



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS Miguel Hernández

UNIVERSITAS Miguel Hernández

**Estudio de la participación de *SLFN11* en la
potenciación de la radioterapia por los
inhibidores de PARP en células tumorales**

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2024/2025

Autora: Ana Lucía Rodríguez Alameda

Tutor: Miguel Saceda Sánchez

Cotutores: María del Pilar García Morales y María Fuentes Baile

Departamento y Área: Bioquímica y Biología Molecular

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, con cerca de 10 millones de fallecimientos en 2020. A pesar de los avances terapéuticos, el glioblastoma multiforme (GBM) sigue siendo un tumor muy invasivo, con una supervivencia media de aproximadamente 12 meses. Este trabajo se centra en la evaluación de estrategias para potenciar el efecto de la quimioterapia y la radioterapia en GBM, mediante el uso de inhibidores de PARP (iPARP). Además, se evaluó el gen *SLFN11* como posible marcador de sensibilidad a estos inhibidores y a la radioterapia. Los resultados indicaron que los iPARP ejercen un efecto antiproliferativo por sí mismos, induciendo muerte celular a tiempos prolongados. Asimismo, potencian el efecto quimioterapéutico de manera dependiente del contexto celular. En combinación con la radioterapia, se observó que el momento de administración influye en la eficacia del tratamiento. Por último, el silenciamiento de *SLFN11* redujo moderadamente el efecto de la radioterapia en las primeras 24 horas, pero su combinación con iPARP no mostró un impacto adicional en el efecto de la radioterapia. En conjunto, los resultados no respaldan un papel claro de *SLFN11* como marcador de sensibilidad a los iPARP, aunque será necesario evaluar esta posibilidad en tratamientos radioterápicos de mayor duración.

Palabras clave: glioblastoma; *SLFN11*; radioterapia; BCNU; Olaparib.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, accounting for nearly 10 million deaths in 2020. Despite therapeutic advances, glioblastoma multiforme (GBM) remains a highly invasive tumor, with a median survival of approximately 12 months. This study focuses on evaluating strategies to enhance the effects of chemotherapy and radiotherapy in GBM through the use of PARP inhibitors (PARPi). Additionally, the *SLFN11* gene was assessed as a potential marker of sensitivity to these inhibitors and to radiotherapy. The results indicated that PARPi exert an antiproliferative effect on their own, inducing cell death over prolonged periods. Likewise, they enhanced the chemotherapeutic effect in a cell context-dependent manner. In combination with radiotherapy, the timing of administration was found to influence treatment efficacy. Finally, *SLFN11* silencing moderately reduced the effect of radiotherapy during the first 24 hours, although its combination with PARPi had no additional impact on the radiotherapy response. Overall, the results do not support a clear role of *SLFN11* as a marker of sensitivity to PARPi, although further evaluation in longer-term radiotherapy will be necessary.

Keywords: glioblastoma; *SLFN11*; radiotherapy; BCNU; Olaparib.

Abreviaturas

ADNc	ADN complementario
BCNU	Carmustina
BER	Reparación por escisión de bases
Ct	Cycle Threshold
DE	Desviación estándar
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	Reparación de roturas de doble cadena
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray
HGUE	Hospital General Universitario de Elche
HR	Recombinación homóloga
iPARP	Inhibidores de PARP
MGMT	Metilguanina ADN metiltransferasa
MMR	Reparación de desajustes
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (del inglés, <i>non-homologous end-joining</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP	Poli-ADP ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RT	Retrotranscripción
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SLFN	<i>Schlafen</i>
SSB	Roturas de cadena simple del ADN
TMZ	Temozolomida
UNG	Uracil-N-Glicosilasa
UV	Ultravioleta

Índice

1. Introducción	5
1.1. Glioblastoma multiforme.....	5
1.2. Tratamientos.....	6
1.3. Mecanismos de resistencia	7
1.3.1. Mecanismos de reparación de ADN	8
1.5. Papel de PARP en la reparación del ADN	8
1.6. <i>SLFN11</i> como biomarcador de sensibilidad terapéutica.....	10
2. Antecedentes y objetivos	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Cultivos celulares	12
3.2. Tratamientos.....	12
3.2.1. Tratamientos farmacológicos.....	13
3.2.2. Radioterapia	13
3.3. Ensayos de proliferación celular	13
3.3.1. MTT	13
3.3.2. Cristal violeta	14
3.4. Ensayo de ciclo celular	14
3.5. Transfección.....	15
3.6. Análisis de expresión génica	15
3.6.1. Extracción de ARN.....	16
3.6.2. Retrotranscripción (RT)	16
3.6.3. PCR cuantitativa en tiempo real.....	17
3.7. Análisis estadístico	17
4. Resultados.....	18
Objetivo 1: selección de las líneas celulares de GBM en base a la expresión de <i>SLFN11</i>	18
Objetivo 2: evaluación de la quimio y radioterapia en presencia y ausencia de iPARP	18
Impacto de la inhibición de PARP en la eficacia de agentes quimioterapéuticos	20
Impacto de la inhibición de PARP en la eficacia de la radioterapia	23
Objetivo 3: relación del silenciamiento de <i>SLFN11</i> con el efecto de la radioterapia y combinado con iPARP.....	25
Objetivo 4: correlación de la expresión de <i>SLFN11</i> con otros genes implicados en radioterapia ..	27
4. Discusión	29
5. Conclusiones y proyecciones futuras	31
6. Bibliografía	32

1. Introducción

El cáncer es un término global que se refiere a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se conocen como “tumores malignos” o neoplasias malignas. Se caracteriza por una multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y, en última instancia, invaden otras áreas del cuerpo u otros órganos, dando lugar a metástasis, que es la principal causa de muerte por estas enfermedades. El proceso se inicia cuando células normales se transforman en tumorales a través de un proceso que conlleva la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno (*Cancer*, n.d.).

Según la OMS, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y fue responsable de casi 10 millones de muertes en 2020. Los tipos de cáncer más comunes son los de mama, pulmón, colon y recto, próstata, piel y estómago (*Cancer*, n.d.).

Estas enfermedades no tienen una causa evidente, sino que resultan de interacciones entre factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan los carcinógenos físicos (como las radiaciones ultravioletas e ionizantes), químicos (como el amianto o las sustancias presentes en el humo del tabaco) y biológicos (como determinados virus, bacterias y parásitos). Además, la incidencia del cáncer aumenta con la edad, debido a la acumulación de factores de riesgo para distintos tipos de tumores y a la disminución de la eficacia de los mecanismos de reparación celular (*Cancer*, n.d.).

1.1. Glioblastoma multiforme

Los tumores cerebrales son un grupo muy heterogéneo, con características clínicas, morfológicas y moleculares diversas que influyen directamente en el pronóstico y el tratamiento. Aunque los tumores del sistema nervioso central son poco frecuentes, representan una causa importante de morbilidad y mortalidad por cáncer, y suponen un reto tanto para el diagnóstico como para el tratamiento (McNeill, 2016).

Se clasifican en distintos grupos en base a criterios histopatológicos, morfológicos y moleculares. La clasificación más reciente fue publicada por la OMS en 2021, e incluye al glioblastoma multiforme (GBM) como tumor primario de grado IV (*Cancer*, n.d.).

El GBM es un tumor cerebral primario muy invasivo, más frecuente en adultos, y se caracteriza por su mal pronóstico y recurrencia tumoral prácticamente inevitable. Además, se encuentra entre las neoplasias malignas más letales y su elevada agresividad se asocia a una baja tasa de supervivencia debido a la falta de tratamientos realmente efectivos (Sen et al., 2022).

Este tipo de tumor presenta una elevada heterogeneidad inter e intratumoral, lo que dificulta el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas, ya que esta variabilidad es una de las principales causas de la resistencia a los tratamientos convencionales (Sen et al., 2022).

En la actualidad, el GBM es prácticamente incurable, ya que la recaída tras el tratamiento es casi inevitable, aunque un tratamiento paliativo puede prolongar la supervivencia de los pacientes. En este contexto, resulta esencial avanzar hacia estrategias más personalizadas, basadas en enfoques innovadores que aborden la complejidad del tumor.

1.2. Tratamientos

El tratamiento convencional del GBM incluye la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia (Erasimus et al., 2016).

La resección quirúrgica consiste en la extirpación de la mayor cantidad posible del tumor, idealmente de forma completa, ya que una resección más amplia se asocia con una mayor supervivencia. Sin embargo, la extirpación completa rara vez es viable, por lo que la cirugía se complementa habitualmente con radioterapia y quimioterapia (Waqar et al., 2022).

La quimioterapia puede clasificarse en dos tipos principales: antiangiogénica o citotóxica. La primera se centra en inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis); mientras que la citotóxica actúa dañando o destruyendo directamente las células cancerosas.

Entre los fármacos citotóxicos más utilizados en el tratamiento del GBM destacan la temozolomida (TMZ) y la carmustina (BCNU), ambos agentes alquilantes. La TMZ actúa principalmente mediante la metilación del ADN en posiciones clave como O6 y N7 de la guanina, lo que induce errores durante la replicación y conduce a la muerte celular (Chacón et al., n.d.). Generalmente, se administra tras la resección quirúrgica, ya sea en monoterapia o en combinación con radioterapia (Bisht et al., 2022).

El BCNU es un antineoplásico del grupo de las nitrosoureas que ejerce su citotoxicidad mediante múltiples mecanismos. Puede alquilar sitios reactivos en las nucleoproteínas, interfiriendo con la síntesis y reparación del ADN. También es capaz de formar enlaces cruzados intracatenarios en el ADN (*crosslinks*), lo que impide su replicación y transcripción (Bock et al., 2010; Reithmeier et al., 2010).

Debido a su naturaleza lipofílica, tanto la TMZ como el BCNU atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica, facilitando su acción en el cerebro.

La radioterapia utiliza haces de energía, generalmente rayos X, para destruir las células cancerosas o reducir el tamaño del tumor. Se dirige específicamente a la zona afectada del cerebro, tratando de minimizar los daños en el tejido sano. Puede aplicarse como radioterapia externa, desde una fuente

extracorpórea; o como braquiterapia, colocando material radioactivo cerca o dentro del tumor (Choi et al., 2020).

Este tratamiento puede tener un objetivo curativo, para reducir el tumor y facilitar su extirpación mediante cirugía, o paliativo, con el fin de aliviar los síntomas en casos en los que la enfermedad no puede curarse (National Cancer Institute, n.d.-a).

También se ha estudiado la utilidad de la reirradiación en pacientes con GBM recurrente, una estrategia que podría contribuir a reducir el tamaño del tumor, ralentizar su crecimiento o aliviar los síntomas (Minniti et al., 2021).

Debido a la limitada eficacia y los efectos secundarios asociados a los tratamientos convencionales, se están explorando nuevos tratamientos como los inhibidores enzimáticos, la inmunoterapia y la nanoterapia (Wang et al., 2023).

Entre estas opciones, la inmunoterapia es actualmente una de las más utilizadas por su potencial para potenciar o modificar la respuesta inmunitaria del paciente para permitir un ataque más eficaz contra las células cancerosas. Dentro de las estrategias inmunoterapéuticas se encuentran los inhibidores de puntos de control inmunitario, la terapia de transferencia en células T, los anticuerpos monoclonales, las vacunas de tratamiento y los inmunomoduladores (Majc et al., 2021).

Sin embargo, a pesar de los avances terapéuticos, la recurrencia del tumor y el desarrollo de resistencias continúan siendo frecuentes, lo que contribuye a que la tasa de supervivencia a 5 años siga siendo extremadamente baja (Majc et al., 2021). Por ello, es fundamental seguir investigando para avanzar en el desarrollo de terapias más efectivas contra el GBM.

1.3. Mecanismos de resistencia

El GBM presenta una alta tasa de recurrencia y de desarrollo de resistencias a los tratamientos convencionales, lo que limita drásticamente su eficacia a largo plazo. Esta resistencia puede clasificarse en intrínseca o adquirida. La primera está presente antes del inicio del tratamiento y se debe a la heterogeneidad molecular del tumor, que incluye subpoblaciones celulares insensibles a los fármacos. La resistencia adquirida se desarrolla durante el tratamiento, cuando las células tumorales activan mecanismos de evasión.

Entre los mecanismos generales de resistencia se incluyen la inactivación de fármacos, la reducción de su absorción por alteraciones en la membrana celular, la expulsión activa de los compuestos citotóxicos mediante transportadores, como los de la familia ABC, y la alteración de las dianas farmacológicas, que impide una acción eficaz de los agentes terapéuticos (Lei et al., 2023; National Cancer Institute, n.d.-b).

Sin embargo, uno de los mecanismos más relevantes en el contexto del GBM, y especialmente en relación con la quimioterapia con agentes alquilantes y la radioterapia, es la resistencia asociada a la activación de las vías de reparación del ADN. Estas rutas permiten a las células tumorales corregir el daño inducido por el tratamiento (Erasimus et al., 2016).

1.3.1. Mecanismos de reparación de ADN

Las células tienen varios mecanismos para reparar daños en su material genético. Estas vías permiten mantener la integridad del genoma, pero también contribuyen a la resistencia tumoral frente a terapias genotóxicas. Entre los principales mecanismos se encuentran:

- La reparación por escisión de bases (BER) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER). La primera repara daños menores como las roturas de cadena simple del ADN (SSB), que son causadas habitualmente por especies reactivas de oxígeno, procesos de alquilación, despurinación o desaminación. En cambio, la NER elimina daños más voluminosos, como los causados por la luz ultravioleta (UV) o ciertos agentes químicos (Halim et al., 2025).
- La reparación de desajustes (MMR) corrige errores de apareamiento durante la replicación del ADN. Su disfunción se asocia con una mayor tasa de mutaciones en el ADN e inestabilidad genómica, pudiendo conducir al desarrollo del cáncer (Fishel, 2015).
- La reparación directa, mediada por enzimas como la metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), elimina grupos alquilo del ADN. En el contexto del GBM, la alta expresión de MGMT se relaciona con la resistencia a la TMZ, al contrarrestar su efecto alquilante (Gutierrez & O'Connor, 2021).
- La reparación de roturas de doble cadena (DSB) se realiza principalmente a través de dos mecanismos: la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end-joining*) y la recombinación homóloga (HR). La NHEJ une directamente los extremos rotos del ADN sin requerir una secuencia homóloga, aunque es más propensa a errores (Scully et al., 2019). En cambio, la HR es un proceso más preciso que utiliza una cadena homóloga como molde para restaurar la secuencia original (Kowalczykowski, 2015).

La activación de estas vías de reparación compromete la eficacia de terapias genotóxicas como la quimioterapia y la radioterapia. Al permitir que las células tumorales detecten y reparen el daño inducido en el ADN, estos mecanismos favorecen su supervivencia y promueven la progresión del tumor.

1.5. Papel de PARP en la reparación del ADN

La familia de proteínas polimerasa de poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) está compuesta por 17 enzimas nucleares. En concreto, la enzima PARP-1 desempeña un papel central en la detección y

reparación de SSB, por lo que se ha convertido en un marcador pronóstico asociado a una baja supervivencia en algunos pacientes (Lesueur et al., 2019).

PARP-1 desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la estabilidad genómica y actúa como un sensor de daño del ADN. Tras un daño inducido por estrés oxidativo o agentes alquilantes, PARP-1 se activa y sintetiza el polímero PAR, reclutando diferentes nucleasas específicas en los sitios de daño del ADN para facilitar la reparación. Este proceso puede involucrar la BER, la NER a través de la ADP-ribosilación, o la reparación de DSB. Alternativamente, puede desencadenar la degradación del ADN, lo que conduce a la muerte celular (**Figura 1**) (Y. Wang et al., 2019).

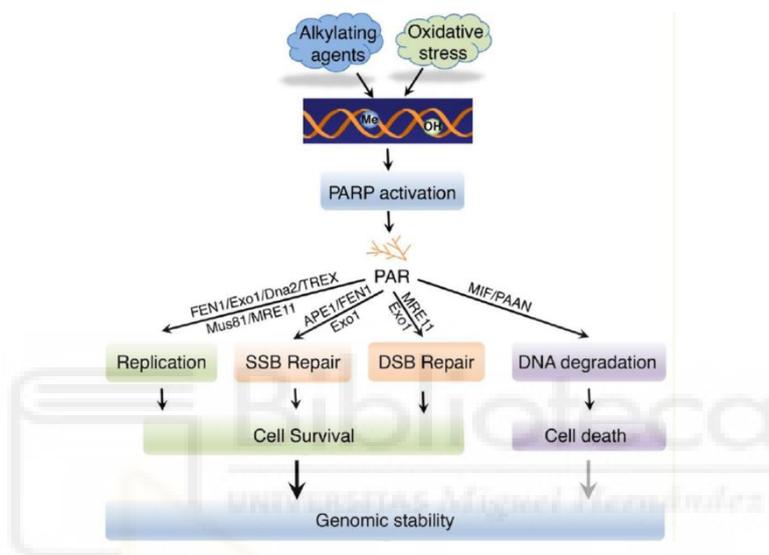


Figura 1. Implicación de PARP-1 en la estabilidad genómica de la célula (Y. Wang et al., 2019).

Además de su papel en la reparación del ADN, PARP tiene otras funciones relevantes. PARP-1 facilita diversas respuestas inflamatorias promoviendo la expresión de diversos genes como citocinas y moléculas de adhesión. También remodela la cromatina y modula la transcripción (Ba & Garg, 2011; Luo & Kraus, 2012).

La sobreexpresión o hiperactividad de PARP-1 en tumores como el GBM puede favorecer la reparación del daño inducido por quimioterapia o radioterapia, contribuyendo así con la resistencia terapéutica y a una peor respuesta clínica (Lesueur et al., 2019).

En este contexto, los inhibidores de PARP (iPARP) han surgido como una estrategia terapéutica prometedora. Estos compuestos bloquean la actividad catalítica de PARP-1, impidiendo la reparación de las SSB. Como consecuencia, estas roturas pueden convertirse en DSB durante la replicación. En células con deficiencias en la HR, este daño no puede ser reparado adecuadamente, llevando a la muerte celular por letalidad sintética. Además, algunos de estos inhibidores provocan el atrapamiento

de PARP sobre el ADN dañado, generando un complejo PARP-ADN, que bloquea la horquilla de replicación y aumenta aún más la toxicidad (Knelson et al., 2021; Murai et al., 2012).

Diversos estudios han demostrado que los iPARP pueden sensibilizar las células de GBM a la radioterapia, potenciar el efecto de agentes alquilantes como la TMZ y superar mecanismos de resistencia dependientes de la reparación del ADN, lo que los convierte en una opción terapéutica de gran interés (Lesueur et al., 2019).

1.6. *SLFN11* como biomarcador de sensibilidad terapéutica

El gen *SLFN11* (*Schlafen 11*) pertenece a la familia de genes *Schlafen*, cuyas proteínas están reguladas por interferón (Valdez et al., 2019).

SLFN11 participa en diversas funciones celulares, como la sensibilización al daño del ADN, la inhibición de la replicación tumoral, y la activación de apoptosis tras estrés replicativo. Además, actúa como una ribonucleasa inducida por interferón y contribuye a la inmunidad innata (P. Zhang et al., 2024).

En ausencia o baja expresión de *SLFN11*, las células muestran una menor propensión a iniciar apoptosis tras sufrir daño en el ADN, lo que se traduce en una menor sensibilidad a fármacos citotóxicos (Valdez et al., 2019). Este silenciamiento suele deberse a mecanismos epigenéticos, como la metilación del promotor, la desacetilación y la metilación de histonas (**Figura 2**), lo que se ha relacionado con peor pronóstico y resistencia a múltiples terapias en varios tipos de cáncer (Scattolin et al., 2024).

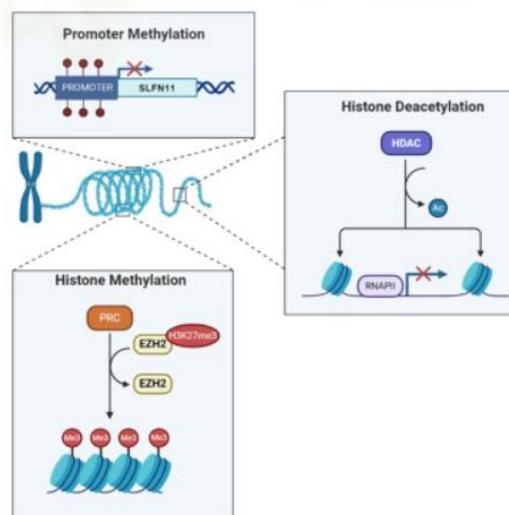


Figura 2. Mecanismos epigenéticos de silenciamiento de *SLFN11* (Scattolin et al., 2024).

SLFN11 sensibiliza a las células a una amplia gama de fármacos anticancerígenos, ya que bloquea irreversiblemente la replicación durante el estrés replicativo. Esta acción favorece la eliminación de las células que expresan altos niveles de *SLFN11* con fármacos que inducen daño en el ADN, como los iPARP, los inhibidores de topoisomerasas y otras quimioterapias dirigidas al ADN.

Por tanto, *SLFN11* ha surgido como un biomarcador prometedor de la sensibilidad terapéutica, ya que su expresión elevada se correlaciona con una mayor respuesta a terapias genotóxicas (Coleman et al., 2021; Kanagavalli et al., 2025; B. Zhang et al., 2021).

Su evaluación clínica puede ser clave para predecir la eficacia de determinados tratamientos, facilitando enfoques más personalizados y efectivos (Scattolin et al., 2024).

2. Antecedentes y objetivos

La combinación de iPARP con agentes que inducen daño en el ADN, como la TMZ, ha mostrado un potencial prometedor en el tratamiento de gliomas. Estudios recientes han demostrado que el iPARP Olaparib potencia la eficacia de la TMZ y la radioterapia en modelos de GBM, actuando como sensibilizador al daño en el ADN. Por ejemplo, un estudio *in vitro* realizado sobre líneas celulares de GBM resistentes a la TMZ logró restaurar la citotoxicidad, reduciendo la viabilidad celular y promoviendo apoptosis (Higuchi et al., 2020). De manera similar, otro estudio confirmó estos hallazgos en modelos *in vivo*, observando una disminución significativa del crecimiento tumoral cuando Olaparib se combinaba con TMZ (Zampieri et al., 2021). Olaparib ha demostrado también capacidad para radiosensibilizar selectivamente células tumorales en proliferación, sin afectar de forma significativa al tejido cerebral sano, lo que refuerza su interés terapéutico en GBM (Lesueur et al., 2019).

En otros tipos de cáncer, como el cáncer de ovario, mama, próstata o páncreas con mutaciones en *BRCA1/2*, el uso de iPARP ha sido aprobado como terapia de mantenimiento, mostrando mejoras en la supervivencia libre de progresión (Banerjee et al., 2021; de Bono et al., 2020; Golan et al., 2019; Poveda et al., 2021). La investigación en tumores sin estas mutaciones ha generado interés por biomarcadores alternativos, como *SLFN11*.

SLFN11 ha sido identificado como un biomarcador clave de sensibilidad a iPARP en diversos modelos tumorales, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas, donde su expresión se ha correlacionado con sinergia entre Olaparib y TMZ (Lok et al., 2017). También se han reportado resultados similares en mesotelioma, donde la combinación de iPARP y quimioterapia mostró mayor eficacia en presencia de *SLFN11* (Rathkey et al., 2020).

Sin embargo, en GBM, la investigación sobre el papel de *SLFN11* es aún limitada. Un estudio reciente demostró que *SLFN11* actúa como regulador negativo de la vía no canónica de NFκB, promoviendo la progresión del GBM al suprimir p21 e inducir marcadores de células madre tumorales (Fischietti et al., 2022). Además, la pérdida de expresión de *SLFN11* se asoció con menor sensibilidad a TMZ y Olaparib, mientras que su expresión parece favorecer la respuesta a estos tratamientos (Sen et al., 2022).

El objetivo principal de este trabajo es evaluar estrategias que potencien el efecto de la quimioterapia y la radioterapia en GBM, mediante el uso de iPARP. Asimismo, se busca determinar si el gen *SLFN11* puede actuar como marcador de sensibilidad a estos inhibidores. Para ello, se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar las líneas celulares de GBM en las que se llevará a cabo el estudio en base a la expresión de *SLFN11*.
2. Evaluar el efecto de la quimio y radioterapia sobre los modelos celulares seleccionados en presencia y ausencia de los iPARP.
3. Determinar si el silenciamiento de *SLFN11* modifica el efecto de la quimio y radioterapia solas o en combinación con los iPARP.
4. Evaluar si la expresión de *SLFN11* podría correlacionarse con la de otros genes implicados en quimio y radioterapia.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron cultivos celulares oncológicos derivados de GBM. En concreto, se utilizaron líneas celulares establecidas a partir de cultivos primarios generados por nuestro grupo de investigación a partir de lavados quirúrgicos de pacientes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE). Las líneas utilizadas fueron HGUE-GB-16, HGUE-GB-18, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 (Ventero et al., 2019).

Las células se cultivaron en frascos de cultivo T25 (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), utilizando el medio DMEM-F12 (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos), una mezcla en proporción 1:1 de DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) y Ham F-12. El medio se suplementó con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y un 1% de mezcla de penicilina y estreptomina (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos).

Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una concentración de CO₂ de aproximadamente 5% y atmósfera humidificada.

3.2. Tratamientos

En este trabajo se realizaron diversos tratamientos para evaluar sus efectos sobre las líneas celulares de GBM. Todos los compuestos utilizados fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich (San Luis, MO, Estados Unidos).

3.2.1. Tratamientos farmacológicos

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con iPARP potencia el efecto de otras terapias, se utilizaron diferentes compuestos. Como iPARP se utilizó Olaparib en un rango de concentraciones de 5 a 20 μM . Para inducir daño en el ADN se utilizó el agente alquilante BCNU (25 μM). Además, se incluyeron tres compuestos como inductores de ferroptosis: erastin (0,5 μM), sorafenib (1 μM) y MMRi62 (0,5 μM).

3.2.2. Radioterapia

El tratamiento con radioterapia se realizó en la Unidad de Oncología Radioterápica del HGUE, utilizando el acelerador lineal de electrones VARIAN 2100c.

Previamente, los pocillos se llenaron con tampón fosfato salino (PBS) con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) por indicación de los radiofísicos del servicio para mimetizar las condiciones presentes en los pacientes irradiados. Las células fueron irradiadas con una dosis de 7 Grays (Gy), aplicada a una tasa de 6 Gy/min. Después de la radiación, el PBS fue sustituido por medio DMEM-F12 y las células se incubaron durante 24 o 96 horas, en función del ensayo celular, a 37°C y 5% de CO_2 .

3.3. Ensayos de proliferación celular

Para evaluar la respuesta celular frente a los distintos tratamientos, se realizaron ensayos colorimétricos de viabilidad y proliferación. Se utilizaron dos metodologías: el ensayo MTT y el ensayo con cristal violeta.

3.3.1. MTT

Este método se basa en la actividad metabólica mitocondrial. El reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es una sal de tetrazolio amarilla que es reducida por la enzima succinato deshidrogenasa en células metabólicamente activas, generando cristales de formazán insolubles de color morado. La formación de estos cristales es directamente proporcional a la cantidad de células viables, y se pueden cuantificar mediante lectura de absorbancia.

Para realizar el ensayo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) a una densidad de 3.000 – 4.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se trataron con diferentes concentraciones de los fármacos, por sextuplicado y se incubaron en las mismas condiciones durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió el reactivo MTT (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a una concentración final de 0,25 mg/mL y se incubó durante 3 horas.

Para solubilizar los cristales de formazán formados, se retiró el medio y se añadieron 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) en cada pocillo. Las placas se

mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm con el lector de placas Eon™ (BioTeK®, Winooski, VT, Estados Unidos).

3.3.2. Cristal violeta

Este ensayo se basa en la unión del cristal violeta a componentes celulares como el ADN y las proteínas, lo que permite estimar el número de células adheridas. Tras los lavados, se eliminan las células muertas o no adheridas, permitiendo cuantificar únicamente las células que permanecen fijadas a la placa.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad entre 80.000 a 110.000 células en cada pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Trascorrido ese tiempo, se añadieron los tratamientos correspondientes y las células se mantuvieron en incubación entre 72 y 96 horas en función del experimento. Después, se sustituyó el medio por medio fresco y se añadió una solución de cristal violeta (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) al 0,1% preparada en formaldehído al 10%, en una proporción del 75% respecto al volumen de medio presente en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Tras la tinción, se lavó con PBS para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar la placa.

Antes de la lectura, se añadió 1 mL de metanol a cada pocillo y se incubó durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para solubilizar el colorante. Finalmente, la absorbancia se midió a 570 nm utilizando el lector multimodo de imágenes celulares Cytation™3 (Biotek Instrument, Winooski, VT Estados Unidos).

3.4. Ensayo de ciclo celular

Para cuantificar el contenido de ADN y determinar la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, se utilizó la citometría de flujo tras la tinción con yoduro de propidio, un agente intercalante fluorescente. Este fluoróforo tiene su pico de excitación a 535 nm (azul / verde) y su máximo de emisión a 617 nm (rojo), permitiendo cuantificar la cantidad de ADN en cada célula y, por tanto, inferir su fase dentro del ciclo celular.

Para preparar las muestras, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 100.000 a 300.000 células por pocillo, en función de la duración del tratamiento, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Tras 24 horas, se aplicaron los tratamientos correspondientes. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las células se recolectaron mediante tripsinización y se fijaron en etanol al 75% a -20°C durante al menos 30 minutos.

Posteriormente, las células fijadas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en una solución que contenía PBS con 25 µg/mL de yoduro de propidio, 25 µg/mL de ARNasa y Tritón X-100 al 0,5%. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 30 minutos y se analizaron en el

citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos). Este equipo permitió medir la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio, distinguiendo las células en fases G1, S y G2/M, así como aquellas en fase subG1, correspondientes con las células muertas cuyo ADN se ha fragmentado.

3.5. Transfección

Para disminuir la expresión de los genes *SLFN11* y *SOCS3*, se realizó una transfección utilizando ARN pequeños de interferencia (siRNA) (Ambion® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) específicos de dichos genes.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de aproximadamente 110.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo con antibiótico y se reemplazó por medio sin antibiótico para evitar interferencias durante la transfección, ya que en este proceso se compromete la integridad de las membranas celulares.

La transfección se realizó con el reactivo Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen™, Waltham, MA, Estados Unidos), que facilita la entrada de los siRNA en las células. Además de los siRNA específicos para cada gen, se utilizó un siRNA inespecífico como control negativo. Para ello, se preparó una mezcla siRNA de 50 pmol/mL de siRNA en Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) y una solución de lipofectamina en Opti-MEM a 20 µL/mL. Ambas soluciones se incubaron por separado durante 5 minutos y, posteriormente, se combinaron y se dejaron reaccionar durante 20 minutos para la formación de los complejos siRNA – Lipofectamina.

Una vez formados los complejos, la mezcla de transfección se añadió a las células alcanzando una concentración final de 5 pmol/mL de siRNA y 2 µL/mL de lipofectamina por pocillo. Las células transfectadas se incubaron en las mismas condiciones durante 48 horas, antes de añadir los tratamientos correspondientes.

Finalizado el tiempo de tratamiento, las muestras se procesaron en función del tipo de análisis que se iba a realizar, ya fuera RT-qPCR o análisis del ciclo celular.

3.6. Análisis de expresión génica

El análisis de expresión génica se realizó con el propósito de analizar los niveles basales de expresión génica o su variación tras los silenciamientos con siRNA.

Este procedimiento incluyó varios pasos: primero se hizo un lisado celular, posteriormente una extracción del ARN total, una transcripción inversa para obtener su ADN complementario (ADNc) y, finalmente una cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), utilizando sondas fluorescentes específicas para cada gen.

3.6.1. Extracción de ARN

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit NZY Total RNA Isolation kit (NZYtech, Lisboa, Portugal).

Previamente, se lisaron las células con una mezcla compuesta por el tampón NR del kit y β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) en una dilución 1:100. Esta solución permite permeabilizar la membrana plasmática, romper los orgánulos celulares e inactivar las RNAsas. El lisado se pasó por columnas de homogeneización NZYSpin y se centrifugó. Al sobrenadante se le añadieron 350 μ L de etanol 70% y la mezcla se transfirió a columnas de unión NZYSpin, donde el ARN se unió a la membrana de la columna.

A continuación, se realizó un lavado con 350 μ L de tampón NI, seguido de la digestión del ADN genómico mediante la adición de 95 μ L de ADNasa I, previamente diluida 1:10 en un tampón de digestión. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizaron tres lavados consecutivos con 200 μ L de NWR1, 600 μ L de NWR2 y 250 μ L de NWR2.

Finalmente, el ARN se eluyó con 40 μ L de agua libre de nucleasas y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se registraron las concentraciones (ng/ μ L) y el índice de pureza 280/260 que debe ser aproximadamente 2,0.

3.6.2. Retrotranscripción (RT)

El ARN total se retrotranscribió a ADNc utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada muestra, se utilizó 1 μ g de ARN y 6,8 μ L de una mezcla compuesta por: 2 μ L de tampón RT, 2 μ L de cebadores aleatorios, 0,8 μ L de mezcla de dNTPs, 1 μ L de transcriptasa inversa y 1 μ L de inhibidor de RNAsas. Finalmente, se añadió agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 20 μ L.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems™ Foster City, CA, Estados Unidos), siguiendo un programa que consta de cuatro etapas: a 25°C durante 10 minutos para el alineamiento de los cebadores con el ARN, seguido de otra etapa a 37°C durante 120 minutos, que es la temperatura de activación de la retrotranscriptasa, otra a 85°C durante 5 minutos para inactivar la retrotranscriptasa y desnaturalizar los cebadores y, finalmente se mantiene en una etapa de conservación de manera indefinida a 4°C.

Tras la retrotranscripción, el ADNc se cuantificó nuevamente con el NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se obtuvieron las concentraciones

(ng/ μ L) y el índice de pureza 260/280 (esperado alrededor de 1,8). Finalmente, las muestras se diluyeron en agua hasta una concentración de 200 ng/ μ L.

3.6.3. PCR cuantitativa en tiempo real

Los niveles de expresión de los genes *SLFN11*, *SOCS3*, *HIF1A* se cuantificaron mediante qPCR utilizando sondas TaqMan específicas (Applied Biosystem™, Foster City, CA, Estados Unidos) y el reactivo NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (NZYtech, Lisboa, Portugal).

Cada reacción se realizó por triplicado en placas de 96 pocillos específicas para este tipo de ensayo. Se utilizó la sonda para *GADPH* como control endógeno y agua libre de nucleasas como control negativo, para asegurar la ausencia de contaminación. Cada pocillo contenía 10 μ L de reactivo Probe Master Mix, 1 μ L de la sonda TaqMan (0,5 μ L para *GADPH*) dirigido frente al gen de estudio, 4 μ L de la muestra de ADNc y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 20 μ L.

Las amplificaciones se realizaron en un equipo QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystem™, Foster City, CA, Estados Unidos) con las siguientes condiciones: activación de la Uracil-N-Glicosilasa (UNG) a 50°C durante 2 minutos para eliminar posibles contaminaciones, después una activación de la polimerasa y una inactivación de UNG a 95°C durante 10 minutos. A continuación, se realizaron 40 ciclos de amplificación, cada uno subdividido en una desnaturalización a 95°C durante 15 minutos y una etapa de hibridación y extensión a 60°C durante 1 minuto.

El resultado de la qPCR proporciona un valor Ct (*Cycle threshold*, en inglés), que indica el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia supere un umbral que establece el propio equipo. Este valor es inversamente proporcional a la expresión del gen diana: a menor Ct, mayor expresión.

La expresión relativa de cada gen se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCt se obtiene restando el Ct de cada gen de interés menos el Ct del control endógeno (*GAPDH*).

3.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 10.4.1. Se realizaron análisis de estadística descriptiva mediante el cálculo de la media y la desviación estándar (DE), con un tamaño muestral de 3 a 6 réplicas por condición. La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de tipo Shapiro-Wilk, considerando una distribución normal cuando se obtuvo un valor p superior a 0,05. Para las comparaciones entre grupos, se aplicaron diferentes pruebas en función de la distribución de los datos: la prueba t de Student se utilizó para comparaciones entre dos grupos cuando los datos presentaban distribución normal y varianzas homogéneas, y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney se aplicó en caso de que los datos presentaran una distribución asimétrica. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con $p \leq 0,05$.

4. Resultados

Objetivo 1: selección de las líneas celulares de GBM en base a la expresión de *SLFN11*

Para investigar el posible papel de *SLFN11* como biomarcador de sensibilidad o resistencia a los tratamientos en GBM, se seleccionaron las líneas celulares en función de su nivel de expresión de este gen. Se realizó un análisis de expresión génica mediante RT-qPCR en las siete líneas celulares de GBM disponibles en el grupo de investigación.

Entre todas las líneas analizadas, la mayor expresión de *SLFN11* se observó en HGUE-GB-18, mientras que la menor correspondió a HGUE-GB-16, con una reducción del $98,8 \pm 0,045\%$ respecto a HGUE-GB-18 (Figura 3). Las otras cinco líneas celulares presentaron niveles de expresión intermedios, que oscilaron entre el 44 y el 73% en comparación con HGUE-GB-18.

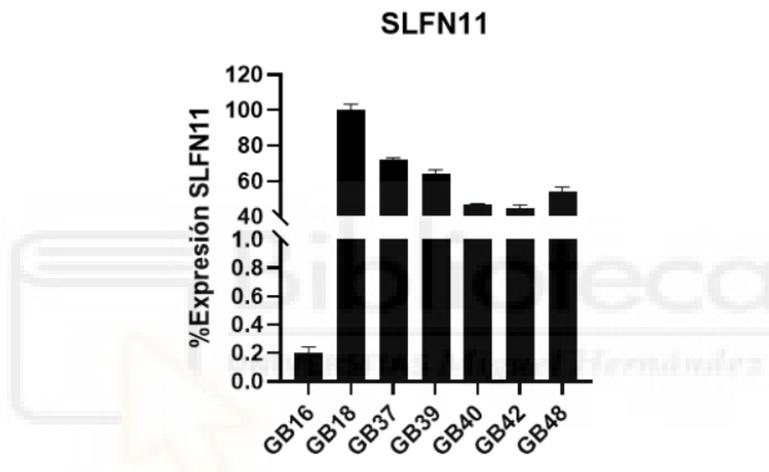


Figura 3. Niveles de expresión de *SLFN11* en las líneas celulares de GBM. Los datos se muestran como la media \pm DE del porcentaje de expresión con respecto a HGUE-GB-18, con $n \geq 3$.

En consecuencia, se seleccionaron HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 para el desarrollo del trabajo. Cabe destacar que HGUE-GB-16 es la única línea celular que no presenta metilación en el promotor del gen *MGMT* (Ventero et al., 2019), lo que la convierte en la línea más resistente a los agentes alquilantes BCNU y TMZ, empleados habitualmente en el tratamiento del GBM.

Objetivo 2: evaluación de la quimio y radioterapia en presencia y ausencia de iPARP

Inicialmente, se evaluó el efecto del Olaparib, un iPARP, en la proliferación celular de las líneas seleccionadas. Para ello, se realizaron ensayos de MTT utilizando concentraciones de Olaparib entre 5 y 40 μM (Figura 4). A concentraciones superiores a 10 μM , se observó una disminución progresiva y significativa de la proliferación celular en ambas líneas. En particular, a 10 μM , la proliferación fue del $88,1 \pm 8,9\%$ con respecto al control para HGUE-GB-16 y del $88,8 \pm 10,4\%$ para HGUE-GB-18. A la dosis más elevada, 40 μM , la proliferación disminuyó hasta un $58,3 \pm 5,6\%$ con respecto al control en HGUE-GB-16 y un $68,9 \pm 9,5\%$ en HGUE-GB-18. Estos resultados sugieren que HGUE-GB-16 podría ser más

sensible al efecto del Olaparib. Para los experimentos posteriores, se seleccionó la dosis de 10 μM ya que era la más alta que no causaba una inhibición significativa de la proliferación celular por sí misma.

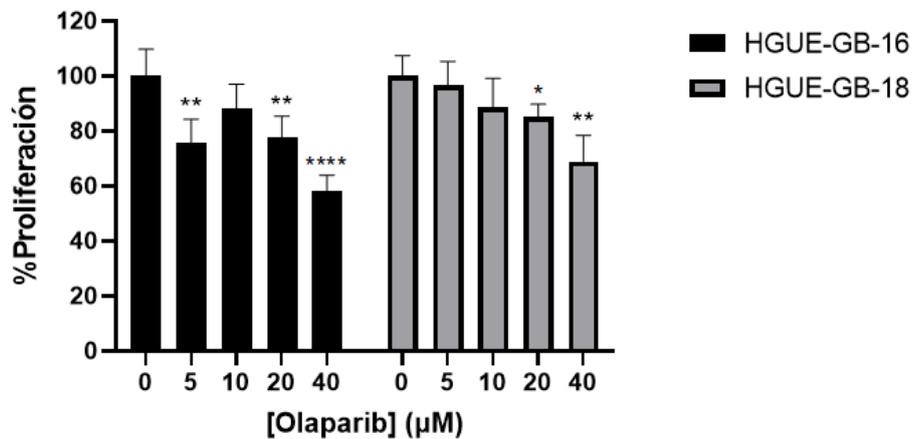


Figura 4. Efecto del Olaparib sobre la proliferación celular en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18. Las células se trataron con Olaparib (5-40 μM) durante 72 h. Los datos representan la media \pm DE del porcentaje de proliferación con respecto al control, con $n \geq 6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$.

A continuación, se analizó el posible efecto sinérgico entre Olaparib y otros agentes capaces de inducir daño en el ADN. Para ello, se utilizaron tres inductores de ferroptosis (Erastin, Sorafenib y MMRI62) y el agente alquilante BCNU, combinados con 10 μM de Olaparib. La proliferación celular se evaluó mediante ensayos de MTT en ambas líneas celulares, comparando las respuestas de los fármacos combinados o no con Olaparib (**Figura 5**).

El tratamiento con BCNU (10 μM) solo redujo la proliferación celular al $79,5 \pm 5,6\%$ en HGUE-GB-16 y al $73,8 \pm 11,7\%$ en HGUE-GB-18. La combinación con Olaparib potenció este efecto, reduciéndola aún más al $54,2 \pm 2,5\%$ en HGUE-GB-16 y al $53,9 \pm 6,6\%$ en HGUE-GB-18. Este resultado sugiere un efecto aditivo de ambos fármacos en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18.

En relación con los otros fármacos, no se observó un efecto adicional al combinarlos con Olaparib en HGUE-GB-16 (**Figura 5A**). Sin embargo, en HGUE-GB-18, tanto Sorafenib como MMRI62 mostraron un efecto aditivo al combinarse con Olaparib. La proliferación celular fue del $87,8 \pm 9,9\%$ con Sorafenib solo y del $63,3 \pm 8,4\%$ en combinación con Olaparib; y del $76,1 \pm 6,4\%$ con MMRI62 solo, reduciéndose al $60,4 \pm 8,5\%$ al combinarse con Olaparib (**Figura 6B**).

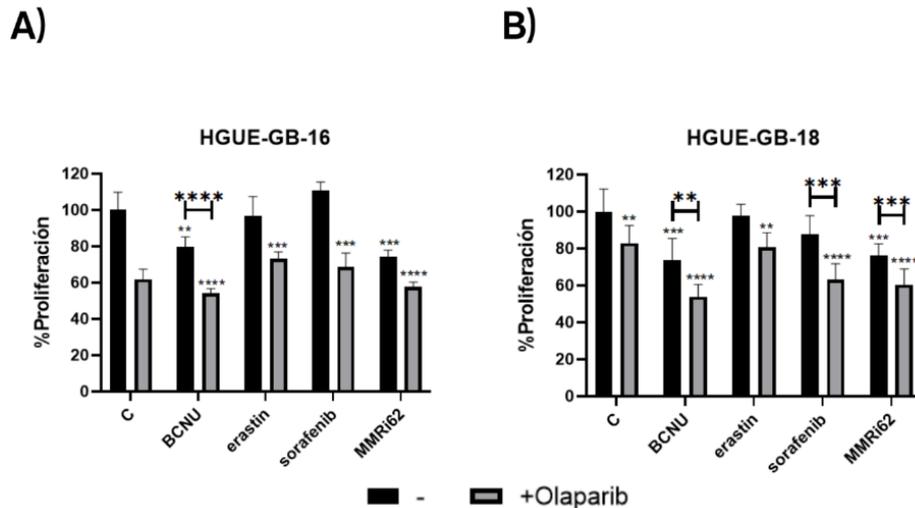


Figura 5. Efecto de la combinación de Olaparib con agentes que inducen daño en el ADN en HGUE-GB-16 (A) y HGUE-GB-18 (B). Las células se trataron durante 72 h con Olaparib (10 μ M), BCNU (10 μ M), Erastin (0,5 μ M), Sorafenib (1 μ M) y MMRi62 (0,5 μ M), solos o en combinación. Los datos representan la media \pm DE del porcentaje de proliferación con respecto al control, con $n \geq 6$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Impacto de la inhibición de PARP en la eficacia de agentes quimioterapéuticos

Con el fin de analizar si la disminución de la proliferación celular observada con la combinación de BCNU y Olaparib se debe a un efecto citotóxico (muerte celular), citostático (bloqueo en fases del ciclo celular) o a una combinación de ambos, se realizaron ensayos de ciclo celular en las líneas celulares de GBM a diferentes tiempos de tratamiento. La evaluación en diferentes puntos temporales permitió comprobar si un posible efecto citostático inicial se traducía posteriormente en un incremento de la muerte celular.

Tras 24 horas de tratamiento (**Figura 6A**), BCNU causó un aumento significativo del porcentaje de células en fase S ($11,2 \pm 0,6\%$) y un ligero incremento en G2/M ($4,8 \pm 0,5\%$) en la línea HGUE-GB-18. En cambio, en HGUE-GB-16, que es resistente a este tratamiento, solo se observó un pequeño aumento en la fase G2/M ($8,9 \pm 0,6\%$). El tratamiento con Olaparib produjo un leve aumento de la fase S en ambas líneas celulares, junto con un aumento de la fase G2/M ($7,2 \pm 0,5\%$) en HGUE-GB-16. La combinación de BCNU con Olaparib aumentó el porcentaje de células en fase S en HGUE-GB-18 respecto a los tratamientos individuales, mientras que en HGUE-GB-16 se observó un claro bloqueo en dicha fase. Estos resultados sugieren que el Olaparib podría estar revirtiendo la resistencia al BCNU en esta línea celular.

Al extender el tratamiento a 48 horas, se evaluó si Olaparib mantenía o potenciaba el efecto del BCNU a lo largo del tiempo (**Figura 6B**). En este punto, BCNU indujo un aumento en la fase G2/M ($37,5 \pm 5,5\%$) junto con un incremento en el porcentaje de células muertas en HGUE-GB-18. En cambio, en HGUE-GB-16 el efecto fue inferior al observado tras 24 horas de tratamiento, lo que sugiere que, en lugar de

morir, las células podrían haber revertido los efectos del BCNU. La combinación de ambos fármacos modificó el efecto en la fase G2/M tanto en HGUE-GB-16 ($31,3 \pm 12,9\%$) como en HGUE-GB-18 ($51,2 \pm 2,7\%$), pero el leve aumento del porcentaje de células muertas observado con BCNU ($14,3 \pm 6,6\%$) en esta última desapareció. Por tanto, Olaparib no pareció potenciar el efecto del BCNU en esta condición.

Finalmente, tras 72 horas de tratamiento, BCNU causó un aumento significativo de la muerte celular en HGUE-GB-18, junto con un leve incremento de la proporción de células en fase G2/M y de la muerte celular en HGUE-GB-16 (**Figura 6C**). Olaparib también mostró efecto, causando un incremento tanto en la proporción de células en fase G2/M como en la muerte celular. Sin embargo, la combinación de ambos fármacos pareció ejercer un efecto protector en HGUE-GB-18, reduciendo la citotoxicidad observada con los tratamientos individuales y aumentando el bloqueo en G2/M. En cambio, en HGUE-GB-16 sí se observó un aumento significativo de la fase G2/M en comparación con el tratamiento con BCNU en monoterapia.



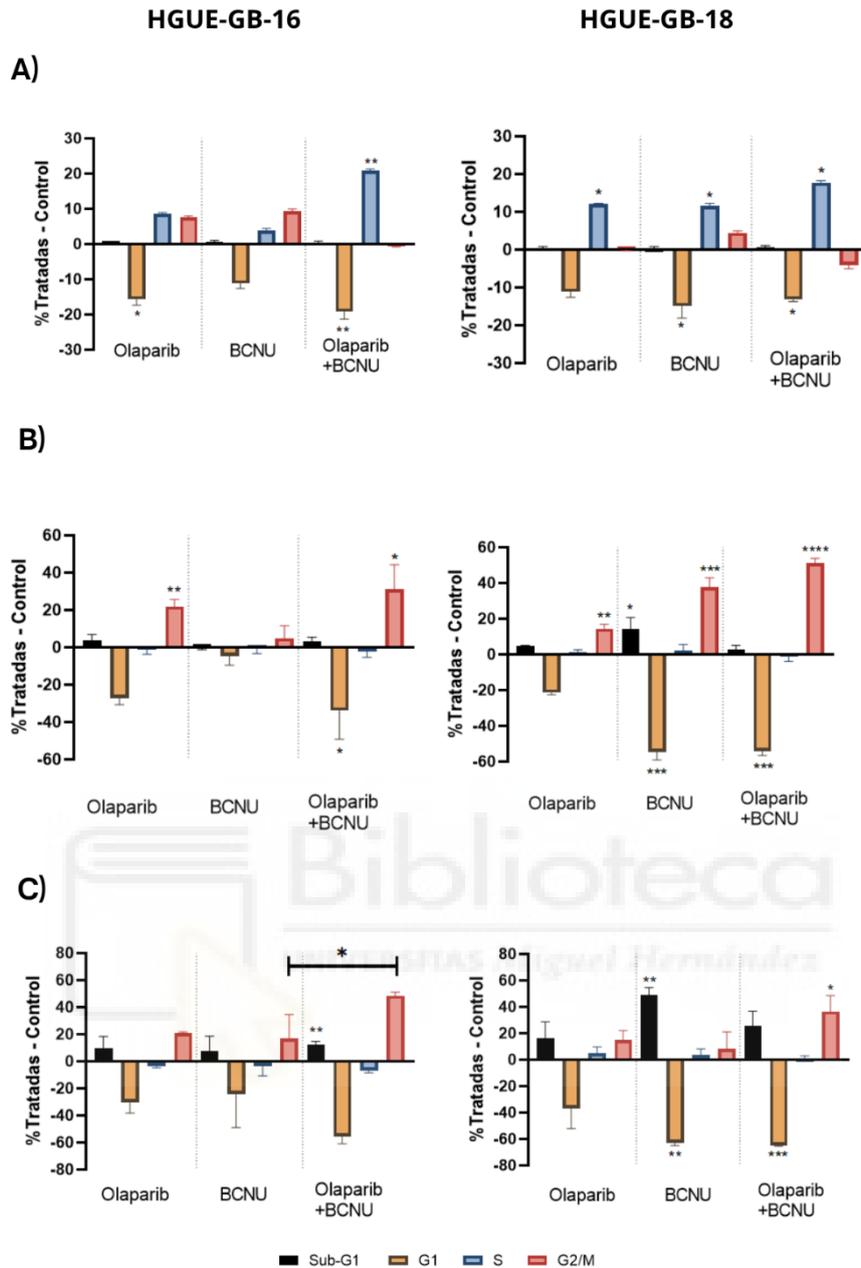


Figura 6. Efecto de Olaparib y BCNU, solos y en combinación, sobre el ciclo celular en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 a diferentes tiempos. Las células se trataron con Olaparib (40 μ M) y BCNU (25 μ M) durante 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C). Los datos representan la media \pm DE del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con respecto al control sin tratar, con $n \geq 3$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Dado que no se observaron los efectos esperados en el análisis del ciclo celular, se evaluó el impacto de Olaparib en combinación con BCNU mediante un ensayo de cristal violeta para estimar el efecto sobre la densidad celular (**Figura 7**). En comparación con el control, BCNU redujo el porcentaje de células al $94,5 \pm 9,4\%$ en HGUE-GB-16 y al $74,2 \pm 8,9\%$ en HGUE-GB-18. La combinación con Olaparib provocó una disminución adicional, alcanzando un $73,1 \pm 10,6\%$ en HGUE-GB-16 y un $61,3 \pm 6,2\%$ en HGUE-GB-18.

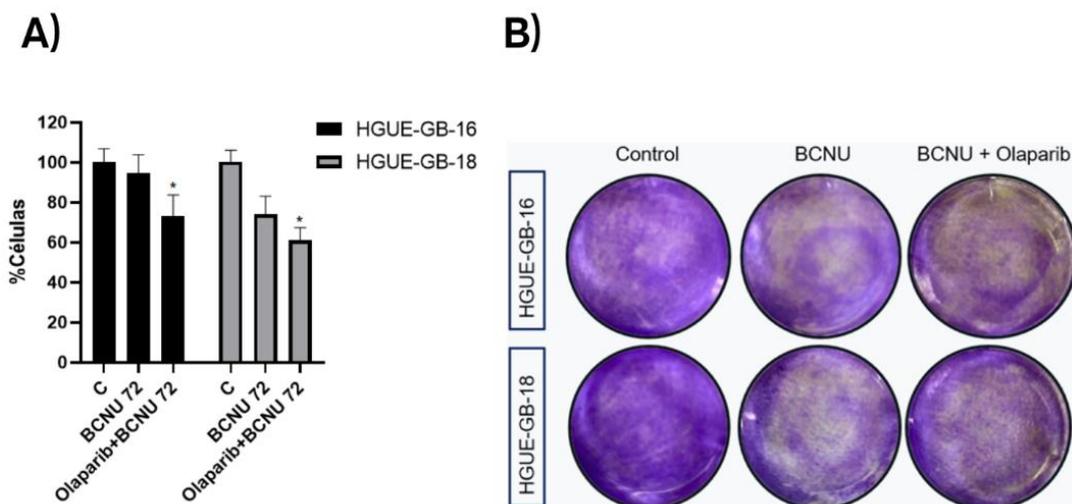


Figura 7. Efecto de Olaparib y BCNU, solos y en combinación, sobre la densidad celular en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18. Las células se trataron con Olaparib (40 μ M) y BCNU (25 μ M) durante 72 h. **A)** Se representa la media \pm DE del porcentaje de células, con respecto al control, con $n \geq 3$. **B)** Imágenes representativas del ensayo. * $p < 0,05$.

Impacto de la inhibición de PARP en la eficacia de la radioterapia

Uno de los tratamientos más utilizados frente al GBM es la radioterapia, que ejerce su efecto principalmente a través de la inducción de daño el ADN. Se evaluó si Olaparib es capaz de potenciar el daño causado por la radioterapia, incrementado así su eficacia.

Para ello, se realizó un ensayo preliminar en la línea HGUE-GB-18 con el fin de determinar el momento óptimo de administración de Olaparib en relación con la radioterapia. Se evaluaron cuatro condiciones: 24 horas antes, 2 horas antes, 2 horas antes y después de la radioterapia, y únicamente después de la irradiación. La radioterapia, tras 24 horas, mostró un efecto citostático caracterizado por un bloqueo en la fase G2/M. Este efecto se incrementó levemente únicamente cuando Olaparib fue administrado 2 horas antes de la radioterapia. Por el contrario, su administración posterior pareció contrarrestar el efecto de la radiación, con un aumento en la fase S y desaparición del bloqueo en G2/M (**Figura 8A**). En base a estos resultados, se seleccionó la condición de tratamiento con Olaparib 2 horas antes de la radioterapia para los experimentos posteriores.

A continuación, se evaluó el efecto sobre el ciclo celular del tratamiento combinado en ambas líneas celulares, aplicando Olaparib 2 horas antes de la radioterapia (**Figura 8B, C**). Como cabría esperar por los resultados anteriores, Olaparib por sí solo no mostró ningún efecto significativo en la distribución del ciclo celular. La radioterapia, en cambio, indujo un aumento significativo en la proporción de células en fase G2/M en ambas líneas celulares. Sin embargo, la combinación con Olaparib no potenció este efecto, manteniéndose una distribución similar a la inducida por la radioterapia sola.

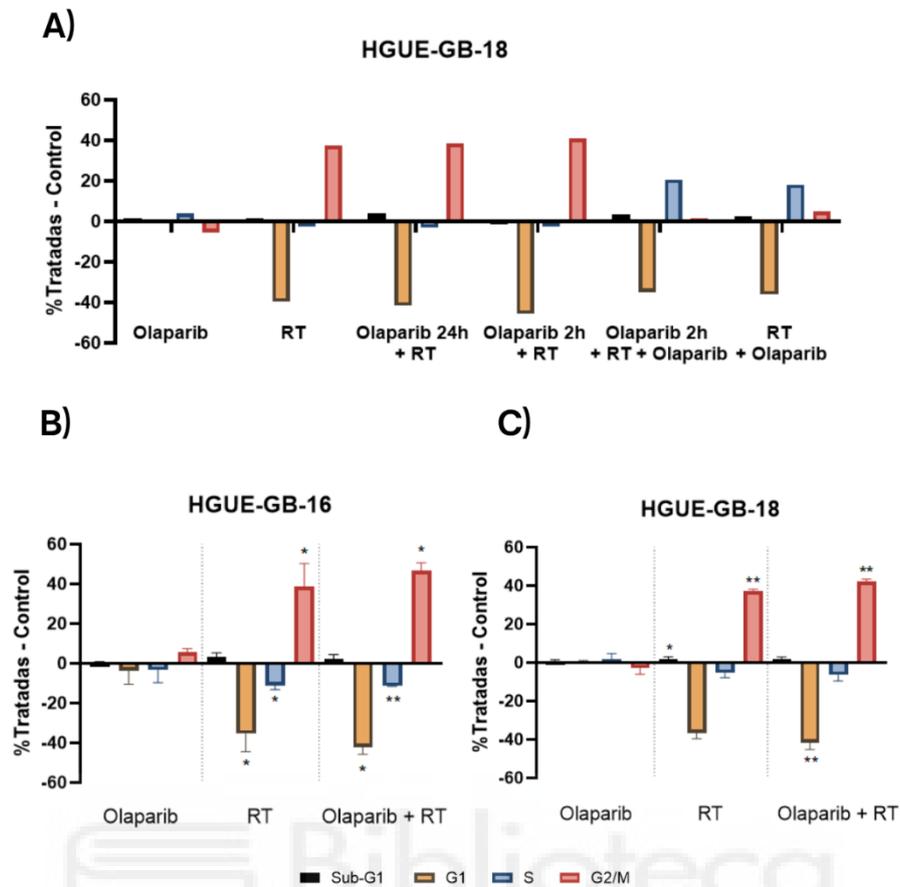


Figura 8. Efecto de la combinación de Olaparib con radioterapia sobre el ciclo celular. A) La línea celular HGUE-GB-18 se trató con Olaparib (40 μ M) en diferentes condiciones temporales: 24 h antes, 2 h antes, 2 h antes y después, o únicamente después de la radioterapia (RT). Posteriormente, se mantuvo el tratamiento durante 24 h. **B y C)** Las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 se trataron con Olaparib (40 μ M) 2 horas antes de la radioterapia (RT), y el tratamiento se mantuvo durante 24 h. Los datos representan la media \pm DE del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con respecto al control sin tratar, con $n \geq 3$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Con el fin de evaluar un posible efecto potenciador del Olaparib sobre la radioterapia, se realizó un ensayo de cristal violeta tras 72 horas de tratamiento en ambas líneas celulares (**Figura 9**). La radioterapia redujo el porcentaje de células viables al $71,9 \pm 14,7\%$ en HGUE-GB-16 y al $70,4 \pm 26,7\%$ en HGUE-GB-18, con respecto al control. La administración de Olaparib 2 horas antes de la radioterapia no mostró ningún efecto sobre la densidad celular. En cambio, el tratamiento con Olaparib 2 horas antes y tras la radioterapia sí produjo una reducción significativa del porcentaje de células al $54 \pm 6,6\%$ en HGUE-GB-16 y al $60,3 \pm 17\%$ en HGUE-GB-18 con respecto al control. Sin embargo, en ninguno de los casos se observó un aumento del efecto de la radioterapia. Por el contrario, la combinación de Olaparib 2 horas antes y después de la radioterapia pareció ejercer un ligero efecto protector, atenuando la reducción de la densidad celular observada con Olaparib solo.

En conjunto, estos resultados confirman que tanto la radioterapia como Olaparib ejercen efectos por sí mismos, pero su combinación no produce una mejora del efecto de la radioterapia.

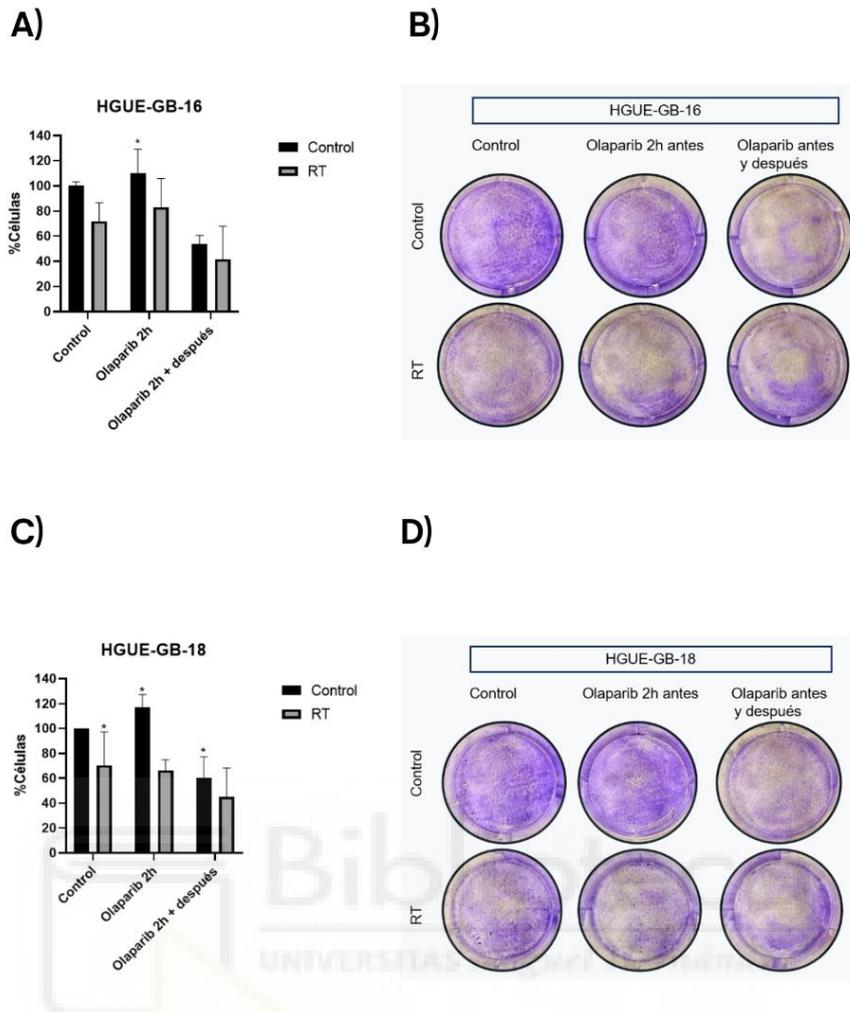


Figura 9. Efecto de Olaparib en combinación con radioterapia sobre la densidad celular. Las líneas celulares HGUE-GB-16 (A) y HGUE-GB-18 (C) se trataron con Olaparib (40 μ M) y radioterapia durante 72 h. El Olaparib se añadió 2 h antes o 2 h antes y después de la radioterapia (RT). Los datos representan la media \pm DE del porcentaje de células con respecto al control, con $n \geq 3$. B, D) Imágenes representativas del ensayo en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18, respectivamente. * $p < 0,05$.

Objetivo 3: relación del silenciamiento de *SLFN11* con el efecto de la radioterapia y combinado con iPARP.

Para determinar si *SLFN11* podría estar implicado en la respuesta a la radioterapia, se silenció mediante la transfección con un siRNA en ambas líneas de GBM. Para confirmar la efectividad de este silenciamiento, se analizó su expresión génica mediante RT-qPCR.

El silenciamiento de *SLFN11* redujo su expresión en un $86,9 \pm 0,9\%$ en la línea HGUE-GB-16 y en un $90,6 \pm 1\%$ en HGUE-GB-18, en comparación con el control transfectado con siRNA NS (Figura 10), confirmando la eficacia del silenciamiento.

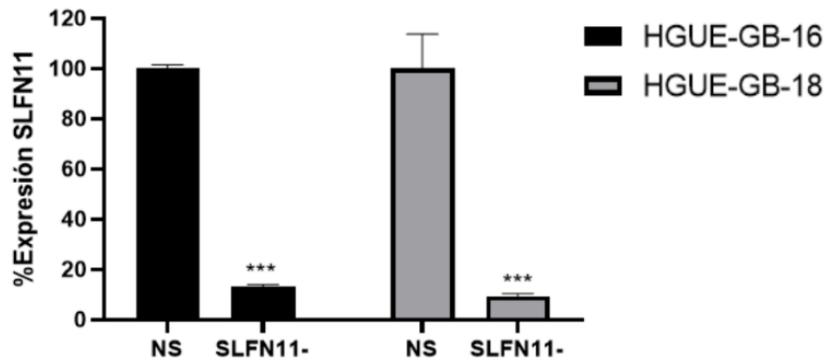


Figura 10. Niveles de expresión de *SLFN11* en HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 tras el silenciamiento. Los datos se muestran como la media \pm DE del porcentaje de expresión con respecto a NS, con $n \geq 3$. *** $p < 0,001$.

Una vez confirmada la efectividad de la transfección, se realizaron ensayos de ciclo celular tras el silenciamiento de *SLFN11*, evaluando su efecto sobre la radioterapia y en combinación con Olaparib.

El silenciamiento de *SLFN11* no produjo modificaciones relevantes en la distribución de células en el ciclo celular (**Figura 11A**). Sin embargo, al añadir Olaparib, se observó un aumento de la proporción de células en fase G2/M en ambas líneas celulares, siendo significativo únicamente en HGUE-GB-18.

En respuesta a la radioterapia, y en línea con los resultados previos (**Figura 8**), se observó un aumento significativo en la fase G2/M con respecto al control en ambas líneas celulares (**Figura 11B**). No obstante, la combinación con Olaparib no produjo un aumento adicional de esta fase con respecto a la radioterapia sola. Por otro lado, cuando se aplicó la radioterapia tras el silenciamiento de *SLFN11*, se observó una ligera disminución en la proporción de células en G2/M en comparación con la radioterapia sola en ambas líneas celulares, aunque esta diferencia no fue significativa. Del mismo modo, la combinación de Olaparib y radioterapia en las células silenciadas tampoco mostró cambios significativos en la distribución del ciclo celular (**Figura 11B**).

En conjunto, estos resultados podrían indicar que el efecto de la radioterapia está influenciado por los niveles de expresión de *SLFN11*, mientras que Olaparib no parece potenciar la respuesta a la radioterapia tras el silenciamiento de este gen.

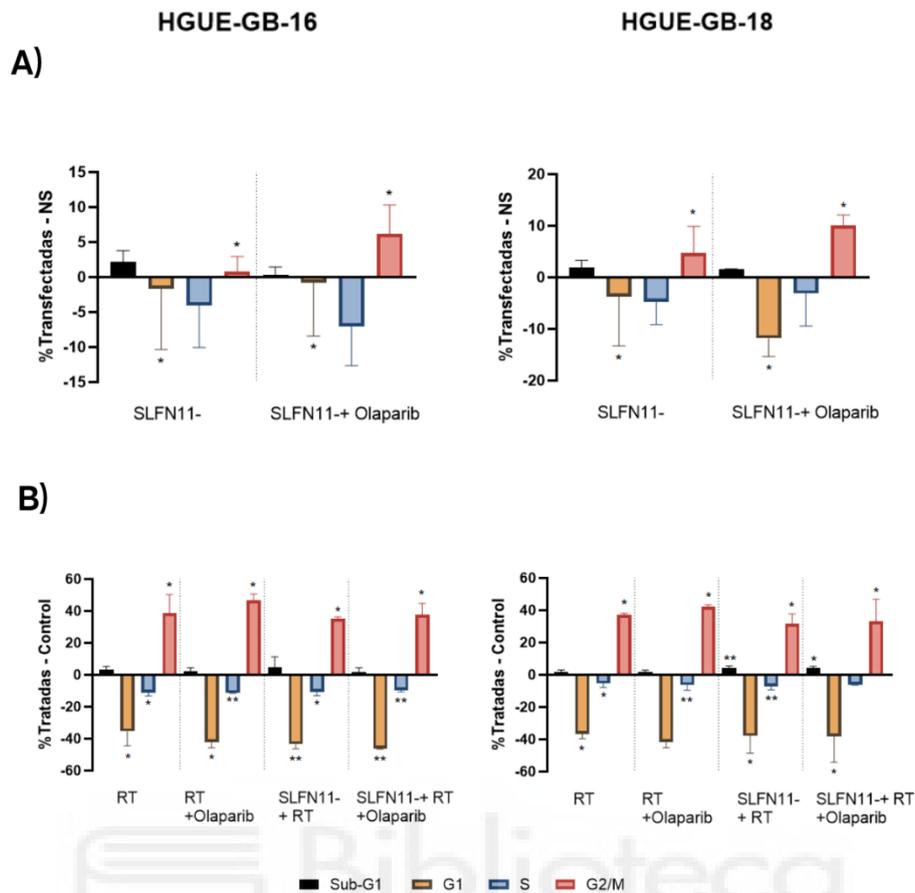


Figura 11. Efecto del silenciamiento de *SLFN11* y de Olaparib sobre la respuesta al tratamiento con radioterapia en el ciclo celular de HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18. A) Las células se transfectaron con un siRNA frente a *SLFN11*, con o sin tratamiento con Olaparib (40 μ M). Se representa la media \pm DE del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con respecto al control transfectado con siRNA NS ($n \geq 3$). **B)** Las células se trataron con radioterapia (RT) sola o en combinación con Olaparib y/o el silenciamiento de *SLFN11*. Se representa la media \pm DE del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con respecto al control sin tratar ($n \geq 3$). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Objetivo 4: correlación de la expresión de *SLFN11* con otros genes implicados en radioterapia

Para estudiar una posible correlación de *SLFN11* con otros genes implicados en la respuesta a la radioterapia, se analizaron varios candidatos. Entre ellos, se incluyó *SOCS3*, previamente descrito como un predictor de supervivencia en pacientes con GBM (Zhou et al., 2007), y cuya relación con la radiorresistencia fue demostrada por nuestro grupo de investigación (Ventero et al., 2019). También se analizó *HIF1A*, dada su implicación en la hipoxia, un factor bien establecido en la radiorresistencia tumoral. En estudios previos, se ha demostrado que la disminución de su expresión se asocia con una mayor radiosensibilidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Gérard et al., 2019; Wei et al., 2023).

En la línea HGUE-GB-16, tras el silenciamiento de *SLFN11*, *SOCS3* mostró una disminución de su expresión del $6,5 \pm 28,7\%$ con respecto al control transfectado con un siRNA NS, mientras que en HGUE-GB-18 se observó un aumento del $8,7 \pm 15,4\%$ (**Figura 12A**). En cuanto a *HIF1A*, también tras el

silenciamiento de *SLFN11*, se observó un aumento en la expresión en ambas líneas celulares, de un $30,4 \pm 35,4\%$ en HGUE-GB-16 y un $47,3 \pm 25,6\%$ en HGUE-GB-18, en comparación con el control NS (**Figura 12B**).

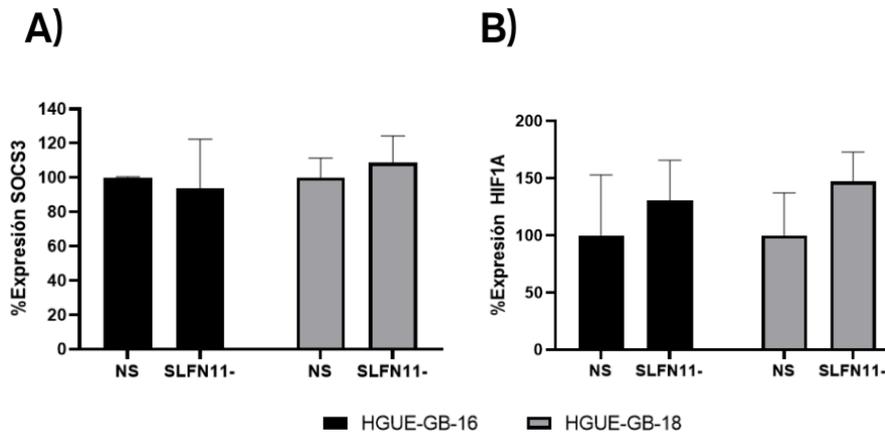


Figura 12. Niveles de expresión de *SOCS3* (A) e *HIF1A* (B) en las líneas celulares HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18, tras el silenciamiento de *SLFN11*. Los datos se muestran como la media \pm DE del porcentaje de expresión con respecto al control transfectado con un siRNA NS, con $n \geq 3$.

Dado el posible vínculo entre *SOCS3* y *SLFN11*, se decidió determinar si la expresión de *SLFN11* se veía afectada tras el silenciamiento de *SOCS3* en las líneas celulares de GBM, con el objetivo de comprobar una posible correlación entre ambos genes. En comparación con el control transfectado con un siRNA NS, la línea HGUE-GB-18 mostró una reducción del $68 \pm 1,5\%$ en la expresión de *SOCS3* (**Figura 13A**) y del $56,1 \pm 1,6\%$ en la de *SLFN11* (**Figura 13B**).

Con la finalidad de comprobar si esta posible correlación también se presentaba en otras líneas celulares de GBM, se analizó la expresión de ambos genes en HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 tras el silenciamiento de *SOCS3*. Se observó una disminución de *SOCS3* del $84,1 \pm 1,5\%$ y del $66,7 \pm 7,9\%$ en HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42, respectivamente (**Figura 13**), junto con una reducción de *SLFN11* del $73,9 \pm 4,2\%$ y del $46,8 \pm 5,7\%$ en dichas líneas celulares en comparación con el control NS.

En conjunto, estos resultados sugieren una posible regulación cruzada entre *SOCS3* y *SLFN11*, lo que podría implicar la existencia de rutas moleculares compartidas implicadas en mecanismos de resistencia en el GBM.

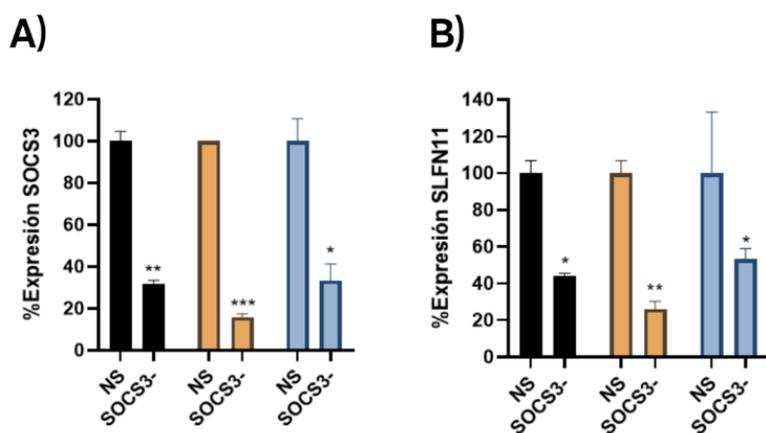


Figura 13. Niveles de expresión de *SOCS3* (A) y *SLFN11* (B) tras el silenciamiento de *SOCS3* en las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42. Los datos se muestran como la media \pm DE del porcentaje de expresión con respecto al control transfectado con siRNA NS, con $n \geq 3$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4. Discusión

La limitada eficacia de los tratamientos convencionales frente al GBM, debida fundamentalmente al desarrollo de radio y quimiorresistencia, continúa representando un obstáculo que repercute negativamente en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Por ello, es necesario identificar nuevas dianas terapéuticas y tratamientos innovadores que mejoren los resultados clínicos. En esta dirección, el presente trabajo se ha centrado en el uso del iPARP Olaparib y el silenciamiento de *SLFN11*, dada su potencial implicación en la sensibilización a la quimioterapia y radioterapia, así como en la identificación de marcadores de respuesta a los tratamientos.

Los iPARP han sido ampliamente investigados por su capacidad para potenciar el daño en el ADN inducido por la quimio y radioterapia, dificultando su reparación y promoviendo la muerte celular (Miknyoczki et al., 2007). Algunos de estos inhibidores, como Olaparib, ya han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de tumores como los de mama, ovario, próstata y páncreas (Soung & Chung, 2023; Nambiar et al., 2023). Además, diversos ensayos clínicos están explorando combinaciones de iPARP con radioterapia o quimioterapia en otros tipos de cáncer, como el de pulmón, páncreas o el cáncer de mama triple negativo, mostrando efectos sensibilizadores y mejorando la eficacia terapéutica (Jannetti et al., 2020; Sun et al., 2023; Argiris et al., 2021; Loap et al., 2022; Tuli et al., 2019).

En los resultados obtenidos en este trabajo, Olaparib por sí mismo mostró un efecto antiproliferativo (**Figura 4**). En el análisis del ciclo celular, se observó inicialmente una detención en la fase S en ambas líneas celulares a las 24 horas (**Figura 6A**), en concordancia con estudios previos (Noël et al., 2006; Dhanavath et al., 2025). A 48 horas, el bloqueo se desplazó a la fase G2/M (**Figura 6B**) y, finalmente, se indujo muerte celular a las 72 horas (**Figura 6C**), lo que concuerda con lo reportado por Karpel-Massler et al. (2014).

Al combinar Olaparib con BCNU, se observó un incremento del bloqueo en fase S a las 24 horas, fundamentalmente en la línea HGUE-GB-16 (**Figura 6A**), como también observaron Alexander et al. (2011) en diversas líneas celulares y modelos de xenoinjertos. Posteriormente, se detectó un ligero aumento del bloqueo en G2/M a las 48 horas (**Figura 6B**). En HGUE-GB-16, la combinación aumentó el bloqueo en G2/M y la muerte celular con respecto al BCNU en monoterapia a las 72 horas (**Figura 6C**), lo que sugiere una posible reversión de la resistencia, en línea con estudios previos que describen efectos sinérgicos (Tentori et al., 2014). Sin embargo, en HGUE-GB-18 se observó un efecto contrario: disminución de la muerte celular y aumento de G2/M, lo que podría indicar un efecto protector de la combinación en esta línea.

Respecto a la combinación con radioterapia, sólo se observó un ligero aumento de la proporción de células en G2/M cuando Olaparib se administró 2 horas antes de la irradiación (**Figura 8A**), resultado coherente con estudios como los de Kötter et al. (2014) y Miura et al. (2012), que muestran mejores resultados al administrar el fármaco entre 1 y 2 horas antes de la radiación. Sin embargo, en nuestro estudio, la combinación no produjo un aumento significativo del efecto ni a 24 horas (**Figura 8B, C**), ni a 72 horas de tratamiento (**Figura 9**).

Las mutaciones en *BRCA1/2* actúan como predictores de sensibilidad a iPARP en diversos tipos de cáncer como el de mama, ovario y próstata (Carreira et al., 2021; Dilmac & Ozpolat, 2023). Sin embargo, su utilidad en GBM es limitada debido a la baja frecuencia de mutaciones en dichos genes en este tipo de tumor.

En este contexto, el gen *SLFN11* ha emergido como un potencial biomarcador de sensibilidad a los iPARP, ya que se ha observado que aquellos tumores que presentan una mayor expresión son más sensibles al efecto de estos fármacos (Murai et al., 2016). Además, sus niveles de expresión también se han asociado con la sensibilidad a agentes que dañan el ADN, entre los que se encuentran los agentes alquilantes (Zoppoli et al., 2012). En este trabajo, se seleccionaron las líneas celulares en función de la expresión de *SLFN11*, siendo HGUE-GB-16 la que presentaba menor expresión (**Figura 3**). Este resultado coincide con su mayor resistencia al tratamiento con BCNU, lo que podría sugerir una posible correlación negativa entre la expresión de *SLFN11* y la resistencia a agentes alquilantes.

En concordancia con estudios previos (Mu et al., 2015), nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de *SLFN11* produjo una ligera disminución del efecto de la radioterapia, sin observarse un efecto adicional al combinar con Olaparib (**Figura 11B**).

Además, nuestros resultados sugieren una posible relación cruzada entre *SOCS3* y *SLFN11*, observándose una disminución en la expresión de este último tras el silenciamiento de *SOCS3* (**Figura 13**). Ambos genes han sido descritos como marcadores implicados en los mecanismos de resistencia a

radio y quimioterapia, respectivamente (Nogales et al., 2016; Ventero et al., 2019). Por tanto, esta interacción podría tener implicaciones funcionales relevantes, aunque son necesarios estudios adicionales para confirmar la existencia de una regulación directa y esclarecer su impacto en la respuesta terapéutica del GBM.

En conjunto, nuestros datos respaldan el papel de los iPARP como agentes con capacidad antiproliferativa en GBM y capacidad de aumentar, en ciertos contextos, la eficacia de otros tratamientos convencionales como BCNU, incluso revirtiendo parcialmente la quimiorresistencia. Además, se identifican indicios de que la expresión de *SLFN11* podría modular la sensibilidad a la radioterapia, aunque esto debería explorarse en mayor profundidad ajustando los tiempos de exposición al tratamiento.

5. Conclusiones y proyecciones futuras

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

1. Olaparib ejerce un efecto antiproliferativo, que se traduce en una acumulación inicial de las células en la fase S del ciclo celular, seguida de un efecto citotóxico a tiempos más prolongados.
2. El BCNU induce un bloqueo principalmente en la fase S tras 24 horas de tratamiento, que evoluciona hacia muerte celular a las 72 horas en la línea HGUE-GB-18. En cambio, en HGUE-GB-16 genera un efecto citoestático con un ligero bloqueo en G2/M a las 24 horas, que se disipa al aumentar el tiempo de tratamiento.
3. La combinación de Olaparib con BCNU produce efectos dispares: en HGUE-GB-16 (resistente a BCNU) Olaparib potencia el efecto del agente alquilante, mientras que en HGUE-GB-18 no se observa un aumento significativo.
4. La radioterapia provoca un bloqueo del ciclo celular en fase G2/M. El efecto es ligeramente aumentado al administrar Olaparib dos horas antes de la radioterapia, lo que sugiere que el momento de administración es clave para optimizar la combinación.
5. La línea HGUE-GB-16 presenta la menor expresión de *SLFN11*, lo que correlaciona con una mayor resistencia a agentes alquilantes como BCNU.
6. El silenciamiento de *SLFN11* reduce ligeramente el efecto de la radioterapia tras 24 horas de tratamiento. Sin embargo, la combinación con Olaparib no modifica este resultado.
7. El silenciamiento de *SOCS3* disminuye la expresión de *SLFN11*, lo que sugiere una posible relación reguladora entre ambos genes implicados en resistencia a radioterapia y/o quimioterapia.

Aunque en este estudio no se observó una potenciación del efecto de Olaparib en combinación con radioterapia, para futuras investigaciones sería interesante explorar la optimización de la dosis, los tiempos de administración o el uso de otros iPARP, con el objetivo de mejorar los resultados.

Por otro lado, sería relevante ampliar el estudio del efecto del silenciamiento de *SLFN11* sobre la radioterapia a tiempos de tratamiento más prolongados, ya que los efectos observados a corto plazo podrían aumentar con mayor duración. Asimismo, convendría evaluar el impacto de silenciar *SLFN11* en combinación con BCNU, para determinar si esta manipulación modula la sensibilidad a agentes alquilantes. También resulta prioritario investigar cómo varía la expresión de *SLFN11* tras la exposición a iPARP, con el fin de establecer las condiciones óptimas de concentración y tiempo de aplicación que maximicen su eficacia terapéutica.

Del mismo modo, profundizar en el análisis de la relación entre *SOCS3* y *SLFN11*, así como en su posible interacción con otros genes implicados en la resistencia a la radioterapia, podría ayudar a identificar rutas moleculares comunes y nuevas estrategias para abordar el desarrollo de resistencias. Finalmente, avanzar en la caracterización de biomarcadores predictivos de sensibilidad permitiría desarrollar enfoques de medicina personalizada más eficaces para el tratamiento del GBM.

6. Bibliografía

- Alexander, B. M., Pinnell, N., Wen, P. Y., & D'Andrea, A. (2012). Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 107(3), 463–477. <https://doi.org/10.1007/S11060-011-0765-4>
- Ba, X., & Garg, N. J. (2011). Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases. *The American Journal of Pathology*, 178(3), 946–955. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.004>
- Banerjee, S., Moore, K. N., Colombo, N., Scambia, G., Kim, B.-G., Oaknin, A., Friedlander, M., Lisysanskaya, A., Floquet, A., Leary, A., Sonke, G. S., Gourley, C., Oza, A., González-Martín, A., Aghajanian, C., Bradley, W. H., Holmes, E., Lowe, E. S., & DiSilvestro, P. (2021). Maintenance olaparib for patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer and a BRCA mutation (SOLO1/GOG 3004): 5-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 22(12), 1721–1731. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00531-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00531-3)
- Bisht, P., Kumar, V. U., Pandey, R., Velayutham, R., & Kumar, N. (2022). Role of PARP Inhibitors in Glioblastoma and Perceiving Challenges as Well as Strategies for Successful Clinical Development. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 939570. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.939570>
- Bock, H. C., Puchner, M. J. A., Lohmann, F., Schütze, M., Koll, S., Ketter, R., Buchalla, R., Rainov, N., Kantelhardt, S. R., Rohde, V., & Giese, A. (2010). First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: a multicenter experience. *Neurosurgical Review*, 33(4), 441–449. <https://doi.org/10.1007/s10143-010-0280-7>

Cancer. (n.d.). Retrieved June 14, 2025, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Carreira, S., Porta, N., Arce-Gallego, S., Seed, G., Llop-Guevara, A., Bianchini, D., Rescigno, P., Paschalis, A., Bertan, C., Baker, C., Goodall, J., Miranda, S., Riisnaes, R., Figueiredo, I., Ferreira, A., Pereira, R., Crespo, M., Gurel, B., Rodrigues, D. N., ... de Bono, J. S. (2021). Biomarkers associating with PARP inhibitor benefit in prostate cancer in the TOPARP-B trial. *Cancer Discovery*, *11*(11), 2812–2827. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0007>

Chacón, B. G., Ángel, M., & Giráldez, T. (n.d.). *Editores*.

Choi, J., Kim, G., Cho, S. Bin, & Im, H.-J. (2020). Radiosensitizing high-Z metal nanoparticles for enhanced radiotherapy of glioblastoma multiforme. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00684-5>

Coleman, N., Zhang, B., Byers, L. A., & Yap, T. A. (2021). The role of Schlafen 11 (SLFN11) as a predictive biomarker for targeting the DNA damage response. *British Journal of Cancer*, *124*(5), 857–859. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01202-y>

de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Mehra, N., Goessl, C., Kang, J., Burgents, J., Wu, W., Kohlmann, A., Adelman, C. A., & Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *382*(22), 2091–2102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911440>

Dhanavath, N., Bisht, P., Jamadade, M. S., Murti, K., Wal, P., & Kumar, N. (2025). Olaparib: A Chemosensitizer for the Treatment of Glioblastoma. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *25*(5), 374–385. <https://doi.org/10.2174/0113895575318854241014101928>

Dilmac, S., & Ozpolat, B. (2023). Mechanisms of PARP-Inhibitor-Resistance in BRCA-Mutated Breast Cancer and New Therapeutic Approaches. *Cancers*, *15*(14), 3642. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15143642>

Erasmus, H., Gobin, M., Niclou, S., & Van Dyck, E. (2016). DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, *769*, 19–35. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2016.05.005>

Fischietti, M., Eckerdt, F., Perez, R. E., Guillen Magaña, J. N., Mazewski, C., Ho, S., Gonzalez, C., Streich, L. D., Beauchamp, E. M., Heimberger, A. B., Baran, A. H., Yue, F., James, C. D., & Plataniias, L. C. (2022). SLFN11 Negatively Regulates Noncanonical NFκB Signaling to Promote Glioblastoma Progression. *Cancer Research Communications*, *2*(9), 966–978. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-22-0192>

Fishel, R. (2015). Mismatch Repair. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(44), 26395–26403. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.660142>

Gérard, M., Corroyer-Dulmont, A., Lesueur, P., Collet, S., Chérel, M., Bourgeois, M., Stefan, D., Limkin, E. J., Perrio, C., Guillamo, J. S., Dubray, B., Bernaudin, M., Thariat, J., & Valable, S. (2019). Hypoxia Imaging and Adaptive Radiotherapy: A State-of-the-Art Approach in the Management of Glioma. *Frontiers in Medicine*, *6*, 117. <https://doi.org/10.3389/FMED.2019.00117>

- Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M. J., Park, J.-O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.-Y., Reinacher-Schick, A., Tortora, G., Algül, H., O'Reilly, E. M., McGuinness, D., Cui, K. Y., Schlienger, K., Locker, G. Y., & Kindler, H. L. (2019). Maintenance Olaparib for Germline *BRCA* -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, *381*(4), 317–327. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903387>
- Gutierrez, R., & O'Connor, T. R. (2021). DNA direct reversal repair and alkylating agent drug resistance. *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*, *4*(2), 414–423. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.113>
- Halim, C. E., Deng, S., Crasta, K. C., & Yap, C. T. (2025). Interplay Between the Cytoskeleton and DNA Damage Response in Cancer Progression. *Cancers*, *17*(8), 1378. <https://doi.org/10.3390/cancers17081378>
- Jannetti, S. A., Zeglis, B. M., Zalutsky, M. R., & Reiner, T. (2020). Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) Inhibitors and Radiation Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 170. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00170>
- Kanagavalli, P., Elkaffas, R. A., Mohideen, M. I. H., & Eissa, S. (2025). Electrochemical immunosensor for the predictive cancer biomarker SLFN11 using reduced graphene oxide/MIL-101(Cr)-NH₂ composite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *285*, 138174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138174>
- Karpel-Massler, G., Pareja, F., Aimé, P., Shu, C., Chau, L., Westhoff, M. A., Halatsch, M. E., Crary, J. F., Canoll, P., & Siegelin, M. D. (2014). PARP Inhibition Restores Extrinsic Apoptotic Sensitivity in Glioblastoma. *PLoS one*, *9*(12), e114583. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114583>
- Knelson, E. H., Patel, S. A., & Sands, J. M. (2021). PARP Inhibitors in Small-Cell Lung Cancer: Rational Combinations to Improve Responses. *Cancers*, *13*(4), 727. <https://doi.org/10.3390/cancers13040727>
- Kötter, A., Cornils, K., Borgmann, K., Dahm-Daphi, J., Petersen, C., Dikomey, E., & Mansour, W. Y. (2014). Inhibition of PARP1-dependent end-joining contributes to Olaparib-mediated radiosensitization in tumor cells. *Molecular Oncology*, *8*(8), 1616-1625. <https://doi.org/10.1016/J.MOLONC.2014.06.008>
- Kowalczykowski, S. C. (2015). An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(11), a016410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>
- Lei, Z., Tian, Q., Teng, Q., Wurlpel, J. N. D., Zeng, L., Pan, Y., & Chen, Z. (2023). Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm*, *4*(3), e265. <https://doi.org/10.1002/mco2.265>
- Lesueur, P., Lequesne, J., Grellard, J.-M., Dugué, A., Coquan, E., Brachet, P.-E., Geffrelet, J., Kao, W., Emery, E., Berro, D. H., Castera, L., Goardon, N., Lacroix, J., Lange, M., Capel, A., Leconte, A., Andre, B., Léger, A., Lelaidier, A., ... Stefan, D. (2019). Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer*, *19*(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5413-y>

- Lok, B. H., Gardner, E. E., Schneeberger, V. E., Ni, A., Desmeules, P., Rekhman, N., de Stanchina, E., Teicher, B. A., Riaz, N., Powell, S. N., Poirier, J. T., & Rudin, C. M. (2017). PARP Inhibitor Activity Correlates with *SLFN11* Expression and Demonstrates Synergy with Temozolomide in Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(2), 523–535. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1040>
- Luo, X., & Kraus, W. L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & Development*, 26(5), 417–432. <https://doi.org/10.1101/gad.183509.111>
- Majc, B., Novak, M., Kopitar-Jerala, N., Jewett, A., & Breznik, B. (2021). Immunotherapy of Glioblastoma: Current Strategies and Challenges in Tumor Model Development. *Cells*, 10(2), 265. <https://doi.org/10.3390/cells10020265>
- McNeill, K. A. (2016). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 34(4), 981–998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>
- Miknyoczki, S., Chang, H., Grobelny, J., Pritchard, S., Worrell, C., McGann, N., Ator, M., Husten, J., Deibold, J., Hudkins, R., Zulli, A., Parchment, R., & Ruggeri, B. (2007). The selective poly(ADP-ribose) polymerase-1(2) inhibitor, CEP-8983, increases the sensitivity of chemoresistant tumor cells to temozolomide and irinotecan but does not potentiate myelotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(8), 2290–2302. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0062>
- Minniti, G., Niyazi, M., Alongi, F., Navarria, P., & Belka, C. (2021). Current status and recent advances in reirradiation of glioblastoma. *Radiation Oncology (London, England)*, 16(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13014-021-01767-9>
- Miura, K., Sakata, K. ichi, Someya, M., Matsumoto, Y., Matsumoto, H., Takahashi, A., & Hareyama, M. (2012). The combination of olaparib and camptothecin for effective radiosensitization. *Radiation Oncology (London, England)*, 7, 62. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-62>
- Mu, Y., Lou, J., Srivastava, M., Zhao, B., Feng, X., Liu, T., Chen, J., & Huang, J. (2016). SLFN11 inhibits checkpoint maintenance and homologous recombination repair. *EMBO Reports*, 17(1), 94-109. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201540964>
- Murai, J., Feng, Y., Yu, G. K., Ru, Y., Tang, S. W., Shen, Y., & Pommier, Y. (2016). Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget*, 7(47), 76534-76550. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12266>
- Murai, J., Huang, S. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., Ji, J., Takeda, S., & Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*, 72(21), 5588–5599. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2753>
- Nambiar, D. K., Mishra, D., & Singh, R. P. (2023). Targeting DNA repair for cancer treatment: Lessons from PARP inhibitor trials. *Oncology Research*, 31(4), 405-421. <https://doi.org/10.32604/OR.2023.028310>
- National Cancer Institute. (n.d.-a). *Radioterapia para tratar el cáncer*. Radioterapia Para Tratar El Cáncer. Retrieved May 27, 2025, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>

- National Cancer Institute. (n.d.-b). *Why Do Cancer Treatments Stop Working? Overcoming Treatment Resistance*. Retrieved May 27, 2025, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/drug-combo-resistance>
- Noël, G., Godon, C., Fernet, M., Giocanti, N., Mégnin-Chanet, F., & Favaudon, V. (2006). Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3), 564–574. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0418>
- Nogales, V., Reinhold, W. C., Varma, S., Martinez-Cardus, A., Moutinho, C., Moran, S., Heyn, H., Sebio, A., Barnadas, A., Pommier, Y., & Esteller, M. (2016). Epigenetic inactivation of the putative DNA/RNA helicase SLFN11 in human cancer confers resistance to platinum drugs. *Oncotarget*, 7(3), 3084–3097. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6413>
- Poveda, A., Floquet, A., Ledermann, J. A., Asher, R., Penson, R. T., Oza, A. M., Korach, J., Huzarski, T., Pignata, S., Friedlander, M., Baldoni, A., Park-Simon, T.-W., Tamura, K., Sonke, G. S., Lisyanskaya, A., Kim, J.-H., Filho, E. A., Milenkova, T., Lowe, E. S., ... Vergote, I. (2021). Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 22(5), 620–631. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00073-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00073-5)
- Rathkey, D., Khanal, M., Murai, J., Zhang, J., Sengupta, M., Jiang, Q., Morrow, B., Evans, C. N., Chari, R., Fetsch, P., Chung, H.-J., Xi, L., Roth, M., Filie, A., Raffeld, M., Thomas, A., Pommier, Y., & Hassan, R. (2020). Sensitivity of Mesothelioma Cells to PARP Inhibitors Is Not Dependent on BAP1 but Is Enhanced by Temozolomide in Cells With High-Schlafen 11 and Low-O6-methylguanine-DNA Methyltransferase Expression. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(5), 843–859. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.012>
- Reithmeier, T., Graf, E., Piroth, T., Trippel, M., Pinsker, M. O., & Ninkhah, G. (2010). BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer*, 10, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-30>
- Scattolin, D., Maso, A. D., Ferro, A., Frega, S., Bonanno, L., Guarneri, V., & Pasello, G. (2024). The emerging role of Schlafen-11 (SLFN11) in predicting response to anticancer treatments: Focus on small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 128, 102768. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2024.102768>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Sen, A., Prager, B. C., Zhong, C., Park, D., Zhu, Z., Gimble, R. C., Wu, Q., Bernatchez, J. A., Beck, S., Clark, A. E., Siqueira-Neto, J. L., Rich, J. N., & McVicker, G. (2022). Leveraging Allele-Specific Expression for Therapeutic Response Gene Discovery in Glioblastoma. *Cancer Research*, 82(3), 377–390. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0810>
- Soung, Y. H., & Chung, J. (2023). Combination Treatment Strategies to Overcome PARP Inhibitor Resistance. *Biomolecules*, 13(10), 1480. <https://doi.org/10.3390/BIOM13101480>

- Sun, C., Chu, A., Song, R., Liu, S., Chai, T., Wang, X., & Liu, Z. (2023). PARP inhibitors combined with radiotherapy: are we ready?. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1234973. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1234973>
- Tentori, L., Ricci-Vitiani, L., Muzi, A., Ciccarone, F., Pelacchi, F., Calabrese, R., Runci, D., Pallini, R., Caiafa, P., & Graziani, G. (2014). Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide. *BMC Cancer*, *14*(1), 151. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-151>
- Valdez, F., Salvador, J., Palermo, P. M., Mohl, J. E., Hanley, K. A., Watts, D., & Llano, M. (2019). Schlafen 11 Restricts Flavivirus Replication. *Journal of Virology*, *93*(15), e00104-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00104-19>
- Ventero, M. P., Fuentes-Baile, M., Quereda, C., Perez-Valeciano, E., Alenda, C., Garcia-Morales, P., Esposito, D., Dorado, P., Manuel Barbera, V., & Saceda, M. (2019). Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PLoS one*, *14*(4), e0212581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581>
- 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
- Wang, Y., Luo, W., & Wang, Y. (2019). PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. *DNA Repair*, *81*, 102651. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102651>
- Waqar, M., Trifiletti, D. M., McBain, C., O'Connor, J., Coope, D. J., Akkari, L., Quinones-Hinojosa, A., & Borst, G. R. (2022). Early Therapeutic Interventions for Newly Diagnosed Glioblastoma: Rationale and Review of the Literature. *Current Oncology Reports*, *24*(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01157-0>
- Wei, J., Zhu, K., Yang, Z., Zhou, Y., Xia, Z., Ren, J., Zhao, Y., Wu, G., & Liu, C. (2023). Hypoxia-Induced Autophagy Is Involved in Radioresistance via HIF1A-Associated Beclin-1 in Glioblastoma Multiforme. *Heliyon*, *9*(1), e12820. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E12820>
- Zampieri, L. X., Sboarina, M., Cacace, A., Grasso, D., Thabault, L., Hamelin, L., Vazeille, T., Dumon, E., Rossignol, R., Frédérick, R., Sonveaux, E., Lefranc, F., & Sonveaux, P. (2021). Olaparib Is a Mitochondrial Complex I Inhibitor That Kills Temozolomide-Resistant Human Glioblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 11938. <https://doi.org/10.3390/ijms222111938>
- Zhang, B., Ramkumar, K., Cardnell, R. J., Gay, C. M., Stewart, C. A., Wang, W.-L., Fujimoto, J., Wistuba, I. I., & Byers, L. A. (2021). A wake-up call for cancer DNA damage: the role of Schlafen 11 (SLFN11) across multiple cancers. *British Journal of Cancer*, *125*(10), 1333–1340. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01476-w>
- Zhang, P., Hu, X., Li, Z., Liu, Q., Liu, L., Jin, Y., Liu, S., Zhao, X., Wang, J., Hao, D., Chen, H., & Liu, D. (2024). Schlafen 11 triggers innate immune responses through its ribonuclease activity upon detection of single-stranded DNA. *Science Immunology*, *9*(96), eadj5465. <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ADJ5465>

Zhou, H., Miki, R., Eeva, M., Fike, F. M., Seligson, D., Yang, L., Yoshimura, A., Teitell, M. A., Jamieson, C. A. M., & Cacalano, N. A. (2007). Reciprocal Regulation of SOCS 1 and SOCS3 Enhances Resistance to Ionizing Radiation in Glioblastoma Multiforme. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2344–2353. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2303>

Zoppoli, G., Regairaz, M., Leo, E., Reinhold, W. C., Varma, S., Ballestrero, A., Doroshow, J. H., & Pommier, Y. (2012). Putative DNA/RNA helicase Schlafen-11 (SLFN11) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 15030–15035. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1205943109>

