



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS Miguel Hernández

Evaluación de los genes EMP3 y SLC17A7 como posibles biomarcadores en Glioblastoma

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2023 – 2024

Autora: Susana Domenech Martínez

Tutor: María del Pilar García Morales

Cotutores: Miguel Saceda Sánchez y María Fuentes Baile

Departamento y Área: Bioquímica y Biología Molecular

Índice

Abreviaturas	2
1. Resumen	3
2. Abstract	3
3. Introducción	4
3.1. Definición y relevancia del cáncer	4
3.2. Glioblastoma	6
3.3. Alteraciones genéticas en pronóstico de tumores	6
3.4. Genes a estudio	8
4. Hipótesis y objetivos	10
5. Materiales y métodos	10
5.1. Bases de datos	10
5.2. Cultivo celular	11
5.3. Reactivos químicos y tratamientos utilizados	12
5.4. Ciclo celular	12
5.5. Transfección	13
5.6. Estudio de la expresión genética	13
5.6.1. Aislamiento de ARN	14
5.6.2. Retrotranscripción (RT)	14
5.6.3. PCR cuantitativa en tiempo real	15
5.6.4. Análisis RNA - seq	15
5.6.5. Análisis estadístico	16
6. Resultados	16
6.1. Fase 1:	17
6.1.1. STRING	18
6.1.2. UALCAN	19
6.2. Fase 2:	23
7. Discusión	31
8. Conclusiones y proyección futura	34
9. Bibliografía	36

Abreviaturas

Abe	Abemaciclib
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BCNU	Carmustina
CBTTC	Consortio de Tejidos de Tumores Cerebrales Infantiles (del inglés, <i>Children's Brain Tumor Tissue Consortium</i>)
CPTAC	Consortio de Análisis Proteómico Clínico de Tumores (del inglés, <i>Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ESCA	Carcinoma de esófago
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GBM	Glioblastoma
HGUE	Hospital General Universitario de Elche
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
KICH	Carcinoma de células renales cromóforo
LIHC	Carcinoma hepatocelular de hígado
MET500	Proyecto de Cáncer Metastásico (del inglés, <i>Metastatic Cancer Project</i>)
MGMT	O6-metilguanina-ADN metiltransferasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PI	Yoduro de propidio
q-PCR	Reacción en cadena polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real
RT	Retrotranscripción
siRNA	ARN pequeño interferente (del inglés, <i>small interferent RNA</i>)
STAD	Adenocarcinoma de estómago
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer (del inglés, <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
VPF	Verteporfin

1. Resumen

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad mundial, con una proyección de 11.9 millones de casos diagnosticados para 2030. A pesar de los avances, el glioblastoma multiforme (GBM) sigue siendo uno de los tumores cerebrales más agresivos, con una supervivencia media de 12 meses. Las alteraciones genéticas son cruciales en su pronóstico, destacando las mutaciones en IDH1/2, el silenciamiento de MGMT, y la co-delección de los brazos cromosómicos 1p/19q, reconocida como un marcador de buen pronóstico en gliomas por su asociación con una mayor sensibilidad a la quimioterapia y radioterapia. El estudio de genes en estas regiones cromosómicas es de gran interés, ya que podrían influir en la agresividad de tumores cerebrales letales como los glioblastomas.

Este estudio se centra en investigar los genes EMP3 y SLC17A7, ubicados en el cromosoma 19q, para determinar su potencial como biomarcadores y dianas terapéuticas en glioblastoma. Se analizó su expresión, relación con la supervivencia de los pacientes e interacciones proteicas mediante bases de datos públicas. Además, se evaluó el efecto del silenciamiento de estos genes mediante siRNA en líneas celulares de glioblastoma y de carcinoma pancreático, investigando su impacto en la proliferación celular y la respuesta a fármacos como BCNU y gemcitabina.

Palabras clave: Glioblastoma, Co-delección 1p/19q, SLC17A7, EMP3, Carmustina (BCNU), siRNA.

2. Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, with a projected 11.9 million cases diagnosed by 2030. Despite advancements, glioblastoma multiforme (GBM) remains one of the most aggressive brain tumors, with a median survival of 12 months. Genetic alterations are crucial in its prognosis, with mutations in IDH1/2, silencing of MGMT, and the co-deletion of chromosomal arms 1p/19q, recognised as a marker of good prognosis in gliomas due to its association with increased sensitivity to chemotherapy and radiotherapy. The study of genes in these chromosomal regions is of great interest, as they could influence the aggressiveness of lethal brain tumours such as glioblastomas.

This study focuses on investigating EMP3 and SLC17A7 genes, located on chromosome 19q, to determine their potential as biomarkers and therapeutic targets in glioblastoma. Their expression, relationship with patient survival, and protein interactions were analyzed using public databases. In addition, the effect of silencing these genes by siRNA in glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines was examining, investigating their impact on cell proliferation and response to drugs such as BCNU and gemcitabine.

Keywords: Glioblastoma, 1p/19q co-deletion, SLC17A7, EMP3, Carmustine (BCNU), siRNA.

3. Introducción

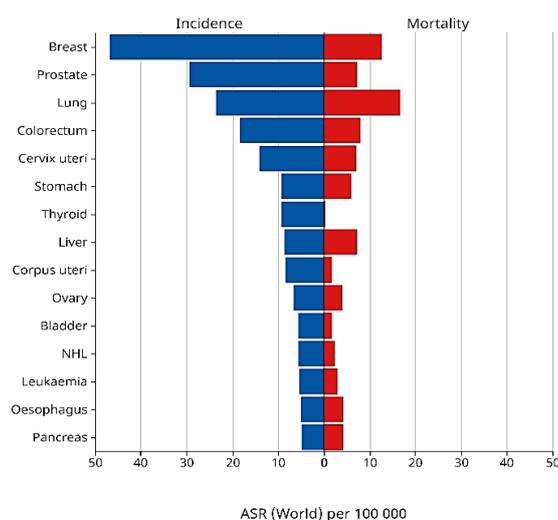
3.1. Definición y relevancia del cáncer

El cáncer es un término global utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Se caracteriza por la multiplicación anormal y la proliferación descontrolada de células que se extienden más allá de sus límites habituales, ya que pueden invadir tejidos adyacentes o diseminarse a otras partes del cuerpo, en un proceso conocido como metástasis, principal causa de muerte asociada a esta enfermedad (Lewandowska et al.,2019).

El estudio del cáncer no sólo se enfoca en el conocimiento de las causas de su origen y los mecanismos de su progresión, sino también en mejorar su diagnóstico y tratamiento. El objetivo es profundizar en el estudio de la enfermedad para desarrollar terapias más eficaces y métodos de detección más precisos, lo que, en última instancia, podría salvar más vidas y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de muerte, con 10 millones de muertes estimadas en 2020 según la Organización Mundial de la Salud (OMS). En 2022, el cáncer de mama fue el más común en cuanto a incidencia global, seguido por el cáncer de próstata y el cáncer de pulmón. Sin embargo, en términos de mortalidad, el cáncer de pulmón fue el responsable del mayor número de muertes. La **Figura 1** ilustra la tasa de incidencia y mortalidad para los 15 tipos de cáncer más frecuentes en ambos sexos a nivel mundial.

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence and Mortality, Both sexes, in 2022
Continents
(Top 15 cancer sites)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2024

ASR (World) per 100 000

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Figura 1. Estimación del porcentaje de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) global para ambos sexos en 2022.

Fuente: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024
(https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?types=0_1&mode=cancer&group_populations=1&sort_by=value1).

Los tumores cerebrales constituyen un tipo particular de cáncer que presenta una diversidad de características, desde benignas hasta extremadamente malignas, lo que influye directamente en las opciones de tratamiento y pronóstico. Estos tumores se clasifican según criterios histopatológicos, inmunohistoquímicos y, cada vez más, genéticos y moleculares. Entre ellos, destaca por su alta malignidad el glioblastoma multiforme (GBM), clasificado como tumor de grado IV por la OMS. En comparación con otros tipos de tumores cerebrales, el GBM presenta diferencias significativas en los enfoques clínicos y las expectativas de tratamiento (National Brain Tumor Society, 2022).

Aunque relativamente poco comunes, los tumores cerebrales primarios que incluyen tanto glioblastomas como otros tipos de gliomas y tumores no malignos representan, en adultos un gran desafío en su diagnóstico y tratamiento. Su impacto es significativo, con una incidencia anual de 6,4 casos por cada 100.000 personas y una tasa de supervivencia a cinco años del 33,4%. Suelen manifestarse entre los 55 y 64 años (Perkins & Liu, 2016). Si bien muchos factores ambientales investigados no han demostrado aumentar el riesgo, ciertos síndromes genéticos y la exposición a dosis altas de radiación ionizante son factores de riesgo identificados para estos tumores (Perkins & Liu, 2016).

La OMS ha clasificado los tumores cerebrales primarios basándose en criterios histopatológicos e inmunohistoquímicos, asignando además un grado de malignidad a cada uno de ellos (OMS, 2022). Recientemente, se han incluido características moleculares en este sistema de clasificación, lo que ha mejorado la precisión diagnóstica, permitiendo el desarrollo de métodos de tratamiento más personalizados (Wang et al., 2023).

La diversidad de métodos para clasificar y tratar tumores cerebrales refleja la complejidad de estos cánceres y subraya la importancia de una comprensión profunda de su biología molecular. Por ejemplo, aproximadamente el 15% de todos los tumores cerebrales primarios son glioblastomas, conocidos por su alta malignidad y resistencia a las terapias convencionales. Sin embargo, el 50% de todos los tumores cerebrales primarios son tumores no malignos, como meningiomas y tumores de la glándula pituitaria. Estas estadísticas subrayan la variedad de tumores cerebrales y la variabilidad en los resultados y respuestas al tratamiento (Ostrom et al., 2014).

Para comprender y tratar los tumores cerebrales, la investigación continua es esencial. Es crucial que los clínicos y los investigadores colaboren para convertir los avances en mejores resultados para los pacientes, a medida que se descubren nuevos biomarcadores y se desarrollan nuevas terapias. La literatura científica actual y los estudios en curso proporcionan una base fundamental para la innovación y el progreso hacia el objetivo de mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con tumores cerebrales (Stupp et al., 2005).

3.2. Glioblastoma

El glioblastoma, también denominado glioblastoma multiforme, es un tumor cerebral primario que se distingue por su alta agresividad, malignidad e invasividad, siendo clasificado como un tumor de grado IV según la clasificación de la OMS. Este tipo de tumor representa aproximadamente el 57% de todos los gliomas y su incidencia varía entre 0,59 y 5 casos por cada 100.000 personas, observándose un incremento notable en varios países (Grech et al., 2020). El pronóstico asociado al glioblastoma es extremadamente desfavorable, reflejado en una tasa de supervivencia que alcanza solo el 37,2% al primer año y un escaso 5,1% a los cinco años (Sun et al., 2014).

Este tumor puede manifestarse en cualquier etapa de la vida; no obstante, su incidencia es aumenta después de los 54 años y alcanza un pico de 15,24 casos por 100.000 personas entre las edades de 75 y 84 años (Alexander & Cloughesy, 2017 ; Wirsching et al., 2016). Los factores de riesgo para su desarrollo, aparte de la edad, están pobremente definidos. Sin embargo, se ha observado que los hombres son ligeramente más afectados que las mujeres, con una proporción de 1.6:1 (Weller et al., 2015a; Ostrom et al., 2014). Entre los mecanismos moleculares asociados con la progresión del glioblastoma, se encuentran las alteraciones en la señalización de la proteína del retinoblastoma (RB) y la disfunción del supresor tumoral p53, que contribuyen significativamente a la malignidad y resistencia al tratamiento (Wirsching et al., 2016).

Uno de los principales desafíos en el tratamiento del GBM es su notable resistencia a las terapias convencionales. Esta resistencia se debe, en gran medida, a la heterogeneidad intratumoral a nivel celular y molecular, lo que permite a las células tumorales adaptarse y sobrevivir a los tratamientos estándar. El glioblastoma se caracteriza también por una elevada tasa de proliferación celular y una notable capacidad invasiva en el tejido cerebral circundante, complicando su resección quirúrgica completa y exacerbando su pronóstico adverso.

Estudios recientes han destacado que la complejidad genética y molecular del glioblastoma es un factor clave en su comportamiento agresivo, subrayando la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar los resultados clínicos en pacientes con GBM (Gavini et al., 2019).

3.3. Alteraciones genéticas en pronóstico de tumores

Las alteraciones genéticas desempeñan un papel crucial en el pronóstico de los tumores cerebrales, ya que proporcionan información valiosa sobre el comportamiento del tumor y su posible respuesta a diferentes tratamientos.

Entre las alteraciones más relevantes y comúnmente utilizadas para el pronóstico se encuentran las mutaciones en los genes de la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1/2), el silenciamiento epigenético de la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), y la co-delección de los brazos cromosómicos 1p/19q.

- **Mutaciones IDH1/2**

Las mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 han sido identificadas como un marcador pronóstico favorable en gliomas, diferenciándolos claramente de aquellos que carecen de tales alteraciones. Estas mutaciones son comúnmente halladas en gliomas de bajo grado y, cuando están presentes en gliomas de alto grado, suelen indicar una progresión desde una etapa menos agresiva. Este hallazgo sugiere que dichos gliomas han evolucionado a partir de un tumor inicialmente de bajo grado (Hanif et al., 2017).

La relación de las mutaciones en IDH con un mejor pronóstico para los pacientes se atribuye en parte a su conexión con el fenotipo G-CIMP (Glioma-CpG Island Methylator Phenotype). Este fenotipo se caracteriza por un patrón de metilación del ADN que altera la regulación genética y el comportamiento tumoral, lo que lleva a un pronóstico más favorable. Las mutaciones en IDH provocan la acumulación de un metabolito que interfiere con los procesos de desmetilación del ADN y las histonas, bloqueando así la diferenciación celular y contribuyendo a la formación del fenotipo G-CIMP (Hanif et al., 2017).

- **Silenciamiento de MGMT**

El silenciamiento epigenético del gen MGMT mediante la metilación de su promotor se ha identificado como un factor determinante en la respuesta a la quimioterapia con agentes alquilantes, como la temozolomida, en pacientes con glioblastoma (Hegi et al., 2005). Esta metilación al inhibir la expresión del enzima MGMT, reduce la capacidad de las células tumorales para reparar el daño en el ADN, lo que las hace más vulnerables a los efectos citotóxicos en quimioterapia. Además, la metilación del promotor de MGMT se ha asociado con una mejor respuesta al tratamiento y un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes, subrayando su importancia como marcador pronóstico (Grech et al., 2020).

- **Co-delección brazos cromosómicos 1p/19q**

Una de las alteraciones genéticas más relevantes en los gliomas es la co-delección de los brazos cromosómicos 1p y 19q, reconocida como un marcador de buen pronóstico en gliomas, especialmente en los oligodendrogliomas. Esta co-delección se asocia con una mayor sensibilidad a la quimioterapia y

la radioterapia, lo que resulta en un pronóstico significativamente mejor en comparación con los tumores que no presentan esta alteración (Ostrom et al., 2015).

El estudio de la co-delección 1p/19q no debe limitarse únicamente a su influencia en la respuesta a los tratamientos, sino que también reside en la identificación de genes específicos dentro de las regiones cromosómicas afectadas, que podrían desempeñar un papel en la agresividad del tumor. Por ejemplo, recientes investigaciones han permitido mapear transcritos clave en la región del brazo largo del cromosoma 19q, subrayando la necesidad de continuar con estudios que ayuden a identificar genes implicados en la progresión de los gliomas (Smith et al., 2000).

En este trabajo, se investigan específicamente los genes ubicados en el cromosoma 19q, identificados como posibles candidatos clave en estudios realizados previamente (Gladitz et al., 2018). Estos genes son SLC17A7, EMP3, KLK6 y SEPW1, los cuales han mostrado ser de gran interés debido a su posible implicación en la biología de los gliomas, y serán objeto de un análisis detallado en esta investigación. La exploración de estos genes podría proporcionar nuevas perspectivas sobre su papel en la malignidad del glioblastoma y abrir oportunidades para el desarrollo de terapias dirigidas que mejoren el manejo clínico de esta enfermedad.

3.4. Genes a estudio

Tras la identificación de estos genes mediante una búsqueda bibliográfica, se procedió a analizar cada uno de ellos en detalle:

- **EMP3:**

EMP3 (Epithelial Membrane Protein 3) es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q) que codifica una proteína de membrana, con cuatro dominios transmembrana que está involucrada en diversas funciones celulares. Se ha identificado a EMP3 como un gen con un impacto significativo en la biología de los gliomas, particularmente en glioblastomas, donde su expresión se ha correlacionado con características agresivas del tumor (Martija & Pusch, 2021).

Este gen ha sido asociado con la invasividad tumoral y la infiltración de macrófagos en gliomas, factores que contribuyen a la progresión de la enfermedad. Existen estudios que han demostrado que EMP3 podría desempeñar un papel crucial en la regulación de varios receptores de membrana oncogénicos, afectando vías de señalización clave que promueven la proliferación y supervivencia celular en gliomas (Martija & Pusch, 2021).

- **SLC17A7:**

SLC17A7 (Solute Carrier Family 17 Member 7) es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q) que codifica un transportador de fosfato dependiente de sodio asociado a vesículas y se expresa específicamente en regiones ricas en neuronas del cerebro. Esta proteína se asocia preferentemente con las membranas de las vesículas sinápticas y desempeña un papel crucial en el transporte de glutamato, lo que es esencial para el funcionamiento de la sinapsis glutamatérgica (NCBI, 2023)

SLC17A7 ha sido identificado como un gen crucial en la regulación de vías metabólicas en glioblastomas, con una potencial función como supresor tumoral. Estudios previos han demostrado que este gen está fuertemente subexpresado en estos tumores en comparación con el tejido cerebral normal, lo que se asocia con un comportamiento tumoral más agresivo (Lin et al., 2015). Debido a estas características, SLC17A7 ha sido propuesto como un candidato prometedor para investigaciones adicionales enfocadas en el desarrollo de terapias específicas (Gladitz et al., 2018).

- **KLK6:**

KLK6 (Kallikrein-related peptidase 6) es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q) que codifica una serina-proteasa. Esta enzima ha mostrado una fuerte subexpresión en oligodendrogliomas en comparación con el tejido cerebral normal. Sin embargo, en glioblastomas, se ha observado que altos niveles de expresión de KLK6 se asocian con un pronóstico desfavorable y una mayor resistencia a agentes citotóxicos (Gladitz et al., 2018). KLK6 participa además en la formación de metástasis en cáncer de colon, lo que indica su posible implicación en la progresión tumoral (Bouزيد et al., 2022).

- **SEPW1:**

SEPW1 (Selenoprotein W, 1) es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q) que codifica una selenoproteína con función antioxidante específica para el glutatión. Esta selenoproteína está implicada en la regulación del ciclo celular y juega un papel importante en la activación y degradación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un proceso clave en la proliferación celular en gliomas (Alkan, Duong, & Hawkes, 2015). Estudios previos han demostrado que SEPW1 está subexpresado en oligodendrogliomas en comparación con el tejido cerebral normal, y ha sido mapeado en una región del brazo 19q identificada como supresora de tumores en gliomas, lo que sugiere su posible función como supresor tumoral (Gladitz et al., 2018).

4. Hipótesis y objetivos

Partiendo de la localización de los genes SLC17A7, EMP3, KLK6 y SEPW1 en el brazo largo del cromosoma 19q, y basándonos en la evidencia bibliográfica y experimental existente, se plantea la hipótesis de que, si la pérdida de expresión de estos genes por la delección en 19q está asociada a un pronóstico más favorable en gliomas de bajo grado, la expresión de todos o alguno de estos genes podría desempeñar un papel crucial en el desarrollo y la progresión del glioblastoma. Las alteraciones en la expresión de estos genes tienen un impacto significativo en la agresividad de los gliomas de bajo grado y en su respuesta a los tratamientos, por lo que podrían constituirse en posibles biomarcadores y en dianas terapéuticas para la mejora del tratamiento de glioblastoma.

El objetivo principal del proyecto es la búsqueda de biomarcadores y/o nuevas dianas terapéuticas para el glioblastoma basados en la co-delección 1p/19q, que se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la expresión y las interacciones moleculares de los genes SLC17A7, EMP3, KLK6 y SEPW1 en glioblastoma multiforme mediante el uso combinado de las bases de datos públicas.
2. Determinar si existe expresión diferencial de estos cuatro genes en función del grado de los gliomas y en comparación con glioblastoma, mediante el análisis bioinformático en una muestra disponible de 142 gliomas y glioblastomas, obtenidos en colaboración con el Dr. Luis Miguel Valor, investigador de ISABIAL.
3. Seleccionar los dos genes más relevantes entre SLC17A7, EMP3, KLK6 y SEPW1 a partir de los resultados obtenidos en fases anteriores.
4. Investigar el impacto de la inhibición de los genes seleccionados en la viabilidad y proliferación celular en líneas celulares de glioblastoma, utilizando técnicas de transfección de siRNA y ensayos de viabilidad celular, con el objetivo de comprender mejor su papel funcional.

5. Materiales y métodos

5.1. Bases de datos

A continuación, se describen las bases de datos utilizadas para la identificación y selección de genes candidatos en este estudio.

STRING es una base de datos que reúne información sobre cómo interactúan las proteínas, considerando tanto interacciones ya establecidas como aquellas que se predicen. Estas interacciones pueden ser físicas, es decir, cuando las proteínas están en contacto directo, o funcionales, donde las

proteínas participan en procesos comunes sin contacto físico directo. La información en STRING proviene de diversas fuentes, como predicciones basadas en el contexto genético, resultados de experimentos a gran escala, análisis de coexpresión genética, minería de textos científicos y otras bases de datos. Esta herramienta tiene una cobertura de más de 59 millones de proteínas de 12.535 organismos, por lo que permite entender las conexiones y funciones de las proteínas. (Szkarczyk et al., 2023). Enlace página web: <https://string-db.org/>.

UALCAN es una plataforma web integral para el análisis de datos de OMICS relacionados con el cáncer. Esta herramienta permite un acceso sencillo a datos públicos de proyectos como TCGA (The Cancer Genome Atlas), MET500 (Metastatic Cancer Project), CPTAC (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium) y CBTTCC (Children's Brain Tumor Tissue Consortium), lo que facilita la identificación de biomarcadores y la validación in silico de posibles genes de interés. UALCAN también ofrece gráficos y visualizaciones sobre el perfil de expresión y la supervivencia de pacientes, así como la regulación epigenética de la expresión génica. Ofrece además información detallada sobre genes específicos, incluyendo enlaces a recursos como GeneCards y PubMed (Chandrashekar et al., 2022). Enlace página web: <https://ualcan.path.uab.edu/index.html>.

5.2. Cultivo celular

Para llevar a cabo esta investigación, se emplearon varias líneas celulares provenientes de tres tipos diferentes de tumores. Se utilizaron fundamentalmente líneas celulares establecidas de cultivos primarios de glioblastoma multiforme humano, generadas a partir de muestras obtenidas mediante lavados quirúrgicos de pacientes del Hospital General Universitario de Elche, España (HGUE). Las líneas celulares fueron: HGUE-GB-16, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40 y HGUE-GB-42. Por otro lado, se han utilizaron líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino humano: RWP1, M220 y Hs766T y líneas celulares de adenocarcinoma de colon: SW-480, HT-29 y SW-620.

Las líneas celulares de glioblastoma se mantuvieron en un medio DMEM-F12 (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*, por sus siglas en inglés) con mezcla de nutrientes F12 (Biowest, MO, EE.UU.). Las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas y colon se mantuvieron en medio DMEM con glucosa alta (Biowest, MO, EE.UU.). Tanto el medio DMEM-F12 como el medio DMEM fueron suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Biowest, MO, EE.UU.) y 1% (v/v) de una mezcla de penicilina y estreptomina (Biowest, MO, EE.UU.) a 37°C y 5% de CO₂.

Las líneas celulares utilizadas se sostuvieron mediante pases sucesivos para llevar a cabo los ensayos necesarios. El procedimiento comienza con la retirada del medio de cultivo, seguida de la adición de 1.5 mL de Tripsina-EDTA al 0.01% (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Alemania)

para facilitar el desprendimiento de las células adheridas a la superficie del frasco. Tras incubarlas con la solución de Tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, las células comienzan a desprenderse, adoptando una forma redondeada. Posteriormente, se agita suavemente el recipiente para asegurar que todas las células se despeguen por completo. El contenido del frasco se centrifuga y el sedimento celular obtenido se resuspende ajustando la concentración a un rango de 200.000 a 300.000 células por mililitro. Finalmente, se transfiere 1 mL de esta suspensión celular a un nuevo frasco con 4 mL de medio fresco para continuar el cultivo.

5.3. Reactivos químicos y tratamientos utilizados

Los reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich (MO, EEUU) y son:

- **Verteporfin (VPF):** Utilizado por su capacidad para inhibir la vía Hippo-YAP, reduciendo la proliferación de células tumorales y promoviendo la apoptosis en glioblastoma. Además, inhibe la autofagia, aumentando la eficacia del tratamiento. Se utilizó a una concentración de 0.5 - 2.7 μ M.
- **Abemaciclib (Abe):** Inhibe las cinasas CDK4/6, deteniendo el ciclo celular en fase G1 y reduciendo la proliferación de células de glioblastoma. Se utilizó a una concentración 10 μ M.
- **BCNU (Carmustina):** Fármaco alquilante que induce entrecruzamientos en el ADN, impidiendo su replicación y transcripción. Se utilizó a una concentración de 25 μ M.
- **Gemcitabina:** Es un inhibidor de la síntesis de ADN. Se utilizó a una concentración de 2.5 μ M.

5.4. Ciclo celular

Para evaluar la distribución de las células en las fases del ciclo celular, se utilizó citometría de flujo con yoduro de propidio (PI) como agente marcador intercalante. Este fluoróforo, tiene un pico de excitación a 535 nm (azul / verde) y su máximo de emisión se produce a 617 nm (rojo), lo que permite cuantificar la cantidad de ADN en las células, proporcionando información sobre la fase del ciclo celular en que se encuentra cada célula del cultivo.

Para la preparación de las muestras, se sembraron las líneas celulares necesarias en cada experimento en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000 a 350.000 células por pocillo. Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se aplicaron los tratamientos correspondientes. Más tarde, las células se recolectaron mediante tripsinización y se fijaron en etanol al 70% a -20°C durante al menos 30 minutos.

Las células fijadas se centrifugaron y se resuspendieron en una solución de PBS con 25 µg/mL de yoduro de propidio, 25 µg/mL de ARNasa y Triton X-100 al 0.5%. Las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de ser analizadas en un citómetro de flujo BD FACSCanto™ II. Finalmente, este equipo midió la fluorescencia emitida, permitiendo identificar las células en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular, así como las células apoptóticas en fase subG1.

5.5. Transfección

Para modificar la expresión de los genes EMP3 y SLC17A7, localizados en el cromosoma 19, se realizó una transfección en líneas celulares utilizando siRNA específico para cada uno de estos genes. Este proceso permite silenciar la expresión del gen diana mediante la introducción de ARN de interferencia en las células.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000 células por pocillo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo con antibiótico y se sustituyó por medio sin antibiótico para evitar interferencias durante la transfección.

La transfección se llevó a cabo utilizando el reactivo Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen), que facilitó la entrada del siRNA específico para EMP3 y SLC17A7, así como del siRNA inespecífico utilizado como control. Se preparó una mezcla de siRNA y Opti-MEM (Gibco), con un volumen final de 250 µL por muestra, y en paralelo se preparó una solución de Lipofectamina también en Opti-MEM. Ambas soluciones se dejaron reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se combinó la mezcla de siRNA con la de Lipofectamina, permitiendo que los complejos de siRNA-Lipofectamina se formaran durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la formación de los complejos, se añadió la mezcla de transfección (siRNA + Lipofectamina) en un volumen de 500 µL por pocillo. Las células se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura y CO₂ durante 24 a 48 horas, tiempo durante el cual se permitió que el siRNA ejerciera su efecto de silenciamiento sobre el gen diana.

Finalmente, se procedió a cambiar el medio de cultivo, con antibiótico, y las células quedaron listas para someterse a análisis posteriores que evaluaron el impacto del silenciamiento del gen en la respuesta celular.

5.6. Estudio de la expresión genética

Para evaluar cómo varían los niveles de expresión de ciertos genes diana tras el tratamiento de las células con inhibidores químicos o siRNA, es necesario en primer lugar, recolectar las células tratadas,

lisarlas y extraer su ARN. Posteriormente, se cuantifica el ARN aislado, se realiza la retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) y, finalmente, se lleva a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando una sonda fluorescente específica para medir la expresión del gen en cuestión.

5.6.1. Aislamiento de ARN

El ARN fue extraído utilizando el kit NZY Total RNA Isolation kit (NZYTech, Lisbon, Portugal), siguiendo los protocolos establecidos por el fabricante. Para iniciar el proceso, se realizó la lisis celular añadiendo 350 μ L de tampón de lisis NR, el cual contenía β -mercaptoetanol diluido 1:100 para neutralizar las ribonucleasas liberadas que podrían degradar el ARN.

Tras la lisis celular, las muestras se transfirieron a columnas de homogenización NZYSpin y se centrifugaron. A cada sobrenadante se le añadió 350 μ L de etanol al 70%, y estas mezclas fueron transferidas a columnas de unión NZYSpin para una nueva centrifugación. En este paso, se conservó la columna con la muestra retenida y se descartó el eluido. Posteriormente, se añadieron 350 μ L de tampón NI y, tras otra centrifugación, se descartó el sobrenadante y se conservó la columna. Se procedió a la adición de 95 μ L de ADNasa I disuelta en tampón de digestión en una proporción de 1:10, incubando la muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la digestión, se realizaron tres lavados sucesivos utilizando 200 μ L de NWR1, 600 μ L de NWR2 y 250 μ L adicionales de NWR2.

Finalmente, se eluyó el ARN utilizando 40 μ L de agua libre de ARNasas y se procedió a cuantificar el ARN obtenido con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

5.6.2. Retrotranscripción (RT)

Tras obtener el ARN, se cuantificó y se retrotranscribió a ADNc para poder realizar la PCR cuantitativa posterior. La cuantificación del ARN mensajero se llevó a cabo con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), obteniendo valores de concentración en ng/ μ L, índice de pureza 260/280, que debe estar entre 1.8 y 2.2 y una gráfica donde el pico máximo debe situarse en 260 nm. Un pico adicional cerca de 230 nm podría indicar contaminación con ADN, mientras que un pico cercano a 280 nm sugeriría la presencia de proteínas.

Con la cantidad de ARN mensajero determinada, se calculó el volumen necesario para obtener una concentración final de 1 μ g. Este volumen se retrotranscribió a ADNc usando el kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones del fabricante. Fue crucial mantener tanto las muestras de ARN como los reactivos del kit en frío para preservar su estabilidad.

Las muestras se procesaron en un termociclador G-STORM, siguiendo un ciclo de retrotranscripción de cuatro etapas: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos y finalmente 4°C de manera indefinida para conservación. Tras completar el ciclo, el ADNc obtenido se almacenó a -20°C para su uso posterior.

5.6.3.PCR cuantitativa en tiempo real

Para medir los niveles de expresión de los genes EMP3, SLC17A7 y GAPDH se realizó una amplificación de ADNc mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). En este proceso, se utilizaron sondas TaqMan específicas para EMP3 y SLC17A7 junto con el reactivo de mezcla NZYSpeedy qPCR Probe Máster Mix (NZYtech, Lisbon, Portugal). Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, analizando cada muestra por triplicado para asegurar la precisión de los resultados. Como control interno para normalizar la expresión, se utilizó una sonda dirigida al gen GAPDH, que actúa como referencia. Además, se incluyó un control negativo (NTP), en el cual se utilizó agua libre de nucleasas en lugar de ADNc, para asegurar la ausencia de contaminación.

La qPCR se realizó en un equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), bajo las siguientes condiciones: activación de la Uracil-N-Glicosilasa (UNG) a 50°C durante 2 minutos para eliminar posibles contaminaciones, seguida de la activación de la polimerasa y la inactivación de UNG a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 40 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una etapa de hibridación y extensión a 60°C durante 1 minuto.

5.6.4.Análisis RNA - seq

La secuenciación del ARN (RNA-seq) es una técnica de secuenciación que nos permite estudiar la cantidad de ARN asociada a transcritos de distintos genes. Para realizar el RNA-seq se analizó el ARN de 142 muestras de pacientes con gliomas de distintos grados; el tratamiento y secuenciación de las muestras fue realizado en el Hospital General Universitario de Alicante, por el grupo de investigación del Dr. Luis Miguel Valor. Para la secuenciación se utilizó el secuenciador NextSeq550 (Illumina Inc, San Diego, California, Estados Unidos).

Se procedió a la correlación entre los datos obtenidos del RNA-seq de las muestras de los pacientes y los cuatro genes de interés de nuestro laboratorio EMP3, SLC17A7, SEPW1 y KLK6, para el estudio comparativo de la expresión génica entre los diferentes grados de malignidad.

Los análisis de expresión génica diferencial 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.

5.6.5. Análisis estadístico

El análisis de la qPCR proporciona un valor Ct (del inglés, *cycle threshold*) para cada muestra, que indica el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere un umbral establecido por el propio equipo. Así, el valor de Ct es inversamente proporcional a la expresión del gen diana. Para normalizar el resultado, se restó el Ct obtenido para el gen estudiado menos el Ct obtenido con el control endógeno, lo que se conoce como el valor ΔCt y, la expresión relativa se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Para analizar los datos obtenidos, se utilizó el software GraphPad Prism v8.0.1. Las diferencias significativas entre las muestras fueron evaluadas mediante el cálculo del valor estadístico T de Student para datos paramétricos con varianzas homogéneas, y la prueba U de Mann-Whitney para aquellos datos no paramétricos que presentan una distribución asimétrica.

6. Resultados

Para identificar genes relevantes en la co-delección 1p/19q, nuestro estudio se inició analizando el trabajo previo de otros autores (Gladitz et al., 2018).

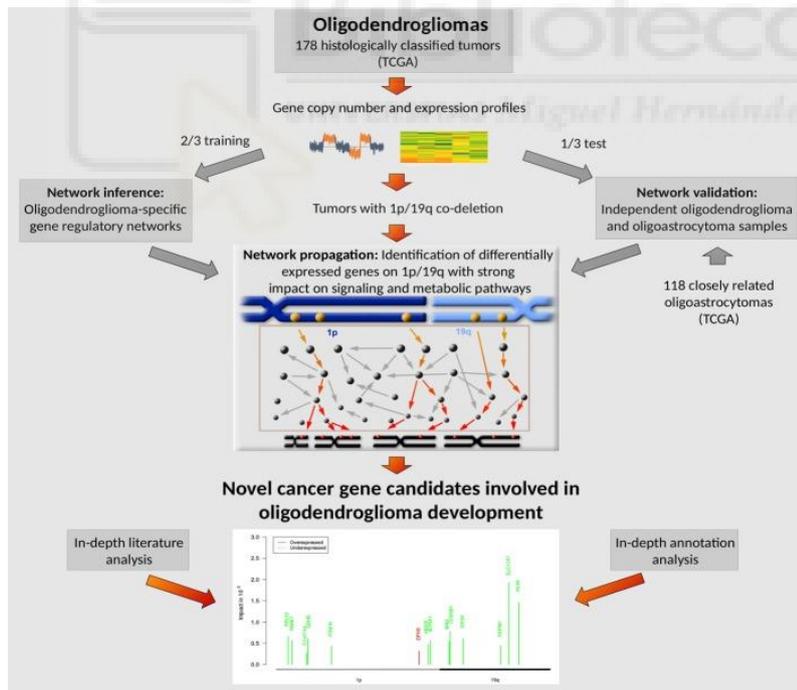


Figura 2. Gladitz, J., Klink, B., & Seifert, M. (2018). "Network-based analysis of oligodendrogliomas predicts novel cancer gene candidates within the region of the 1p/19q co-deletion". *Acta Neuropathologica Communications*. (<https://doi.org/10.1186/s40478-018-0544-y>).

Como se ilustra en la **Figura 2**, este estudio incluye datos de 178 oligodendrogliomas del TCGA, donde se comparan los perfiles de expresión génica y los números de copias de cada gen entre tumores con y sin la co-delección 1p/19q.

En este artículo se llevó a cabo un estudio exhaustivo de los circuitos de regulación de la señalización y el metabolismo, que son especialmente relevantes en los oligodendrogliomas. A partir de este análisis, se seleccionaron aquellos genes presentes en la región 1p/19q que mostraban una mayor relevancia para el funcionamiento de estos circuitos regulatorios.

Paralelamente, la validez de estos genes se evaluó en un conjunto independiente de muestras de oligodendrogliomas y en 118 muestras de oligoastrocitomas, confirmando la expresión desregulada de los genes seleccionados mediante el estudio de los mencionados circuitos regulatorios de señalización y metabolismo. Como resultado de este análisis, se generó una lista de genes en la región 1p/19q con potencial implicación en el desarrollo de oligodendrogliomas. Nuestro estudio parte de dicha lista de genes, enfocándonos en los genes ubicados en el cromosoma 19q.

Los genes que seleccionamos inicialmente para el estudio fueron EMP3, SLC17A7, KLK6 y SEPW1, debido a su importancia en diversas vías biológicas que podrían influir en la malignidad y la respuesta a tratamientos en gliomas de bajo grado. El análisis detallado de estos genes en nuestra investigación tiene como objetivo explorar su potencial como biomarcadores y su posible impacto en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glioblastoma.

Este trabajo final de grado se ha desarrollado en dos fases claramente diferenciadas:

- ✚ **Fase 1.** Centrada en la búsqueda de información sobre los cuatro genes de interés en las diferentes bases de datos, con el objetivo de seleccionar uno o dos de ellos para su estudio en la fase experimental del TFG.
- ✚ **Fase 2.** Estudio experimental centrado en evaluar el efecto sobre diversas propiedades biológicas de las células de glioblastoma producidas en respuesta a la eliminación selectiva de la expresión de estos genes mediante siRNAs.

6.1. Fase 1:

En esta fase, se llevó a cabo un análisis exhaustivo de los genes EMP3, SLC17A7, KLK6 y SEPW1, utilizando las bases de datos STRING y UALCAN.

A lo largo de este apartado se presentarán los resultados obtenidos, proporcionando una visión integral de la expresión y función de estos genes en el contexto del glioblastoma.

6.1.1.STRING

En la **Figura 3**, se presenta el análisis de los genes EMP3, SLC17A7, KLK6 y SEPW1 utilizando los resultados obtenidos de la base de datos STRING:

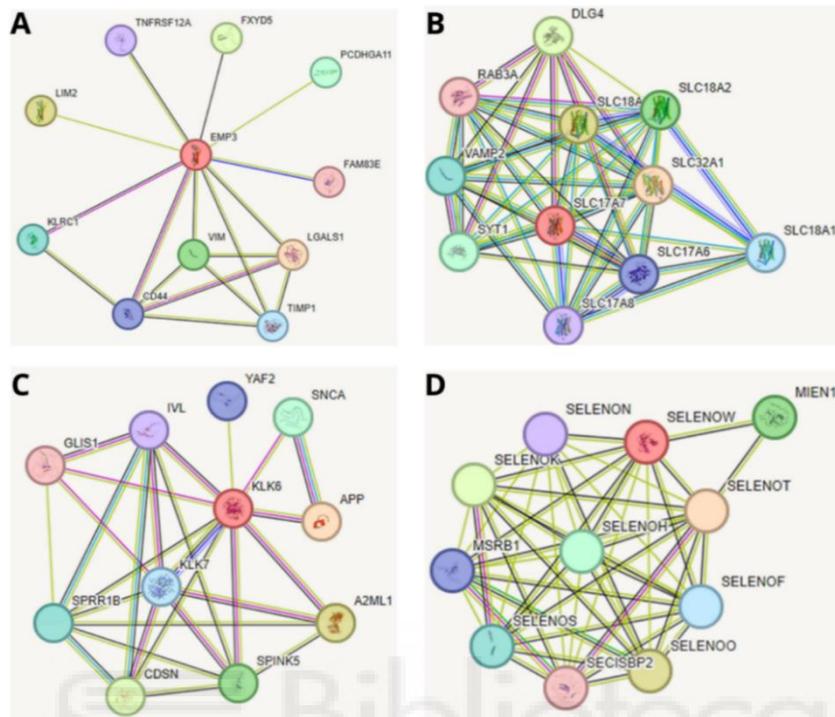


Figura 3. Mapa de interacciones proteicas de los genes EMP3 (A), SLC17A7 (B), KLK6 (C) y SEPW1 (D) (<https://string-db.org/>).

A continuación, se describen para cada uno de los cuatro genes a estudio, las características relevantes para nuestra investigación observadas en la base STRING.

- **EMP3:**

EMP3 está probablemente involucrada en la proliferación celular y las interacciones célula-célula. Las proteínas que interactúan con EMP3 participan en procesos clave para la biología del cáncer, como la proliferación, migración e invasividad celular. Destacan CD44 y TIMP1, que están directamente relacionadas con la agresividad y capacidad invasiva de las células tumorales.

- **SLC17A7:**

SLC17A7 es un transportador vesicular de glutamato 1; media la captación de glutamato en las vesículas sinápticas en las terminales nerviosas presinápticas de las células neuronales excitatorias. Las proteínas que interactúan con SLC17A7 están implicadas en procesos cruciales para la función neuronal, como el transporte y almacenamiento de neurotransmisores. Entre ellas destacan SLC32A1 y SLC18A2, que participan en la captación de GABA y glicina, y en el transporte de aminas biogénicas, procesos esenciales en la neurotransmisión y que pueden estar alterados en el glioblastoma.

- **KLK6:**

KLK6 es una serina proteasa involucrada en la degradación de proteínas como APP y SNCA (con las que está relacionada), con posibles roles en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.

- **SEPW1:**

SELENOW (también conocido como SEPW1): Es una selenoproteína W que desempeña un papel como antioxidante dependiente del glutatión (GSH). Puede estar implicada en procesos relacionados con la oxidación-reducción y en miopatías por deficiencia de selenio. Las proteínas que interactúan con SELENOW están involucradas en procesos como la regulación del estrés oxidativo y la señalización redox, que son relevantes para la biología del cáncer. Entre sus interacciones destacamos SELENOT y MIEN1, los cuales participan en la protección contra el daño oxidativo y en la migración celular. Esta red de interacciones sugiere que SELENOW podría tener un papel en la respuesta al estrés oxidativo en el contexto del glioblastoma.

6.1.2.UALCAN

El análisis realizado en la base UALCAN nos ofrece una visión detallada sobre la expresión de los genes estudiados en glioblastoma. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

- **EMP3:**

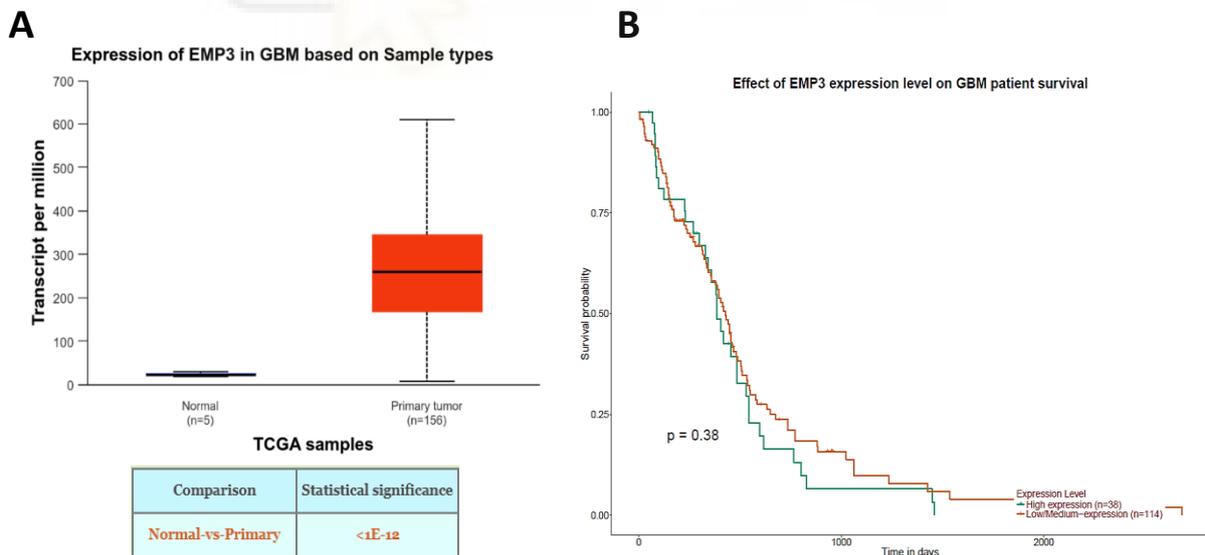


Figura 4. (A) Expresión de EMP3 en GBM. Comparación de la expresión de EMP3 en muestras de tejido normal (n=5) frente a muestras de tumor primario (n=156) en pacientes con GBM, utilizando datos de TCGA. **(B). Análisis de supervivencia basado en los niveles de expresión de EMP3 en pacientes con GBM.** La curva de Kaplan-Meier compara la supervivencia de los pacientes con alta expresión de EMP3 (n=38) frente a aquellos con expresión baja/media (n=114). (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

El análisis realizado en UALCAN (**Figura 4**) mostró que la expresión de EMP3 es significativamente mayor en las muestras de tumor primario en comparación con el tejido normal, con una alta significancia estadística.

Esta sobreexpresión de EMP3 podría estar asociada con la progresión del glioblastoma, subrayando su posible implicación en el desarrollo y la agresividad del tumor.

En cuanto a la supervivencia, los resultados muestran que no hay una diferencia significativa entre los pacientes con alta expresión de EMP3 y aquellos con baja o media expresión ($p = 0.38$), lo que sugiere que EMP3 podría no ser un marcador relevante para predecir la supervivencia en glioblastoma. Sin embargo, puede tener otros roles en la biología del tumor que no están directamente relacionados con la supervivencia.

- **SLC17A7:**

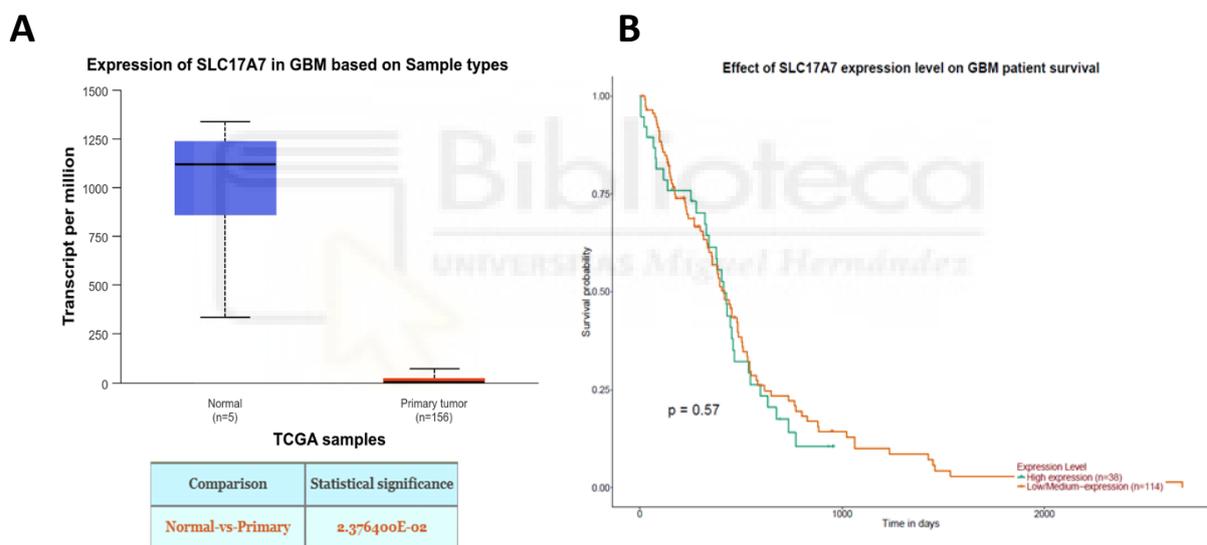


Figura 5. (A) Expresión de SLC17A7 en GBM. (B) Análisis de supervivencia basado en los niveles de expresión de SLC17A7 en pacientes con GBM.

En la **Figura 5**, SLC17A7 muestra una reducción muy significativa en su expresión en las muestras tumorales en comparación con los tejidos normales. De manera similar, lo que sugiere es que podría actuar como un supresor tumoral, influyendo en su progresión.

En cuanto a la supervivencia, no se observan diferencias significativas entre los grupos de alta y baja/media expresión de SLC17A7 ($p = 0.57$), lo que indica que su expresión no es un predictor directo de la supervivencia en GBM. Sin embargo, su rol en otros aspectos del desarrollo tumoral aún merece una exploración más profunda.

- **KLK6:**

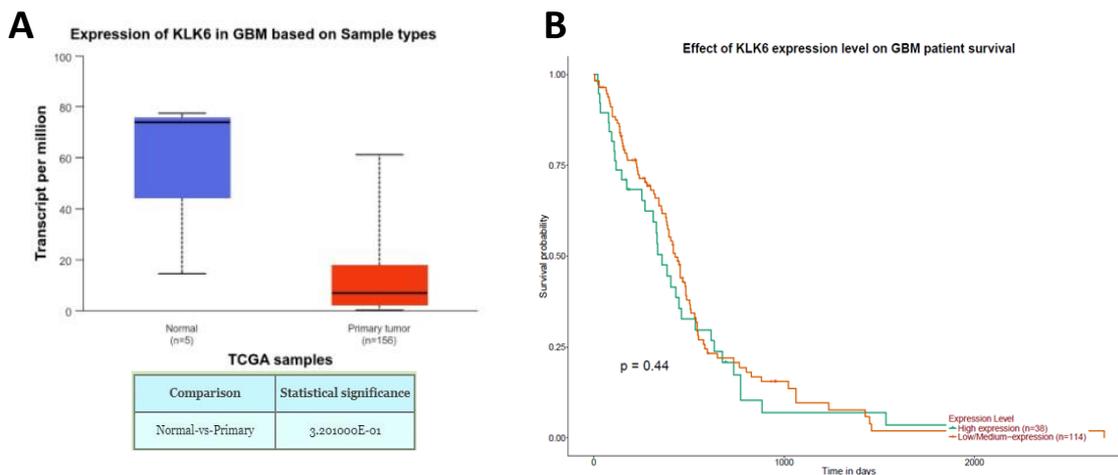


Figura 6. (A) Expresión de KLK6 en GBM. (B) Análisis de supervivencia basado en los niveles de expresión de KLK6 en pacientes con GBM.

La expresión de KLK6 en glioblastoma muestra una tendencia a la reducción en el tumor vs el tejido no tumoral (**Figura 6**), aunque no alcanza la significación estadística. En cuanto a la supervivencia, no se ve significativamente afectada por los niveles de KLK6 en GBM ($p = 0.44$). Además, en un análisis pan-cáncer obtenido también de esa base de datos, KLK6 aparece sobreexpresado en otros tumores ESCA (Carcinoma de esófago), LIHC (Carcinoma hepatocelular del hígado) y STAD (Adenocarcinoma de estómago).

- **SEPW1:**

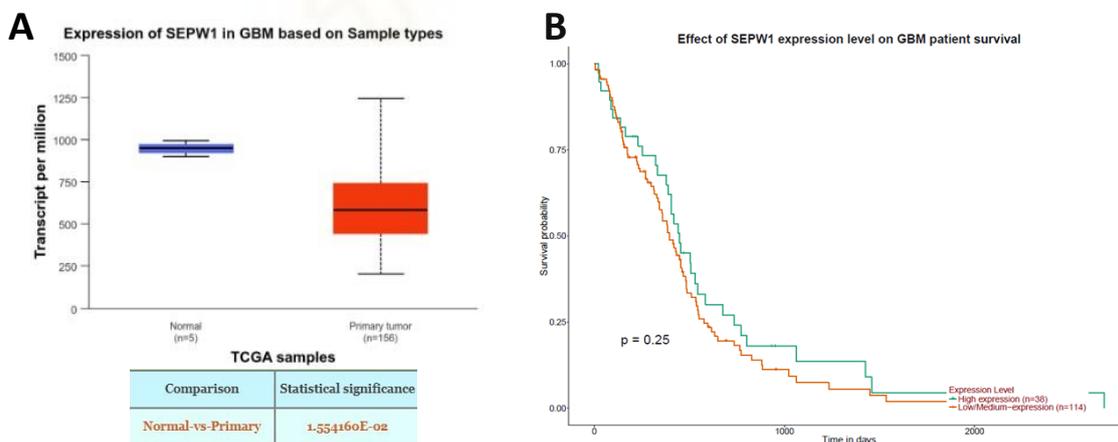


Figura 7. (A) Expresión de SEPW1 en GBM. (B) Análisis de supervivencia basado en los niveles de expresión de SEPW1 en pacientes con GBM.

SEPW1 presenta una reducción en su expresión en muestras tumorales de GBM, con significancia estadística (**Figura 7**). Los análisis de supervivencia no muestran diferencias significativas en GBM según los niveles de SEPW1 ($p = 0.25$). Además, este gen muestra una leve subexpresión en GBM, mientras que, en otros tumores como KICH (Carcinoma de células renales cromóforo) y LIHC, está sobreexpresado.

En la **Tabla 1**, se sintetizan los resultados obtenidos en la primera fase del estudio.

Gen	Expresión diferencial en GBM	Correlación con supervivencia	Interacción proteica relevante	Implicación en cáncer	Conclusión
EMP3	Sobreexpresado en GBM respecto al tejido normal	No correlación significativa con la supervivencia	Interacción con CD44 y TIMP1, relacionadas con invasividad	76 artículos en cáncer, 18 en GBM	Considerado relevante para estudio experimental
SLC17A7	Subexpresado en GBM respecto al tejido normal	No correlación significativa con la supervivencia	Implicado en el transporte de glutamato; relevante en función neuronal	16 artículos en cáncer, 3 en GBM	Considerado relevante como potencial supresor tumoral
KLK6	Tendencia a la subexpresión, pero sin alcanzar significación estadística	No correlación significativa con la supervivencia	Involucrado en la degradación de proteínas asociadas a neurodegeneración	205 artículos en cáncer, 6 en GBM	Descartado para el estudio inicial
SEPW1	Subexpresado en GBM respecto al tejido normal	No correlación significativa con la supervivencia	Antioxidante dependiente del glutatión, posible rol en reducción de oxidación	24 artículos en cáncer, 1 en GBM	Descartado para el estudio inicial

Tabla 1. Resumen de la expresión, correlación con la supervivencia, interacción proteica e implicación en cáncer de los genes EMP3, SLC17A7, KLK6 y SEPW1 en glioblastoma multiforme.

Considerando todos los datos obtenidos, tanto a nivel de la bibliografía científica como de los resultados obtenidos mediante el uso de diversas bases de datos, los genes EMP3 y SLC17A7 son considerados como los más relevantes para el estudio inicial en glioblastoma multiforme, lo cual se fundamenta en varias evidencias clave.

EMP3 se ha identificado como un gen con una fuerte implicación en la biología del glioblastoma. Estudios previos han demostrado su relación con la progresión tumoral y la agresividad en varios tipos de cáncer, respaldado por 76 artículos registrados en PubMed que lo vinculan con el cáncer en general, y 18 artículos que lo asocian específicamente con glioblastoma. Los análisis realizados en bases de datos refuerzan su relevancia, mostrando un aumento significativo en la expresión de EMP3 en glioblastoma en comparación con el cerebro no tumoral. Aunque no se observó una correlación significativa entre la expresión y la supervivencia de los pacientes con glioblastoma, su claro papel en la progresión del tumor lo convierte en un candidato prometedor para estudios experimentales más detallados.

SLC17A7, por su parte, ha mostrado características de un potencial supresor tumoral en glioblastoma. Los datos de expresión obtenidos indican una reducción significativa de SLC17A7 en las muestras tumorales frente a las normales, destacando su escasa expresión en glioblastoma comparado con el cerebro no tumoral. Aunque no se encontró una correlación clara con la supervivencia de los pacientes, SLC17A7 emerge como un gen relevante para GBM, apoyado por la evidencia de su rol supresor, como reflejan los 16 artículos que lo relacionan con el cáncer y los 3 artículos que lo asocian con glioblastoma, uno de los cuales lo define como un gen supresor en este contexto.

En cuanto a los genes KLK6 y SEPW1, aunque hay evidencias suficientes que justifican su estudio en glioblastoma, al no mostrar diferencias significativas en su expresión en GBM según la base UALCAN y dado que tampoco correlacionaba su expresión con la supervivencia de los pacientes, se decidió postergar su estudio y comenzar con los ya mencionados EMP3 y SLC17A7.

6.2. Fase 2:

Iniciamos la segunda fase del estudio determinando la expresión de los cuatro genes en las muestras de gliomas de bajo grado y glioblastomas, utilizando los transcriptomas disponibles en la muestra de pacientes obtenida gracias a la colaboración con el Dr. Luis Miguel Valor de ISABIAL.

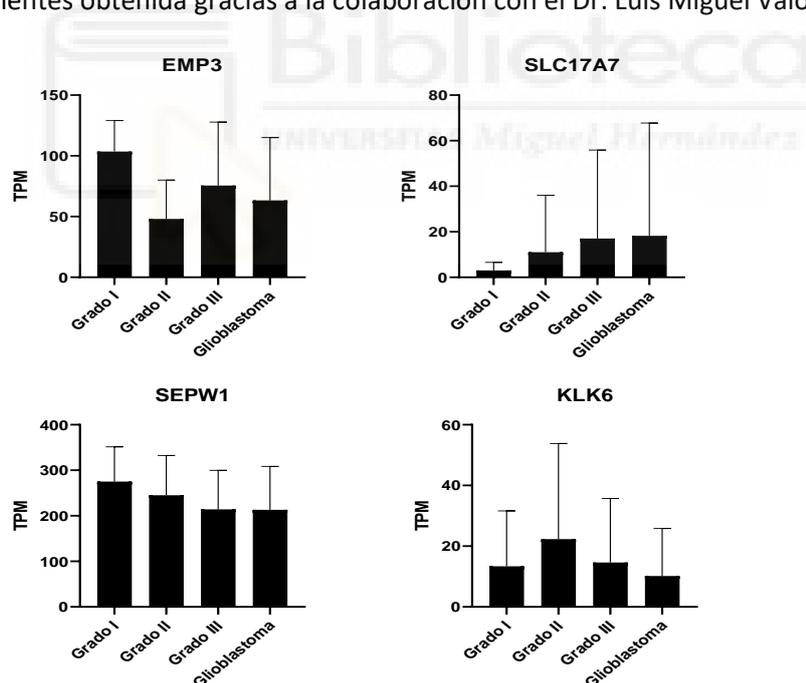


Figura 8. Expresión de los cuatro genes a estudio en muestras de gliomas de bajo grado y glioblastomas en la muestra de pacientes de ISABIAL.

Para el desarrollo de este primer objetivo se analizaron los resultados del RNA-seq realizado por el grupo de investigación del Dr. Luis Miguel Valor, que incluye 142 muestras de pacientes con gliomas de distintos grados: 8 gliomas de grado I, 27 gliomas de grado II, 20 gliomas de grado III y 84 GBM. Se descartaron 3 muestras por pertenecer a otros tipos de tumores del sistema nervioso central.

El análisis de los datos (**Figura 8**) revela una gran variabilidad en la expresión de estos genes entre los diferentes pacientes. No se observó una diferencia significativa en la expresión de ninguno de los genes al comparar gliomas de bajo grado, independientemente de su grado, con glioblastoma. Es importante destacar que estos resultados no son directamente comparables con los obtenidos en UALCAN, ya que en UALCAN se compararon las muestras tumorales con tejido cerebral no tumoral, mientras que en este estudio se compararon diferentes grados de gliomas entre sí. En un futuro próximo, se añadirán a la base de datos del Dr. Luis Miguel Valor datos de transcriptoma de cerebros no tumorales, lo que permitirá establecer una comparativa más precisa de la expresión génica entre ambas bases de datos.

Los estudios con esta base no modificaron nuestra primera elección de elegir a los genes EMP3 y SLC17A7 como objetivos de nuestro estudio, y lo primero que hicimos fue determinar la expresión de estos genes en diferentes líneas celulares de glioblastoma.

Los siguientes experimentos que realizamos se centraron en determinar la expresión de EMP3 y SLC17A7 en el panel de líneas celulares de glioblastoma del que disponemos en el laboratorio. Los resultados de estos estudios se muestran en la **Figura 9**.

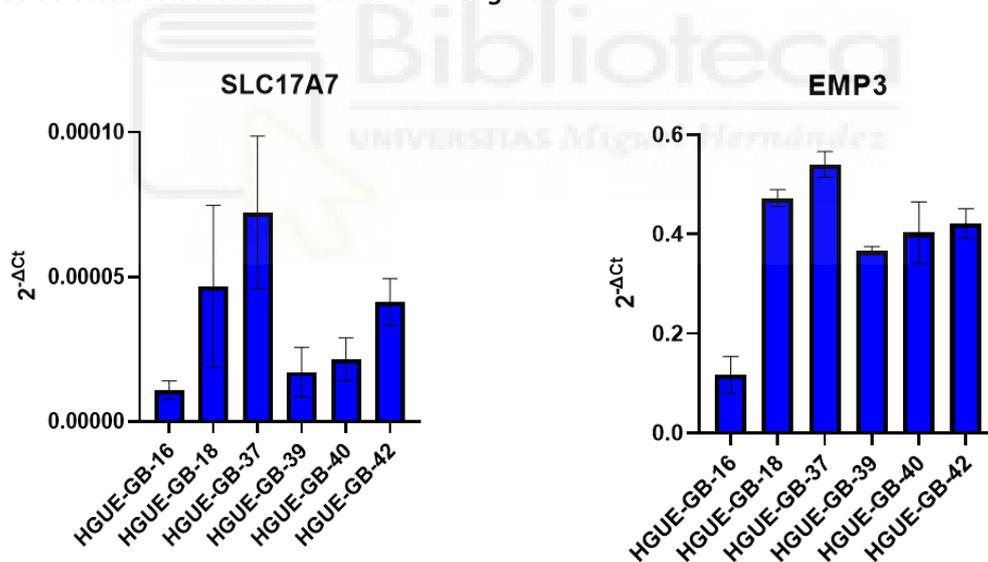


Figura 9. Expresión de EMP3 y SLC17A7 en diferentes líneas celulares de glioblastoma determinadas mediante RT seguida de qPCR. Los resultados muestran la media \pm la desviación estándar con un $n \geq 3$.

Dado que la expresión de SLC17A7 es muy baja en las líneas celulares de glioblastoma, se determinó también su expresión en líneas celulares de carcinoma de páncreas (Hs766T, M220 y RWP1) y colon (SW480, HT29 y SW620) para utilizar alguna de estas líneas como control de la efectividad en disminuir la expresión de SLC17A7 de los siRNA específicos que queríamos utilizar. Los resultados de este análisis se presentan en la **Figura 10**.

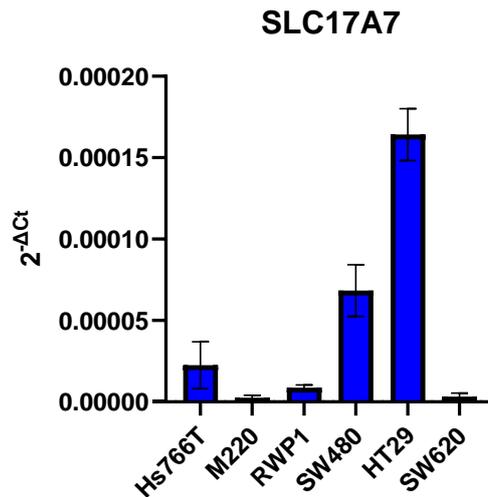


Figura 10. Expresión de SLC17A7 en líneas celulares de carcinoma de colon y páncreas determinadas mediante RT seguida de qPCR. Los resultados muestran la media \pm la desviación estándar con un $n \geq 3$.

Para continuar con la parte experimental del TFG, se seleccionaron las líneas celulares más adecuadas para realizar los experimentos con siRNAs en función de la expresión de EMP3 y SLC17A7. En el caso de EMP3, se eligieron las líneas HGUE-GB-16 y HGUE-GB-42. La línea GB-16 fue seleccionada por mostrar la menor expresión de EMP3 en comparación con el resto de las líneas y porque es la única que no presenta metilación en el promotor de MGMT, lo que le confiere una resistencia intrínseca a la quimioterapia con TMZ y BCNU. En el caso de SLC17A7, dado que su expresión era muy baja en todas las líneas celulares de glioblastoma, se eligió la línea GB-16 por las mismas razones que para EMP3. Además, se evaluó su expresión en líneas de carcinoma de colon y páncreas para seleccionar una segunda línea con mayor expresión de SLC17A7.

En las líneas celulares de carcinoma de páncreas, la expresión de SLC17A7 fue mínima, similar a lo observado en las líneas de glioblastoma (**Figura 10**). Sin embargo, la línea Hs766T destacó por presentar un nivel de expresión notablemente más alto. Esta línea es conocida por su resistencia a múltiples tratamientos, incluidos la gemcitabina, que es el fármaco de primera línea en esta patología, y los tratamientos epigenéticos con inhibidores de desacetilasas de histonas. Esta resistencia, junto con la elevada expresión de SLC17A7, sugiere una posible relación que merece ser explorada.

En cuanto al carcinoma de colon, los resultados fueron particularmente interesantes. Se observó una expresión más elevada de SLC17A7 en estas líneas celulares, con la excepción de la línea SW620, en la cual la expresión era prácticamente nula. Además, se destacó la diferencia en la expresión de SLC17A7 entre las líneas SW480 y SW620, ambas derivadas del mismo paciente: SW480 del tumor primario y SW620 de una metástasis. Este hallazgo sugiere posibles diferencias en la biología del tumor primario y su metástasis, en relación con SLC17A7.

Finalmente, se decidió utilizar la línea Hs766T de carcinoma de páncreas como la segunda línea para los experimentos con siRNAs. Se planteó además la hipótesis de que SLC17A7 podría estar involucrado en la resistencia de esta línea a diferentes tratamientos, lo que abre la puerta a futuros estudios que profundicen en la relación entre SLC17A7.

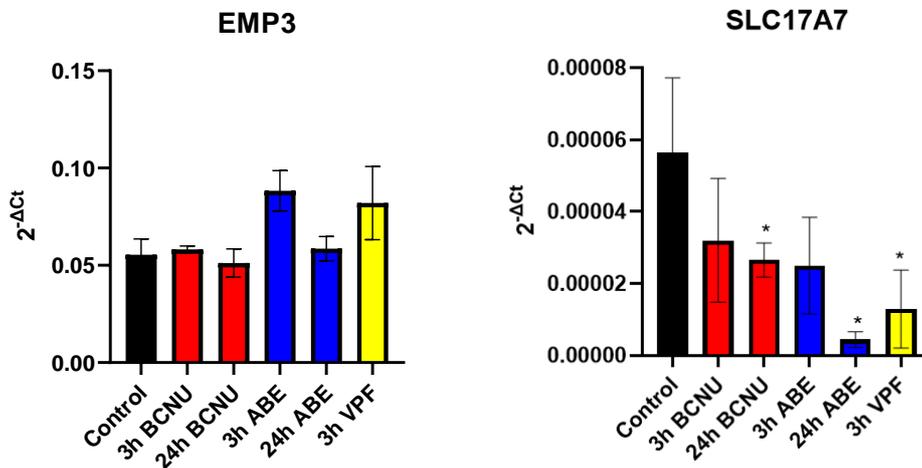


Figura 11. Expresión de EMP3 y SLC17A7 en la línea celular HGUE-GB-42 tras diferentes tratamientos. Las células fueron tratadas con 25 μ M BCNU, 10 μ M Abe, 2.7 μ M VPF por un periodo de 3 o 24 horas según se indique. El ARN aislado de las mismas fue analizado para la expresión de EMP3 Y SLC17A7 mediante RT – qPCR. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar con un $n \geq 3$, * con significancia estadística $p < 0.05$.

Dado que se disponía de ARN aislado de la línea HGUE-GB-42 después de diferentes tratamientos de interés para nuestro laboratorio en referencia a glioblastoma, se decidió investigar si éstos afectaban a la expresión de SLC17A7 y EMP3. Los resultados se muestran en la **Figura 11**. Los tratamientos no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de EMP3 en la línea celular HGUE-GB-42. En contraste, SLC17A7 sí mostró una reducción significativa en su expresión tras 24 horas de tratamiento con Abemaciclib, un inhibidor de CDK4,6 y después de 3 horas de tratamiento con Verteporfin, un inhibidor de la vía HIPPO de transducción de señales, BCNU o Carmustina es un agente alquilante del DNA.

Estos resultados indican que SLC17A7 es más susceptible a la regulación por estos tratamientos, lo que podría reflejar diferencias en las vías de señalización o en la regulación genética entre SLC17A7 y EMP3 en respuesta a la quimioterapia y otros tratamientos.

Se logró el silenciamiento prácticamente total de la expresión de EMP3 en las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-42 mediante la transfección con un siRNA específico para EMP3 (**Figura 12**). Como control, estas mismas líneas celulares fueron transfectadas con un siRNA inespecífico, que no debería afectar la expresión de EMP3.

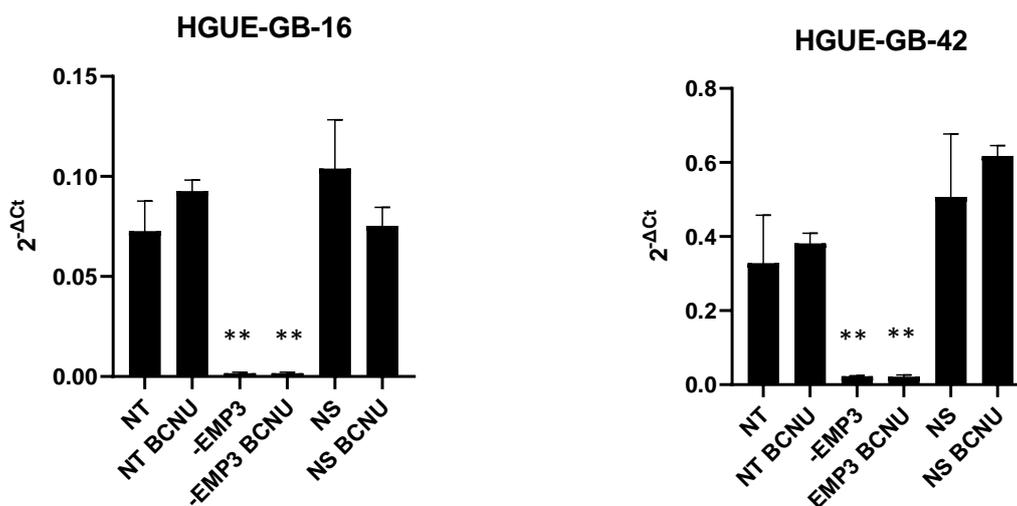


Figura 12. Silenciamiento de la expresión de EMP3 en las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-42. Las células fueron transfectadas con un siRNA específico para EMP3 o con un siRNA inespecífico utilizado como control. También se incluyeron células no transfectadas. En todos los casos, se incluyó el tratamiento con 25 μ M BCNU. Posteriormente, se determinó por RT – qPCR la expresión de EMP3 en todas las condiciones. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar con un $n \geq 3$, ** con significancia estadística $p < 0.01$).

Como resultado (**Figura 12**), se obtuvo una drástica reducción en la expresión de EMP3 en ambas líneas celulares tratadas con el siRNA específico, en comparación con las células transfectadas con el siRNA inespecífico. Este resultado confirma la eficacia del siRNA en silenciar la expresión de EMP3.

Una vez conseguida con éxito la inhibición de la expresión de EMP3 en las dos líneas celulares con el siRNA correspondiente, procedimos a estudiar el efecto de esta inhibición sobre la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, tanto en presencia como en ausencia de BCNU a una concentración de 25 μ M. En la **Figura 13**, se muestra un ejemplo representativo de los experimentos realizados en ambas líneas celulares.

Al analizar el ciclo celular (**Figura 13**), vemos que en la línea celular HGUE-GB-16, la cual es parcialmente resistente al BCNU debido a la expresión de MGMT, no se observan diferencias significativas en el ciclo celular al comparar las células transfectadas con el siRNA inespecífico (A1) con aquellas transfectadas con el siRNA específico para EMP3 (A3). Tras el tratamiento con BCNU, se observa una acumulación de células en la fase G2/M, tanto en las células transfectadas con el siRNA inespecífico (A2) como en las transfectadas con el siRNA para EMP3 (A4). No se detecta una diferencia clara entre las células tratadas con BCNU transfectadas con el siRNA inespecífico (A2) y aquellas transfectadas con el siRNA de EMP3 (A4).

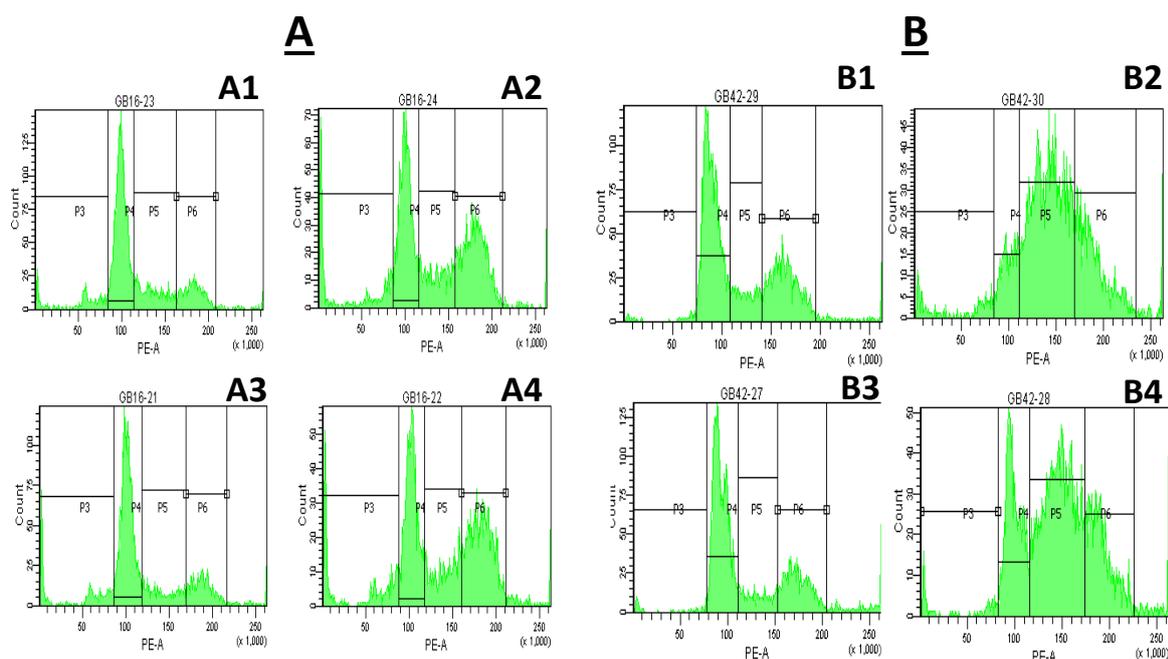


Figura 13. Ciclo celular representativo de la línea celular HGUE-GB-16 (Panel A) y HGUE-GB-42 (Panel B). El Panel A presenta la distribución del ciclo celular en la línea HGUE-GB-16, control transfectada con un siRNA inespecífico en ausencia (A1) y presencia de BCNU (A2), y transfectada con un siRNA específico para EMP3 en ausencia (A3) y presencia de BCNU 25 μ M por 24h (A4). El Panel B muestra la distribución del ciclo celular en la línea HGUE-GB-42 bajo las mismas condiciones experimentales: control transfectada con un siRNA inespecífico en ausencia (B1) y presencia de BCNU (B2), y transfectada con un siRNA específico para EMP3 en ausencia (B3) y presencia de BCNU (B4).

Por otro lado, la situación es diferente en la línea celular HGUE-GB-42, que no expresa MGMT y es más sensible a BCNU. En este caso, se observa una ligera acumulación de células en la fase G1 en las células transfectadas con el siRNA de EMP3 (B3) en comparación con las células transfectadas con el siRNA inespecífico (B1).

En presencia de BCNU, las células transfectadas con el siRNA inespecífico se acumulan en la fase S de replicación, debido a que no pueden reparar el ADN por la falta de MGMT, lo que interrumpe la replicación (B2 y B4). Sin embargo, en este caso, hay una clara diferencia entre las células transfectadas con el siRNA inespecífico tratadas con BCNU (B2) y aquellas transfectadas con el siRNA de EMP3 tratadas con BCNU (B4).

Las células transfectadas con el siRNA de EMP3 se acumulan en menor medida en la fase S, con una proporción significativa retenida en la fase G1 del ciclo celular.

Cuando se analizaron numéricamente tres experimentos similares al descrito anteriormente, se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados en la **Figura 14**.

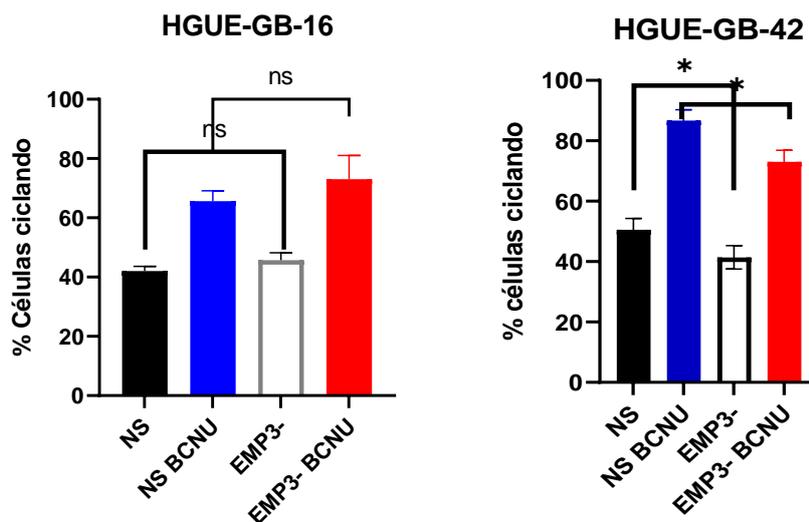


Figura 14. Resultados del estudio del ciclo celular tras la utilización de siRNA para EMP3 en las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-42. Se representa el porcentaje de células en ciclo (suma de los porcentajes de células en las fases S+G2+M y subG1) en cada caso. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar con un $n \geq 3$, * con significancia estadística $p < 0.05$

El estudio del ciclo celular (**Figura 14**) revela que la transfección con el siRNA específico para EMP3 no tuvo efectos significativos sobre el ciclo celular en la línea celular HGUE-GB-16, tanto en presencia como en ausencia de BCNU. En contraste, en la línea celular HGUE-GB-42, la inhibición de la expresión de EMP3 resultó en una disminución significativa del porcentaje de células ciclando, atribuida a la acumulación de células en la fase G1.

Además, en presencia de BCNU, también se observó una reducción significativa en el porcentaje de células ciclando en HGUE-GB-42. Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con BCNU inicialmente produce un aumento en el porcentaje de células que están ciclando, que en el caso de HGUE-GB-16 se acumulan en la fase G2+M y en HGUE-GB-42 en la fase S. La falta de MGMT en HGUE-GB-42 impide la reparación del daño en el ADN inducido por BCNU, lo que lleva a la interrupción del ciclo celular poco después de la iniciación de la replicación del ADN, provocando la muerte celular en tiempos más largos.

En la **Figura 15**, se muestra la inhibición de la expresión de SLC17A7 mediante la utilización de siRNAs específicos en las líneas celulares HGUE-GB-16 de glioblastoma y Hs766T de adenocarcinoma de páncreas exocrino, tanto en ausencia como en presencia de BCNU en el caso de la línea de glioblastoma, y de gemcitabina en el caso de la línea de carcinoma de páncreas.

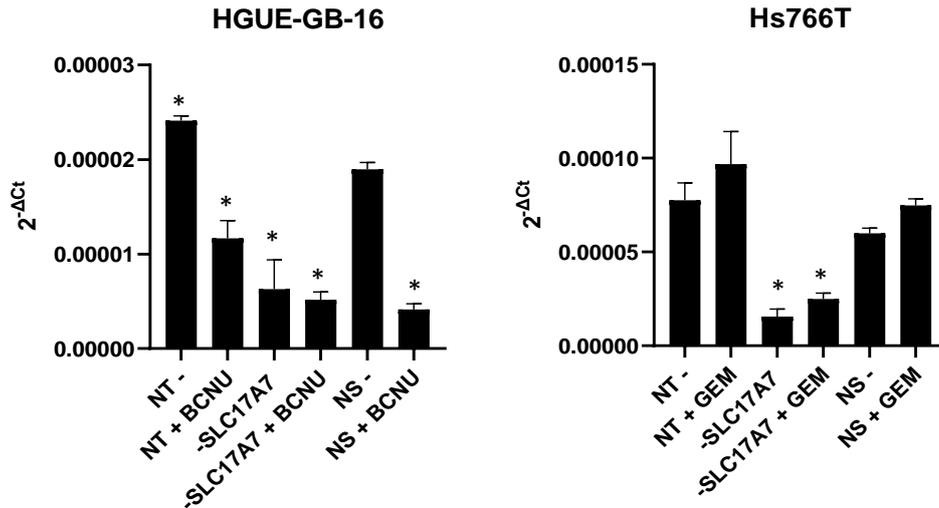


Figura 15. Silenciamiento de la expresión de SLC17A7 en las líneas celulares HGUE-GB-16 de glioblastoma y Hs766T de adenocarcinoma de páncreas. Las células fueron transfectadas con un siRNA específico para SLC17A7 o con un siRNA inespecífico utilizado como control. También se incluyeron células no transfectadas. Las células de glioblastoma se trataron con 25 μ M BCNU, mientras que las células de páncreas con 2.5 μ M de Gemcitabina. Posteriormente, se determinó por RT – qPCR la expresión de SLC17A7 en todas las condiciones. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar con un $n \geq 3$, * con significancia estadística $p < 0.05$.

Podemos observar, una inhibición de la expresión de SLC17A7 en ambas líneas celulares. BCNU muestra un efecto negativo sobre la expresión de SLC17A7 en glioblastoma, mientras que la gemcitabina no produjo cambios significativos en la expresión de SLC17A7 en la línea de páncreas.

Se analizó el efecto del silenciamiento de SLC17A7 sobre la distribución de las fases del ciclo celular en ambas líneas celulares en presencia y/o ausencia de BCNU en la línea de glioblastoma, y de gemcitabina en la de carcinoma de páncreas exocrino. Los resultados se muestran en la **Figura 16**.

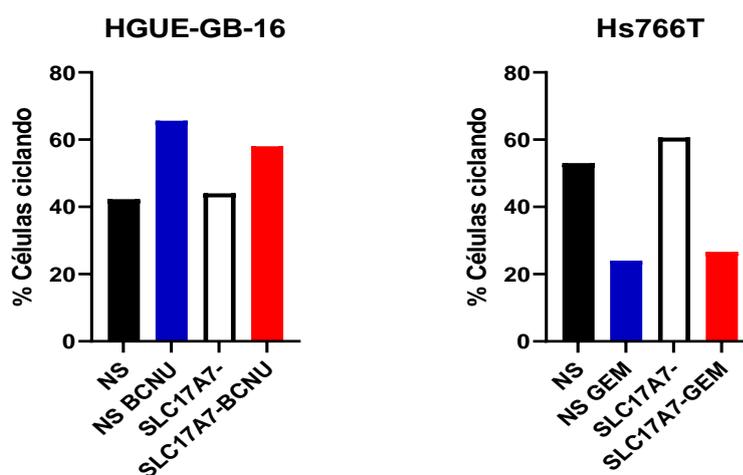


Figura 16. Resultados preliminares del estudio del ciclo celular tras la utilización de siRNA para SLC17A7 en las líneas celulares HGUE-GB-16 de glioblastoma y Hs766T de adenocarcinoma de páncreas. Se representa el porcentaje de células en ciclo (suma de los porcentajes de células en las fases S+G2+M y subG1) en cada caso.

En la **Figura 16**, se aprecia que en la línea celular HGUE-GB-16 el silenciamiento de SLC17A7 no parece afectar el ciclo celular en condiciones basales. Sin embargo, muestra un ligero efecto protector frente al BCNU, aunque es necesario realizar más repeticiones de los experimentos para poder establecer significaciones estadísticas. En el caso de las Hs766T, el silenciamiento de SLC17A7 parece aumentar ligeramente el porcentaje de células en ciclo, aunque no parece tener un efecto significativo sobre el tratamiento con gemcitabina en páncreas.

7. Discusión

La co-delección 1p/19q constituye un marcador genético de gran relevancia en gliomas, que implica la pérdida simultánea de genes en los cromosomas 1p y 19q. Esta alteración genética está asociada con un pronóstico más favorable en los gliomas de bajo grado, vinculándose con una mayor sensibilidad a la quimioterapia y la radioterapia (Ostrom et al., 2015). Nuestra hipótesis, respaldada por otros estudios, es que, entre los genes afectados por esta co-delección podrían encontrarse algunos especialmente relevantes para tumores de mayor grado, como los glioblastomas. Esto sugiere que su pérdida podría estar relacionada con el pronóstico más favorable observado en los gliomas de bajo grado (Smith et al., 2000; Gladitz et al., 2018).

En el estudio realizado por Gladitz, Klink y Seifert (2018), se propuso que la pérdida de genes clave en estas regiones podría influir en la progresión tumoral. A partir de esta premisa, inicialmente seleccionamos cuatro genes localizados en el cromosoma 19q, centrándonos posteriormente en dos de ellos: EMP3 y SLC17A7. Estos genes fueron elegidos por su destacada implicación en la oncogénesis y su potencial relevancia en el glioblastoma. Además, los datos obtenidos a través de las bases UALCAN y STRING (**Figura 4**), señalaron una sobreexpresión significativa de EMP3 en una muestra considerable de pacientes con glioblastoma. Por otro lado, SLC17A7 prácticamente perdió su expresión en los mismos pacientes (**Figura 5**), adquiriendo características de gen supresor, como ha sido demostrado en estudios previos (Lin et al., 2015). Es interesante resaltar que, cuando evaluamos la expresión de ambos genes en un panel de líneas celulares de glioblastoma (**Figura 9**), observamos que los dos mostraban su menor expresión en la línea celular HGUE-GB-16, la única que no presenta metilación del promotor de MGMT y que es parcialmente resistente a BCNU. Esto sugiere que ambos genes podrían estar relacionados con la sensibilidad y/o resistencia a agentes alquilantes, como BCNU o temozolomida, utilizados en el tratamiento de estos tumores. De hecho, estudios recientes sugieren que SLC17A7 podría estar involucrado en la regulación epigenética de la expresión (Hervás-Corpión et al., 2023).

EMP3 ha sido estudiado en diversos contextos oncológicos, incluyendo el glioblastoma, donde se ha asociado con la regulación de la proliferación celular y la invasividad tumoral. En estudios previos, se ha observado que la hipermetilación del promotor de EMP3 está vinculada con su inactivación en tumores, lo que podría estar relacionado con una mayor agresividad tumoral (Alaminos et al., 2005). Sin embargo, en el caso del glioblastoma, tal y como observamos en la base UALCAN y en nuestras propias líneas celulares, existe una sobreexpresión de este gen y no una pérdida de expresión. Nuestro grupo de investigación demostró previamente que la señalización oncogénica del receptor EGFR desempeña un papel crucial en la progresión del glioblastoma (Carrasco-García et al., 2011; Carrasco-García et al., 2014). Estos estudios revelaron cómo los inhibidores de tirosina quinasa pueden interrumpir la señalización de EGFR en líneas celulares de glioblastoma. Además, estudios recientes han demostrado que EMP3 puede sostener esta señalización oncogénica, añadiendo una capa adicional de complejidad a su papel en la biología del glioblastoma (Martija & Pusch, 2021). Por otra parte, se ha observado que la alta expresión de EMP3 está correlacionada con un microambiente inmunosupresor, lo cual contribuye a la resistencia de este tumor frente a terapias inmunológicas (Yue et al., 2018).

SLC17A7 también ha sido objeto de investigación, particularmente por su papel en la neurotransmisión glutamatérgica y su posible función como supresor tumoral en gliomas. En estudios previos, se ha confirmado que la subexpresión de SLC17A7 en glioblastomas podría estar vinculada con la progresión tumoral (Lin et al., 2015). Se ha sugerido, además, que SLC17A7 podría estar involucrado en la regulación epigenética a través de la acetilación de histonas (Hervás-Corpión et al., 2023).

Nuestros resultados experimentales proporcionan evidencias que apoyan y expanden los hallazgos previos sobre EMP3 y SLC17A7 en glioblastoma. En nuestro estudio, se observó que la inhibición de la expresión de EMP3 en las líneas celulares de glioblastoma producía efectos diferentes sobre el ciclo celular en las distintas líneas. En la línea HGUE-GB-16, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células ciclando entre las células transfectadas con el siRNA específico para EMP3 y el siRNA inespecífico de control, tanto en presencia como en ausencia de BCNU.

En cambio, en la línea celular HGUE-GB-42, las células transfectadas con el siRNA para EMP3 mostraron un menor porcentaje de células ciclando, tanto en presencia como en ausencia de BCNU, lo que sugiere que, en esta línea celular, EMP3 podría estar involucrado en la regulación del ciclo celular. Otros estudios han vinculado la inactivación de EMP3 con un aumento en la proliferación celular y la invasividad tumoral (Alaminos et al., 2005), lo que contrasta con nuestros resultados, ya que la disminución de EMP3 inducida con el siRNA no conllevó un aumento de la proliferación.

Por otro lado, la inhibición de EMP3 mediante siRNA en nuestro estudio resultó en una disminución significativa de la proliferación celular (**Figura 12**), lo que refuerza su potencial como objetivo terapéutico. Este resultado es coherente con la hipótesis propuesta por Martija & Pusch, 2021, que sugieren que EMP3 podría estar implicado en la señalización oncogénica, contribuyendo así a la progresión tumoral.

En cuanto a SLC17A7, nuestros datos experimentales revelaron una muy baja expresión en las líneas celulares de glioblastoma estudiadas (**Figura 9**). Estos resultados son congruentes con lo reportado por Lin et al. (2015), quienes observaron que la subexpresión de SLC17A7 podría facilitar la progresión tumoral en gliomas. Asimismo, la inhibición de SLC17A7 mediante siRNA en nuestro estudio, aunque solo contamos con datos preliminares, mostró una tendencia a disminuir el porcentaje de células ciclando en la línea celular HGUE-GB-16 tratada con 25 μ M BCNU. En contraste, en la línea celular Hs766T, la inhibición de SLC17A7 parece estar asociada con un aumento en el porcentaje de células ciclando en ausencia de tratamiento con Gemcitabina (**Figura 15**). Estos datos preliminares, junto con la observación de que los niveles de expresión de SLC17A7 en nuestras líneas celulares de glioblastoma son modulados por diferentes fármacos de interés en glioblastoma, tales como BCNU, Abemaciclib y Verteporfin, que participan en vías de transducción de señales distintas, como la alquilación del DNA, el control del ciclo celular a través de los complejos ciclina D, CDK4/6 y la vía Hippo, sugieren que SLC17A7 puede desempeñar un papel relevante en glioblastoma.

En conclusión, nuestro estudio no sólo confirma las observaciones previas sobre EMP3 y SLC17A7, sino que también aporta nuevos datos que refuerzan su relevancia como objetivos terapéuticos en glioblastoma. La evidencia acumulada sugiere que estos genes juegan un papel importante en la progresión tumoral y podrían ser clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

8. Conclusiones y proyección futura

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. El gen EMP3 aparece significativamente sobreexpresado en GBM en comparación con el tejido no tumoral en la base pública UALCAN y no muestra correlación con la supervivencia de los pacientes de GBM, pero sí con la de los pacientes de gliomas de bajo grado en la misma base.
2. El gen SLC17A7 muestra niveles muy significativamente disminuidos en GBM comparado con el tejido no tumoral en la base UALCAN y no muestra correlación con la supervivencia de los pacientes tanto de GBM, como de gliomas de bajo grado en la base UALCAN.
3. Los niveles de expresión de EMP3 y de SLC17A7 no cambian significativamente cuando se comparan gliomas de bajo grado con GBM en la base de datos de pacientes de ISABIAL analizados.
4. El gen EMP3 se expresa en todas las líneas celulares de GBM estudiadas, mostrando a la línea HGUE-GB-16 como la de menor expresión, mientras que el resto no presentan variaciones significativas entre sí.
5. El gen SLC17A7 muestra una gran variabilidad en su expresión entre las diferentes líneas celulares de GBM, siendo de nuevo la HGUE-GB-16 la de menor expresión y HGUE-GB-37 la de mayor expresión.
6. La expresión de SLC17A7 aparece regulada por Abemaciclib, BCNU y Verteporfin en la línea celular HGUE-GB-42.
7. La inhibición de la expresión de EMP3 en la línea celular HGUE-GB-16 no produjo cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de células ciclando, ni en ausencia, ni en presencia de 25 μ M BCNU.
8. La inhibición de la expresión de EMP3 en la línea celular HGUE-GB-42 produjo una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células ciclando tanto en presencia como en ausencia de 25 μ M BCNU. Esta disminución se debe a la acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular.
9. El tratamiento con BCNU disminuye la expresión de SLC17A7 en HGUE-GB-16. En cambio, el tratamiento con Gemcitabina no produjo cambios estadísticamente significativos en SLC17A7 en la línea celular Hs766T.
10. Datos preliminares muestran una tendencia a disminuir el porcentaje de células ciclando en la línea celular HGUE-GB-16 en la que se ha silenciado SLC17A7 y ha sido tratada con 25 μ M de

BCNU. En el caso de la línea celular Hs766T, la inhibición de la expresión de SLC17A7 parece tender al aumento en el porcentaje de células ciclando en ausencia del tratamiento con 2.5 μ M de Gemcitabina .

En futuras investigaciones, se propone estudiar el efecto del silenciamiento de EMP3 y SLC17A7 en otros aspectos críticos de la biología tumoral, tales como la invasividad, la angiogénesis y la interacción con el sistema inmune.

La baja expresión de SLC17A7 observada en nuestra investigación sugiere su posible papel como gen supresor tumoral. El abordaje inicial mediante siRNA para disminuir aún más su expresión, aunque útil con las herramientas disponibles, podría no ser el enfoque más apropiado. En futuras investigaciones, sería relevante explorar la expresión de SLC17A7 bajo un promotor heterólogo para evaluar su impacto.

Sería interesante ampliar el estudio a otros genes de interés identificados en los primeros apartados de este trabajo, tales como KLK6 y SEPW1.

Aunque la delección individual de estos genes podría no tener un impacto mínimo por sí sola, es posible que la pérdida combinada de múltiples genes en las regiones co-delecionadas ejerza un efecto más marcado en la progresión tumoral. Para explorar esta posibilidad, se propone realizar experimentos de dobles transfecciones utilizando siRNA dirigidos simultáneamente contra varios de estos genes, lo que podría revelar interacciones sinérgicas importantes.

Finalmente, es fundamental extender este análisis a los genes localizados en el cromosoma 1p. Dado que este estudio se centra en la co-delección 1p/19q, es crucial investigar los genes que son delecionados de manera simultánea en ambas cromosomas. Actualmente, nuestro grupo de investigación está realizando el análisis de los genes en el cromosoma 1p utilizando un abordaje experimental similar al presentado en este trabajo. En un futuro cercano, se espera integrar los hallazgos de ambos estudios para generar conclusiones más robustas y avanzar en la comprensión del glioblastoma.

9. Bibliografía

- Alaminos, M., Dávalos, V., Ropero, S., Setién, F., Paz, M. F., Herranz, M., Fraga, M. F., Mora, J., Cheung, N. K., Gerald, W. L., & Esteller, M. (2005). EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer research*, 65(7), 2565–2571. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4283>
- Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. (2017). Adult Glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(21), 2402–2409. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.0119>
- Alkan, Z., Duong, F. L., & Hawkes, W. C. (2015). Selenoprotein W controls epidermal growth factor receptor surface expression, activation and degradation via receptor ubiquitination. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(5), 1087–1095. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.016>
- Bouzid, H., Soualmia, F., Oikonomopoulou, K., Soosaipillai, A., Walker, F., Louati, K., Lo Dico, R., Pocard, M., El Amri, C., Ignatenko, N. A., & Darmoul, D. (2022). Kallikrein-Related Peptidase 6 (KLK6) as a Contributor toward an Aggressive Cancer Cell Phenotype: A Potential Role in Colon Cancer Peritoneal Metastasis. *Biomolecules*, 12(7), 1003. <https://doi.org/10.3390/biom12071003>
- Carrasco-García, E., Saceda, M., & Martínez-Lacaci, I. (2014). Role of receptor tyrosine kinases and their ligands in glioblastoma. *Cells*, 3(2), 199–235. <https://doi.org/10.3390/cells3020199>
- Carrasco-García, E., Saceda, M., Grasso, S., Rocamora-Reverte, L., Conde, M., Gómez-Martínez, A., García-Morales, P., Ferragut, J. A., & Martínez-Lacaci, I. (2011). Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Experimental cell research*, 317(10), 1476–1489. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.015>
- Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Creighton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 25, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>. Página web: <https://ualcan.path.uab.edu/index.html>
- Estimación del porcentaje de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) global para ambos sexos en 2022. Fuente: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024 (https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?types=0_1&mode=cancer&group_populations=1&sortBy=value1)
- Gavini, J., Dommann, N., Jakob, M. O., Keogh, A., Bouchez, L. C., Karkampouna, S., Julio, M. K., Medova, M., Zimmer, Y., Schläfli, A. M., Tschan, M. P., Candinas, D., Stroka, D., & Banz, V. (2019). Verteporfin-induced lysosomal compartment dysregulation potentiates the effect of sorafenib in

hepatocellular carcinoma. *Cell death & disease*, 10(10), 749. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1989-z>

- Gladitz, J., Klink, B., & Seifert, M. (2018). Network-based analysis of oligodendrogliomas predicts novel cancer gene candidates within the region of the 1p/19q co-deletion. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0544-y>
- Grech, N., Dalli, T., Mizzi, S., Meilak, L., Calleja, N., & Zrinzo, A. (2020). Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus*, 12(5), e8195. <https://doi.org/10.7759/cureus.8195>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. H. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hervás-Corpión, I., Navarro-Calvo, J., Martín-Climent, P., Iriarte-Gahete, M., Geribaldi-Doldán, N., Castro, C., & Valor, L. M. (2023). Defining a Correlative Transcriptional Signature Associated with Bulk Histone H3 Acetylation Levels in Adult Glioblastomas. *Cells*, 12(3), 374. <https://doi.org/10.3390/cells12030374>
- Lewandowska, A. M., Rudzki, M., Rudzki, S., Lewandowski, T., & Laskowska, B. (2019). Environmental risk factors for cancer - review paper. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>
- Lin, B., Lee, H., Yoon, J. G., Madan, A., Wayner, E., Tønning, S., Hothi, P., Schroeder, B., Ulasov, I., Foltz, G., Hood, L., & Cobbs, C. (2015). Global analysis of H3K4me3 and H3K27me3 profiles in glioblastoma stem cells and identification of SLC17A7 as a bivalent tumor suppressor gene. *Oncotarget*, 6(7), 5369–5381. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3030>
- Martija, A. A., & Pusch, S. (2021). The Multifunctional Role of EMP3 in the Regulation of Membrane Receptors Associated with IDH-Wild-Type Glioblastoma. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5261. <https://doi.org/10.3390/ijms22105261>
- National Brain Tumor Society, "Glioblastoma (GBM)". Disponible en: <https://braintumor.org/brain-tumors/about-brain-tumors/brain-tumor-types/>
- OMS, "Cáncer," 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*, 17 Suppl 4(Suppl 4), iv1–iv62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. (2014). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology*, 16 Suppl 4(Suppl 4), iv1–iv63. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>
- Perkins, A., & Liu, G. (2016). Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *American family physician*, 93(3), 211–217.
- Smith, J. S., Tachibana, I., Pohl, U., Lee, H. K., Thanarajasingam, U., Portier, B. P., et al. (2000). A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics*, 64(1), 44–50. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.6101>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sun, T., Warrington, N. M., Luo, J., Brooks, M. D., Dahiya, S., Snyder, S. C., Sengupta, R., & Rubin, J. B. (2014). Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males. *The Journal of clinical investigation*, 124(9), 4123–4133. <https://doi.org/10.1172/JCI71048>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>. Página web: <https://string-db.org/>
- SLC17A7 solute carrier family 17 member 7 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (nih.gov) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57030>
- Wang, L. M., Englander, Z. K., Miller, M. L., & Bruce, J. N. (2023). Malignant Glioma. *Advances in experimental medicine and biology*, 1405, 1–30. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23705-8_1
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Handbook of clinical neurology*, 134, 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>