudiados. La **Figura 25** muestra las diferencias de expresión después del tratamiento con iCDK5 a 3 y 24 horas. En las dos líneas celulares utilizadas, se observa una disminución significativa de CDK5, aunque inferior a la producida por el silenciamiento. Esta disminución se asocia a una reducción de la expresión de PTX3, al contrario de lo que ocurría con el silenciamiento. En el caso de GPR126, se produjo una disminución de su expresión en HGUE-GB-16 y un aumento en HGUE-GB-48.

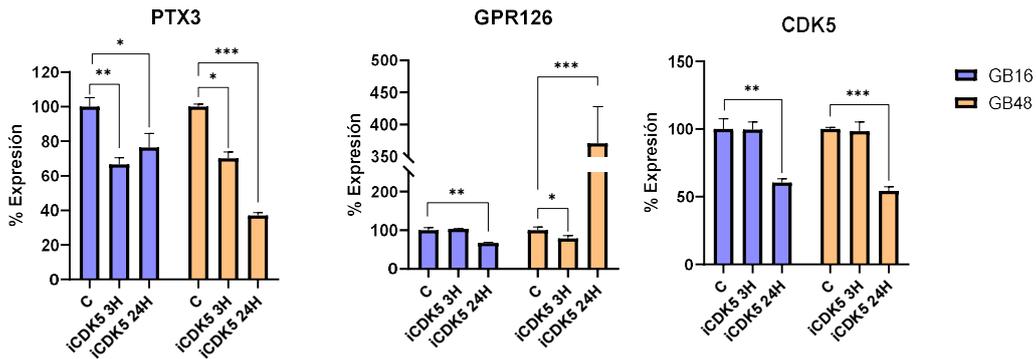


Figura 25. Análisis de expresión génica en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 para PTX3, GPR126 y CDK5 tras el tratamiento con iCDK5 a 3 y 24 horas. Se muestra la expresión de cada gen frente el control sin tratar. Todos los datos se muestran como la media y la DE del porcentaje de expresión de los genes en cada línea celular. ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

También se analizó cómo variaba la expresión de los genes tras el tratamiento con H89. En HGUE-GB-16, el inhibidor de PKA provocó una reducción significativa de aproximadamente el 50% en la expresión de PTX3 y aumentó la expresión de GPR126 y CDK5. Por otro lado, el tratamiento con H89 en las líneas celulares HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48 ocasionó un aumento en la expresión de PTX3 y una disminución en la expresión de GPR126, que sólo fue significativa en HGUE-GB-18. Además, el inhibidor no causó cambios significativos en la expresión de CDK5 (**Figura 26**).

Los genes IRF3, SOCS3 y PRMT5 están incluidos en la lista de genes que correlaciona con la supervivencia de los pacientes. La **Figura 27** muestra que no hay modulación en la expresión de IRF3 y PRMT5 tras el silenciamiento de PTX3, GPR126 y CDK5. Sin embargo, el silenciamiento de GPR126 y CDK5 redujo la expresión de SOCS3, la cual se ha relacionado con una mayor sensibilidad a la radioterapia según un artículo publicado por el grupo de investigación de oncología molecular del IDiBE (12). Esto indica que el silenciamiento de estos genes podría ocasionar aumento en la resistencia a este tratamiento.

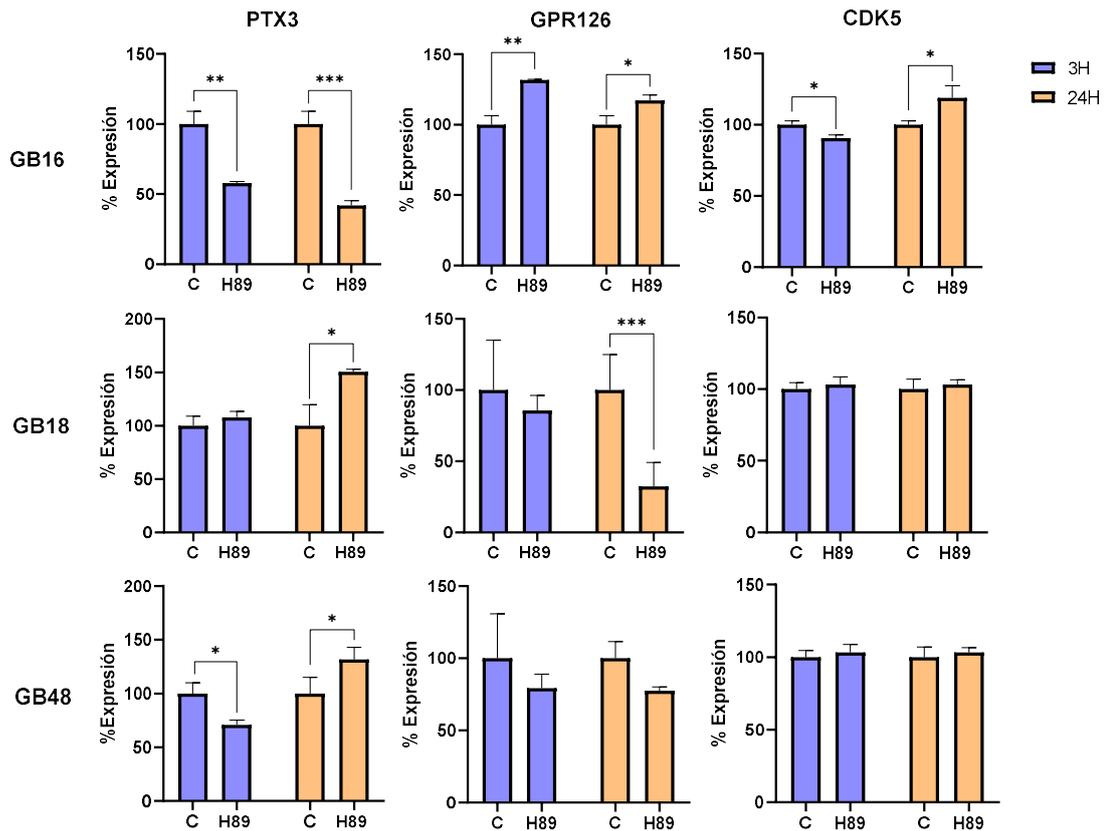


Figura 26. Análisis de expresión génica para PTX3, GPR126 y CDK5 tras el tratamiento con H89. Se muestra el porcentaje de expresión de cada gen frente al control no tratado. Todos los datos se muestran como la media y la DE del porcentaje de expresión de los genes en cada línea celular. * indica un p-valor <0,05, ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

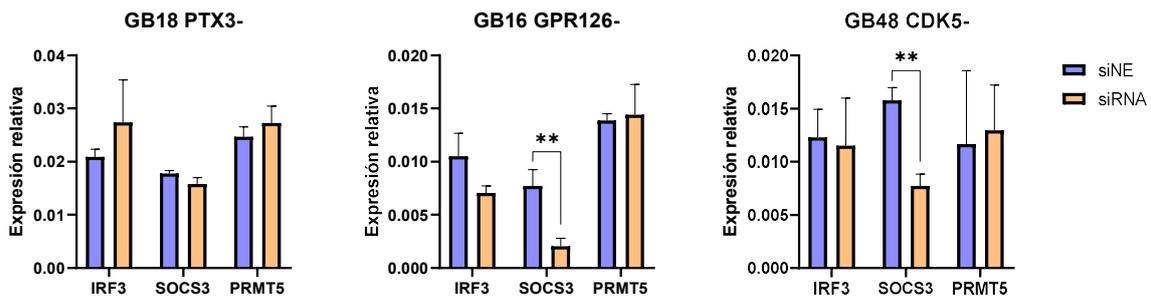


Figura 27. Análisis de expresión génica sobre las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 tras realizar los correspondientes silenciamientos. Se muestra la expresión relativa de cada gen frente al control endógeno ($2^{-\Delta Ct}$). Todos los datos representan la media y la DE de la expresión relativa de los genes PTX3, GPR126 y CDK5 en cada línea celular. ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

ELDT1, HIF1A y VEGFA son genes que se encuentran involucrados en la vascularización del tumor y en la angiogénesis. Como se muestra en la **Figura 28**, la disminución de la expresión de GPR126 está asociada a una reducción en la expresión de ELDT1, mientras que el silenciamiento de CDK5 aumentó

la expresión de HIF1A y VEGFA. Estos resultados sugieren una posible participación de GPR126 y CDK5 en procesos de angiogénesis. Además, podría existir una posible regulación entre CDK5, HIF1A y VEGFA.

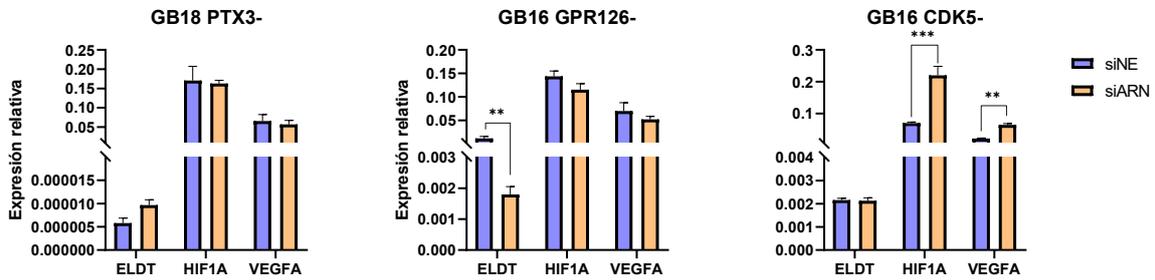


Figura 28. Análisis de expresión génica de ELDT1, HIF1A y VEGFA tras realizar los correspondientes silenciamientos. Todos los datos representan la media y la desviación estándar la expresión de los genes PTX3, GPR126 y CDK5 en cada línea celular. ** indica un p-valor <0,01 y *** indica un p-valor <0,001.

Estos resultados se han englobado en la **Figura 29**, donde se pueden observar las modificaciones compensatorias, mencionadas anteriormente, en la expresión de algunos genes relacionados con los silenciados en este trabajo.

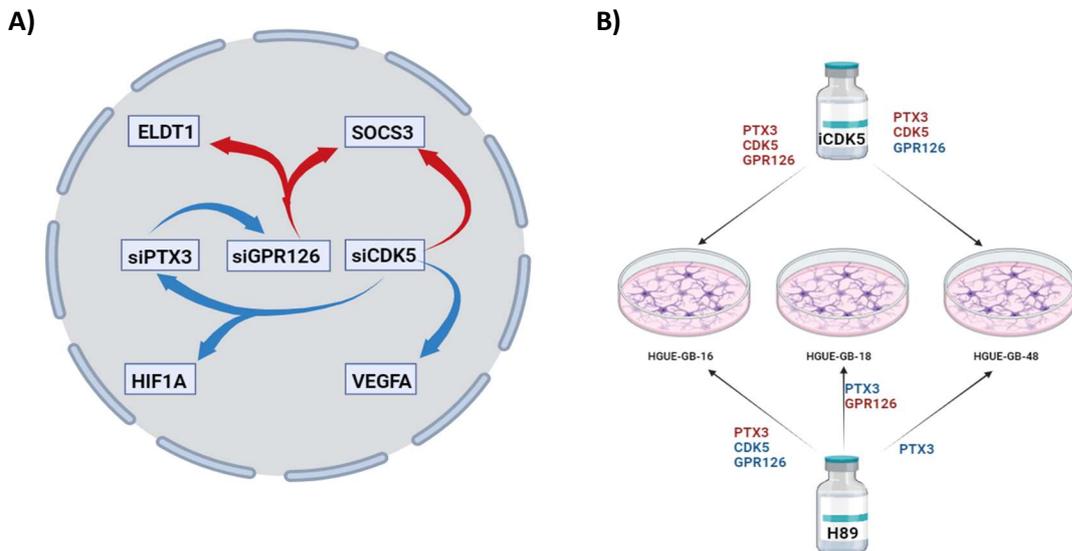


Figura 29. Esquema gráfico donde se muestran los cambios de expresión en los genes estudiados en este trabajo. A) Modificaciones en la expresión tras realizar el silenciamiento. B) Modificaciones en la expresión génica tras realizar tratamientos con H89 e iCDK5. El color azul representa un aumento y el color rojo, una disminución de la expresión génica.

6. Discusión

La falta de eficacia de los tratamientos convencionales sobre el GBM, asociada a su amplia heterogeneidad molecular, incide negativamente en la supervivencia de los pacientes (14, 49). Por ello,

la identificación de nuevas dianas terapéuticas constituye una aproximación muy útil para la mejora del diagnóstico y tratamiento del GBM. En esta dirección, se ha demostrado que el silenciamiento de algunos genes como GLI1 mejora la sensibilidad a la quimioterapia de líneas comerciales resistentes de gliomas (50).

Algunos investigadores han demostrado que existe un conjunto de genes de la familia GPCR que se expresa diferencialmente en líneas celulares de GBM frente a astrocitos y células madre fetales (29). Los datos consultados en UALCAN corroboran estas diferencias de expresión, sugiriendo una asociación entre la expresión de GPCRs y la supervivencia de los pacientes.

En el presente trabajo, se busca validar estos datos mediante muestras de pacientes con diferentes grados de gliomas difusos, incluyendo el GBM. Para ello, se realizó un estudio transcriptómico sobre una lista de 29 genes para determinar su potencialidad como dianas terapéuticas. En estos genes se han incluido algunos pertenecientes a la familia GPCR y otros estudiados previamente en el laboratorio.

Las diferencias de expresión entre las muestras de GBM y los gliomas de bajo grado indican una correlación entre el grado de malignidad y la expresión de 13 genes de la lista. Entre estos, las diferencias de expresión observadas en PTX3, SOCS3 y MMP19 destacan por su concordancia con los datos reflejados en la base de datos UALCAN (**Tabla 4 y Figura 11**). Estos hallazgos resaltan la relevancia de estos 13 genes como posibles biomarcadores para clasificar los gliomas según su agresividad, respaldando su potencial uso como dianas terapéuticas en la práctica clínica.

Al comparar la expresión de PTX3 en los pacientes de GBM frente al resto de gliomas individualmente, se observó que todos ellos tenían una menor expresión, mientras que GPR162 se expresaba más en los gliomas de bajo grado. Esto respalda la implicación de estos genes en la agresividad tumoral y sugiere su potencial como biomarcador específico del GBM (**Tabla 5 y Figura 12**). Otros autores han mostrado la ausencia de expresión de PTX3 en cerebros sanos, en contraste con su expresión en varios tipos de tumores del sistema nervioso central (SNC). Además, se ha observado que su sobreexpresión podría correlacionarse directamente con el grado de malignidad del tumor, indicando una mayor expresión en el GBM (37, 51), lo que concuerda con nuestros resultados.

En cuanto a GPR126 y CDK5, se observan diferencias significativas principalmente al comparar el GBM frente al resto de gliomas. En función de esto, GPR126 y CDK5 también podrían considerarse como potenciales biomarcadores del GBM. Además, la expresión diferencial de NKX3-1 encontrada únicamente entre los gliomas difusos de grado I y el GBM, sugiere que este gen podría ser un biomarcador útil en el diagnóstico entre el grado I y el GBM.

Análisis bioinformáticos publicados sobre el perfil de expresión génica en GBM confirman las diferencias de expresión de SOCS3, MMP19 y CDK5, entre tejidos sanos y diferentes grados de gliomas (36, 52, 53).

Aunque el grado de malignidad juega un papel crucial en la determinación del pronóstico, los resultados no han sido concluyentes respecto a la relación esperada entre la expresión génica y la supervivencia de los pacientes; esto podría deberse a las diferencias existentes entre el tipo de muestras que se comparan en UALCAN (tejido sanos y GBM) y los obtenidos tras nuestro análisis (gliomas de bajo grado y GBM). Esto señala la necesidad de estudios adicionales que consideren múltiples variables biológicas y clínicas para una comprensión más completa de los factores que influyen en la progresión y el pronóstico de los gliomas difusos (51).

En base a estos datos, se pretende silenciar la expresión de los diferentes genes y asociarlos a la progresión del GBM e investigar su implicación en los procesos que incrementan la malignidad del tumor y explorar su potencial como dianas terapéuticas. Para iniciar este estudio, los primeros análisis se han centrado en tres de estos genes: PTX3, GPR126 y CDK5.

Aunque PTX3 ha demostrado ser un biomarcador clínico útil para diferentes tipos de cáncer, como el de células pequeñas de pulmón, próstata y ovario asociado a endometriosis, sus funciones biológicas en los gliomas siguen siendo desconocidas (51). Estudios previos han revelado el efecto antiproliferativo del silenciamiento de este gen en diferentes tipos de cáncer. En cáncer cervical, se ha descrito que el silenciamiento induce una disminución de la fase S asociada a un aumento de la fase G2/M (54), un resultado similar al encontrado en la línea celular HGUE-GB-18 de GBM (**Figura 15C**). En líneas celulares de cáncer de esófago escamoso, se ha observado un aumento de la proliferación celular al silenciar PTX3 y una disminución al sobreexpresarlo (55). Además, en modelos celulares de GBM (GBM8041), se ha descrito una disminución de la proliferación celular asociada a un aumento del porcentaje de células en fase G1 (51). Sin embargo, en este trabajo, el silenciamiento de PTX3 ocasionó un aumento de la muerte celular y de G2/M (**Figura 15C**). Probablemente, estas diferencias se deban al tipo de tumor y a la heterogeneidad molecular característica de los gliomas. Este efecto de PTX3 sobre la proliferación celular del GBM puede estar relacionado con los resultados obtenidos sobre su expresión y la supervivencia de los pacientes.

Por otro lado, al añadir BCNU tras el silenciamiento de PTX3 se observó un efecto similar al obtenido únicamente con el silenciamiento (**Figura 15C**). Esto descarta la teoría de que PTX3 influya sobre la sensibilidad a la BCNU.

En otros estudios, han demostrado el papel de CDK5 en la proliferación celular del GBM. En ellos, su silenciamiento disminuyó la proliferación celular debido, mayoritariamente, a procesos de apoptosis y alteraciones en la distribución del ciclo celular (56). En los experimentos realizados en el laboratorio, el silenciamiento de CDK5 alteró el ciclo celular de la línea celular HGUE-GB-16 (resistente a la BCNU) mediante un aumento de la fase S asociado a la reducción de las fases SubG1 y G2/M, pero estos cambios no se observaron en HGUE-GB-48 (sensible a la BCNU) (**Figura 16C**). En ambos casos, la combinación del silenciamiento con el fármaco produjo un efecto protector frente a éste (**Figura 17C**).

Algunos estudios han testado la efectividad de un inhibidor de CDK5, CP681301, sobre líneas celulares, organoides y xenoinjertos de GBM, resultando en una disminución de la proliferación celular. Este inhibidor se utilizó para comparar si los efectos inducidos tras el silenciamiento del gen se producían también a nivel de proteína y para determinar la especificidad de los efectos de la inhibición de CDK5. Los efectos observados tras el tratamiento con CP-681301 fueron diferentes a los obtenidos con el silenciamiento del gen. El tratamiento con este inhibidor en la línea celular HGUE-GB-16 mostró una mayor eficacia sobre la proliferación celular que el silenciamiento de CDK5 (**Figuras 17C y 18B**). Sin embargo, su combinación con la BCNU no ocasionó ningún cambio en el efecto del fármaco, a diferencia del silenciamiento que produjo un efecto protector (**Figuras 17C y 18B**). Investigar el mecanismo de acción específico de CP-681301 ayudaría a entender por qué sus efectos difieren del silenciamiento génico, aunque probablemente estas diferencias se deban a efectos inespecíficos del inhibidor.

Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor de CDK5 en HGUE-GB-48 ocasionó un aumento de la muerte celular asociado a una reducción en el porcentaje de células de las fases S y G2/M. A diferencia de la línea celular resistente, su combinación con la BCNU causó cambios significativos sobre el ciclo celular indicando un efecto protector similar al producido por el silenciamiento (**Figura 18C**).

En función de los resultados obtenidos en este trabajo, el uso de un inhibidor de CDK5, como CP-681301, es más efectivo a nivel de proliferación celular, que el silenciamiento de CDK5 en la línea celular resistente a BCNU. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la combinación del inhibidor con BCNU en ambas líneas celulares, revelan que esta combinación no participa en la optimización del efecto del BCNU por sí solo sobre el ciclo celular (**Figuras 17 y 18**). Estos resultados apoyan el papel de CDK5 sobre la proliferación celular en el GBM.

Se conoce que CDK5 está involucrado en procesos de migración e invasión. Algunos estudios realizados en GBM, han revelado que CDK5 podría regular algunos transductores de señales, como AKT, lo que puede llevar a activar procesos de migración e invasión (57). El tratamiento con CP-681301 ocasionó

una disminución significativa de la migración celular en comparación con las células no tratadas (**Figura 19**). La capacidad de este inhibidor para reducir la migración celular demuestra la implicación de CDK5 en estos procesos y podría ser de gran utilidad en el tratamiento del GBM.

A pesar de la poca bibliografía existente sobre GPR126 en el contexto de GBM, los análisis de expresión génica diferencial revelan que puede ser una diana terapéutica interesante. Se ha demostrado que el silenciamiento de este gen en líneas celulares de cáncer colorrectal induce un bloqueo del ciclo celular en la fase G1, disminuyendo la síntesis de ADN y, por tanto, la división celular (58). Además, el silenciamiento de GPR126 en células endoteliales ocasionó cambios en el ciclo celular y disminuyó la creación de nuevos vasos sanguíneos, sugiriendo su implicación en procesos de angiogénesis (30). En los resultados de este trabajo, el silenciamiento de GPR126 causó un aumento de células en la fase S asociado a la disminución en G2/M. Sin embargo, su combinación con BCNU no indujo cambios significativos en el efecto de la BCNU (**Figura 20C**).

Varios estudios apoyan el papel central de la PKA en varias vías de señalización desencadenadas por receptores de la familia GPCR, como el GPR126. El uso de inhibidores selectivos de PKA como la isoquinolina derivativa N-[2-p-bromocinnamylamino-ethyl]-5-isoquinolinesulfonamida (H89), que actúa por competencia con el ATP, podría ser una alternativa a los tratamientos convencionales (1, 32, 59).

El tratamiento con H89 en la línea celular resistente a la BCNU, HGUE-GB-16, causó un ligero aumento del porcentaje de células muertas asociado a una disminución de la fase S, a diferencia de lo que ocurre con el silenciamiento. Además, su combinación con BCNU mostró una tendencia a potenciar del efecto de este fármaco aumentando el porcentaje de células en las fases S del ciclo celular (**Figura 21**).

En las líneas HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48, el tratamiento con H89 indujo una leve acumulación del porcentaje de células en fase G1 y, cuando se combinó con el BCNU, se potenció su efectividad causando un aumento del porcentaje de células acumuladas en la fase S (**Figura 22**). En resumen, H89 muestra un potencial como agente terapéutico al ser combinado con agentes alquilantes, en especial, en los casos donde se producen resistencias frente a éstos. Las diferencias observadas entre el efecto de este fármaco y el silenciamiento de GPR126 revelan que los efectos producidos por el silenciamiento de este gen no están mediados por AMPc. Esto lleva a la necesidad de seguir estudiando los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones del ciclo celular tras el silenciamiento de GPR126.

La inhibición de un gen tiene efectos pleiotrópicos pudiendo alterar la expresión de otros genes para alcanzar una regulación compensatoria. La regulación negativa de SOCS3 y ELDT1 tras el silenciamiento

de GPR126, así como su regulación positiva cuando se inhibe la expresión de PTX3, sugiere la participación de GPR126 y PTX3 en procesos de angiogénesis y resistencia a radioterapia. Además, el silenciamiento de CDK5 también se encuentra implicado en estos procesos al regular directamente la expresión de PTX3, HIF1A y VEGFA (**Figura 28**). Estos cambios compensatorios llevan a la necesidad de estudiar el efecto del silenciamiento combinatorio de PTX3, GPR126 y CDK5 sobre mecanismos implicados en la adquisición de resistencia a la radioterapia, la respuesta a la hipoxia, la angiogénesis y la proliferación.

Adicionalmente, los inhibidores testados en este trabajo mostraron un mayor impacto sobre la expresión de los genes. Las variaciones en la expresión de PTX3, GPR126 y CDK5 en todas las líneas celulares, muestran que estos inhibidores podrían presentar efectos inespecíficos que no son comparables a la posible regulación cruzada observada en el silenciamiento.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye:

1. El análisis transcriptómico de las muestras de pacientes de las que disponemos mostró que 13 de los 29 genes seleccionados se expresan diferencialmente entre el GBM y los gliomas de bajo grado: PTX3, SOCS3, MMP19, GPR162, GPRC5A, ADAMTS1, GRASP1, COL5A1, GPR133/ADGRD1, CDK5, F2RL2, GPRC5D y GPR126/ADGRG6.
2. PTX3 y GPR162 son los únicos de estos genes expresados diferencialmente entre el GBM y el resto de gliomas, independientemente del grado de estos, lo que los convierte en potenciales marcadores de GBM.
3. El silenciamiento de la expresión de PTX3 en la línea celular HGUE-GB-18 demostró que este gen juega un papel en la proliferación de las células de GBM, pero no afecta a la sensibilidad a BCNU de HGUE-GB-18.
4. El silenciamiento de CDK5 en las líneas HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 mostró un efecto dependiente del contexto celular. En la línea HGUE-GB-16, aumentó el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular, mientras que en la línea celular HGUE-GB-48 no se observan cambios en el ciclo celular.
5. El silenciamiento de CDK5 en las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48 produjo una protección parcial frente al tratamiento con BCNU.

6. El inhibidor de CDK5 (CP681301) aumentó el porcentaje de células ciclando en las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-48. Sin embargo, en presencia de BCNU, se observó una cierta protección de las células frente a este agente alquilante en la línea HGUE-GB-48.
7. CP681301 disminuyó drásticamente y significativamente la capacidad migratoria de todos los modelos celulares.
8. La comparación entre los efectos del silenciamiento de CDK5 y su inhibición por CP681301, mostró claramente que el inhibidor tiene blancos no específicos.
9. El silenciamiento de GPR126 produjo un aumento en fase S en la línea HGUE-GB-16. En cambio, en presencia de BCNU se observó una disminución del efecto del agente alquilante.
10. H89, un inhibidor de PKA, mostró diferentes efectos en las líneas celulares HGUE-GB-16, HGUE-GB-18 y HGUE-GB-48. Sin embargo, los niveles de cAMP no parecen ser los mediadores del efecto del silenciamiento de GPR126.
11. Existe una regulación cruzada entre la expresión de PTX3, CDK5 y GPR126 que sugiere que estos genes pueden participar en la angiogénesis, invasividad y resistencia a la radioterapia del GBM.

8. Bibliografía

1. Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9(1):32.
2. What is cancer? National Cancer Institute (NCI). 2021 [Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>].
3. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016;53(3):441-2.
4. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024.
5. Estimated number of new cases from 2022 to 2050, Both sexes, age [0-85+]. Observatory GC. 2022. [Disponible en: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2050>].
6. Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:71-95.
7. Wang LM, Englander ZK, Miller ML, Bruce JN. Malignant Glioma. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1405:1-30.
8. McNamara C, Mankad K, Thust S, Dixon L, Limback-Stanic C, D'Arco F, et al. 2021 WHO classification of tumours of the central nervous system: a review for the neuroradiologist. *Neuroradiology*. 2022;64(10):1919-50.

9. Torp SH, Solheim O, Skjulsvik AJ. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochir (Wien)*. 2022;164(9):2453-64.
10. Smolarska A, Pruszyńska I, Wasylko W, Godlewska K, Markowska M, Rybak A, et al. Targeted therapies for glioblastoma treatment. *J Physiol Pharmacol*. 2023;74(3).
11. Angom RS, Nakka NMR, Bhattacharya S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci*. 2023;13(11).
12. Ventero MP, Fuentes-Baile M, Quereda C, Perez-Valeciano E, Alenda C, Garcia-Morales P, et al. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PLoS One*. 2019;14(2).
13. Xiao ZZ, Wang ZF, Lan T, Huang WH, Zhao YH, Ma C, et al. Carmustine as a Supplementary Therapeutic Option for Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurol*. 2020;11:1036.
14. Rong L, Li N, Zhang Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):142.
15. Zou Y, Sun X, Wang Y, Yan C, Liu Y, Li J, et al. Single siRNA Nanocapsules for Effective siRNA Brain Delivery and Glioblastoma Treatment. *Adv Mater*. 2020;32(24).
16. Teng XQ, Qu J, Li GH, Zhuang HH, Qu Q. Small Interfering RNA for Gliomas Treatment: Overcoming Hurdles in Delivery. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:824299.
17. Chen Z, Hambarzumyan D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol*. 2018;9:1004.
18. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev*. 2019;80:101896.
19. Valerius AR, Webb LM, Sener U. Novel Clinical Trials and Approaches in the Management of Glioblastoma. *Curr Oncol Rep*. 2024;26(5):439-65.
20. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):101.
21. Mirzaei S, Mahabady MK, Zabolian A, Abbaspour A, Fallahzadeh P, Noori M, et al. Small interfering RNA (siRNA) to target genes and molecular pathways in glioblastoma therapy: Current status with an emphasis on delivery systems. *Life Sci*. 2021;275:119368.
22. Singh P, Singh A, Shah S, Vataliya J, Mittal A, Chitkara D. RNA Interference Nanotherapeutics for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Mol Pharm*. 2020;17(11):4040-66.
23. Birmingham TUoAa. UALCAN [Disponible en: <https://ualcan.path.uab.edu/>].
24. Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, Boriack-Sjodin PA, Wigle TJ, Johnston LD, et al. A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. *Nat Chem Biol*. 2015;11(6):432-7.

- 25.Lettau I, Hattermann K, Held-Feindt J, Brauer R, Sedlacek R, Mentlein R. Matrix metalloproteinase-19 is highly expressed in astroglial tumors and promotes invasion of glioma cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(3):215-23.
- 26.Byrne KF, Pal A, Curtin JF, Stephens JC, Kinsella GK. G-protein-coupled receptors as therapeutic targets for glioblastoma. *Drug Discov Today*. 2021;26(12):2858-70.
- 27.De Groof TWM, Mashayekhi V, Fan TS, Bergkamp ND, Sastre Torano J, van Senten JR, et al. Nanobody-Targeted Photodynamic Therapy Selectively Kills Viral GPCR-Expressing Glioblastoma Cells. *Mol Pharm*. 2019;16(7):3145-56.
- 28.Guo C, Yu C, Gao W, Ren D, Zhang Y, Zheng P. A novel classifier combining G protein-coupled receptors and the tumor microenvironment is associated with survival status in glioblastoma. *Front Pharmacol*. 2023;14:1093263.
- 29.Feve M, Saliou JM, Zeniou M, Lennon S, Carapito C, Dong J, et al. Comparative expression study of the endo-G protein coupled receptor (GPCR) repertoire in human glioblastoma cancer stem-like cells, U87-MG cells and non malignant cells of neural origin unveils new potential therapeutic targets. *PLoS One*. 2014;9(3).
- 30.Cui H, Wang Y, Huang H, Yu W, Bai M, Zhang L, et al. GPR126 protein regulates developmental and pathological angiogenesis through modulation of VEGFR2 receptor signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(50):34871-85.
- 31.Li Q, Huo A, Li M, Wang J, Yin Q, Chen L, et al. Structure, ligands, and roles of GPR126/ADGRG6 in the development and diseases. *Genes Dis*. 2024;11(1):294-305.
- 32.Bensalma S, Turpault S, Balandre AC, De Boisvilliers M, Gaillard A, Chadeneau C, et al. PKA at a Cross-Road of Signaling Pathways Involved in the Regulation of Glioblastoma Migration and Invasion by the Neuropeptides VIP and PACAP. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1).
- 33.Tabouret E, Wang H, Amin N, Jung J, Appay R, Cui J, et al. TP5, a Peptide Inhibitor of Aberrant and Hyperactive CDK5/p25: A Novel Therapeutic Approach against Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7).
- 34.Peyressatre M, Laure A, Pellerano M, Boukhaddaoui H, Soussi I, Morris MC. Fluorescent Biosensor of CDK5 Kinase Activity in Glioblastoma Cell Extracts and Living Cells. *Biotechnol J*. 2020;15(9):e1900474.
- 35.Yushan R, Wenjie C, Suning H, Yiwu D, Tengfei Z, Madushi WM, et al. Insights into the clinical value of cyclin-dependent kinase 5 in glioma: a retrospective study. *World J Surg Oncol*. 2015;13:223.
- 36.Zhou Y, Wang X, Lv P, Yu H, Jiang X. CDK5 Knockdown inhibits proliferation and induces apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Glioblastoma. *J Cancer*. 2021;12(13):3958-66.
- 37.Li D, Hao Z, Nan Y, Chen Y. Role of long pentraxin PTX3 in cancer. *Clin Exp Med*. 2023;23(8):4401-11.

38. Wesley UV, Sutton I, Clark PA, Cunningham K, Larrain C, Kuo JS, et al. Enhanced expression of pentraxin-3 in glioblastoma cells correlates with increased invasion and IL8-VEGF signaling axis. *Brain Res.* 2022;1776:147752.
39. Zhang H, Wang Y, Zhao Y, Liu T, Wang Z, Zhang N, et al. PTX3 mediates the infiltration, migration, and inflammation-resolving-polarization of macrophages in glioblastoma. *CNS Neurosci Ther.* 2022;28(11):1748-66.
40. McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D. Bioassays for anticancer activities. *Methods Mol Biol.* 2013;1055:191-205.
41. Prabst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hubner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol.* 2017;1601:1-17.
42. Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, Al-Kadash A, Gharaibeh L, Hatmal MM, et al. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol.* 2021;905:174178.
43. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(1):23-39.
44. Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raaf M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula.* Quinta ed2010.
45. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, et al. *Biología Celular y Molecular.* Quinta ed2005.
46. Rieger AM. Flow Cytometry and Cell Cycle Analysis: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2022;2579:47-57.
47. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol.* 2020;2109:225-9.
48. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:23-9.
49. Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological Research.* 2021;171:105780.
50. Guo W, Tian H, Dong X, Bai J, X. Y. Knockdown of Gli1 by small-interfering RNA enhances the effects of BCNU on the proliferation and apoptosis of glioma U251 cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015;8:11.
51. Tung JN, Ko CP, Yang SF, Cheng CW, Chen PN, Chang CY, et al. Inhibition of pentraxin 3 in glioma cells impairs proliferation and invasion in vitro and in vivo. *J Neurooncol.* 2016;129(2):201-9.
52. Stojic J, Hagemann C, Haas S, Herbold C, Kuhnel S, Gerngas S, et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas. *Neurosci Res.* 2008;60(1):40-9.
53. Yu Y, Sung SK, Lee CH, Ha M, Kang J, Kwon EJ, et al. SOCS3 is Related to Cell Proliferation in Neuronal Tissue: An Integrated Analysis of Bioinformatics and Experiments. *Front Genet.* 2021;12:743786.

54. Ying TH, Lee CH, Chiou HL, Yang SF, Lin CL, Hung CH, et al. Knockdown of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells. *Sci Rep.* 2016;6:29385.
55. Fan Z, Zheng Y, Li X, Deng X, Ba Y, Feng K, et al. Promoting role of pentraxin-3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Ther Oncolytics.* 2022;24:772-87.
56. Mukherjee S, Tucker-Burden C, Kaissi E, Newsam A, Duggireddy H, Chau M, et al. CDK5 Inhibition Resolves PKA/cAMP-Independent Activation of CREB1 Signaling in Glioma Stem Cells. *Cell Rep.* 2018;23(6):1651-64.
57. Liu R, Tian B, Gearing M, Hunter S, Ye K, Mao Z. Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(21):7570-5.
58. Cui H, Yu W, Yu M, Luo Y, Yang M, Cong R, et al. GPR126 regulates colorectal cancer cell proliferation by mediating HDAC2 and GLI2 expression. *Cancer Sci.* 2021;112(5):1798-810.
59. Lochner A, Moolman JA. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006;24(3-4):261-74.

i