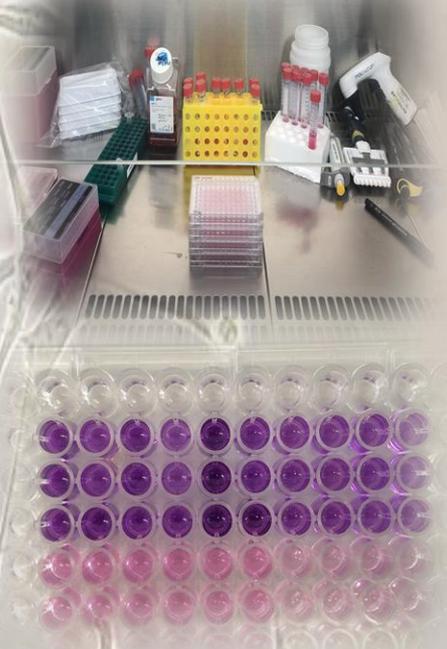




INSTAURACIÓN DEL FUNDAMENTO TERAPÉUTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN LEFTY-SMAD EN EL GLIOBLASTOMA



Alejandro Elúa Pinín

Tesis Doctoral

San Sebastián, País Vasco

2022

1 AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero realizar una reflexión y mostrar un eterno agradecimiento a los verdaderos responsables y motores de este trabajo, a vosotros los Enfermos. Probablemente nunca leáis esta Tesis, seguramente nunca conozcáis los resultados de este estudio, pero quiero dejar constancia de una irrefutable certeza: los que realmente nos motiváis a los Clínicos y Básicos cada día sois vosotros. A veces se nos olvida que todo lo que hacemos en el hospital y en el laboratorio es por y para vosotros. Siento que, con el paso del tiempo, esa primera motivación genuina que todos los profesionales del ámbito de la salud una vez sentimos, a la que llamamos VOCACIÓN, que hace tan bello y agradecido nuestro trabajo, poco a poco se va desgastando, diluyendo, y se va transformando en acción rutinaria. Pasamos de trabajar con gusto para ayudar, a trabajar lo justo porque es lo que toca. Y por si algún día caigo en este engaño de la mente, aquí dejo escritas estas líneas para intentar volver atrás. En definitiva, gracias a todos los pacientes enfermos de Glioblastoma, en especial a IZM, por recordarnos cada día a los Clínicos y Básicos que el trabajo duro en proyectos como el que a continuación se describe merecen cada gota de sudor y cada segundo que a este dedicamos.

Es imprescindible que el lector de este documento comprenda que la consecución de este trabajo es fruto del esfuerzo directo e indirecto de MUCHAS personas a las cuales quiero darles las gracias.

En primer lugar, a mi familia. A mi madre, a mi padre y a mi hermano. A mis tías y tíos, a mis primas y primos, a mis abuelos. Cada uno de vosotros me habéis enseñado algo que ha determinado mi personalidad y carácter, y que ha forjado la persona que ha conseguido escribir este documento.

A mis amigos, que habéis me habéis apoyado y soportado mi ausencia durante estos últimos meses de escritura.

A todo el personal de planta de la 2ª 3ª. Al Servicio de Neurocirugía del Hospital Donostia, desde el Jefe de Servicio, el Dr Úrculo, hasta los residentes (Pelayo, Patri), pasando por todos los Adjuntos (Alicia, Mariano, Nico, Mikel, Patri, José, Leti); Al personal de quirófano (limpieza, enfermería, celadores) Al equipo de anestesia. Al equipo de CMI. A todo el equipo del comité de tumores. Sin vosotros y sin el apoyo que me habéis prestado, cada uno a vuestra manera, cada uno con su pequeña aportación que hace que al final todo funcione, este proyecto no hubiese sido posible.

A mis Directores, Ander y Nico que me habéis ido guiando a los largo de estos años en este gran Trabajo científico.

A Mariano Arrázola, mi tutor. Desde que llegué a la residencia me preguntaste si quería hacer la tesis doctoral en el arduo terreno de la investigación básica. Me dijiste: - ¿Tienes algo que hacer por las tardes? No, ¿verdad? Pues, ala, al laboratorio hasta terminar la tesis (xd) -. Desde entonces me has animado y motivado en los momentos clave, y por eso te doy este profundo y sincero agradecimiento.

A Joaquín Andermatten, compañero de laboratorio, de quirófano y de aventuras.

A Ander Saenz, por la infinita pacencia que has tenido, por tu espíritu docente, tu energía y tu optimismo. Esta tesis es tan tuya como mía.

A Verónica Moncho, por ayudarme en la recta final con los últimos experimentos.

A todos los investigadores del Bionostia que participasteis de un modo u otro en este proyecto; Jaione, Mikel, Maddalen, Estefanía, Aizpea y muchos otros que se me quedan en el tintero.

CUANDO BEBAS AGUA, RECUERDA LA FUENTE.

- Proverbio chino.

AGRADECE A LA LLAMA SU LUZ, PERO NO OLVIDES
EL PIE DEL CANDIL QUE PACIENTE LA SOSTIENE.

- Rabindranath Tagore (1861-1941) Filósofo Indio

2 ABREVIATURAS

GBM: Glioblastoma Multiforme

H.U.D: Hospital Universitario de Donostia

LOE: Lesión Ocupante de Espacio

WHO: World Health Organization

TC: Tomografía Computerizada

RM: Resonancia Magnética

TGFB: Transforming Growth Factor Beta

SNC: Sistema Nervioso Central

SMAD: Small Mothers Against Decapentaplegic

WHO: World Health Organization

WT: "Wild Type"

NOS: "Not Otherwise Specifcated"

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

MGMT: O6 Metil Guanin Metil Transferasa

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

TGF α : Factor de crecimiento transformante alfa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

TKI: Inhibidor de Receptor Tirocin Quinasa

ARF: "Adenosine diphosphate-Ribosylation Factor "

KDa: Kilodalton

ATRX: Alfa -thalassemia X-linked intellectual disability

ALT: "alternative lengthening of Telomers"

DAXX: "death-domain-associated protein"

RM: Resonancia Magnética

FLAIR: "increased T2-weighted Fluid-Attenuated Inversion Recovery"

LCR: líquido Cefaloraquídeo

DSC: Dynamic susceptibility contrast

rCBV: volumen de flujo sanguíneo cerebral relativo

GSC: Glial stem cells

GTR: Gross Total Resection

RT: radioterapia

TMZ: Temozolomida

RANO: Response Assessment in Neuro-Oncology

RC: Respuesta Completa

RP: Respuesta Parcial

BHE: Barrera Hematoencefálica

NICE: "National Institute for Health and Care Excellence"

TAC: Tomografía Axial Computerizada.

IHQ: Inmunohistoquímica

RT: Retrotranscripción

TTF: "Tumor-Treating Fields"

EMT: Transición Epitelial-Mesenquimal

PDGF: Factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas

FGFR2: Factor de crecimiento fibroblástico II

mTOR: "mammalian target of Rapamycin"

AMPK: "AMP-activated protein kinase"

GDFs: Factores de Diferenciación Y Crecimiento.

BMP: "bone morphogenic proteins"

SARA: "Smad anchor for receptor activation"

SBE: "SMAD Binding Element"

FDA: "Food and Drug Administration"

NCCN: "National Comprehensive Cancer Network"

VEGF-A: "Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular A"

TTF: "Tumor-Treating Fields"

TMB: "Tumor Mutational Burden"

TAMs: "Tumor Associated Macrophages"

SMAD: "small mothers against decapentaplegic"

GSC: Glioma Stem Cell

NSC: Neural Stem Cells

DAPK: death associated protein kinase

DAXX: Death Associated protein six

TNF "Tumor Necrosis Factor"

NF-kappaB: "Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"

PDGFRA "platelet-derived growth factor receptor A"

3 RESUMEN

El Glioblastoma es el tumor cerebral primario más frecuente y agresivo del Sistema Nervioso Central. Presenta un pronóstico muy pobre, con una mediana de supervivencia menor a los 15 meses, y los costes en la sociedad rondan los 200.000 euros por paciente. Desde la publicación del Protocolo STUPP en el año 2005 ningún Fármaco ha mejorado la escasa mediana de supervivencia que logra el fármaco alquilante Temozolomida (menor del 5% a los 5 años) La ausencia de nuevas moléculas/estrategias efectivas en el tratamiento del GBM desde entonces en la práctica clínica justifica la investigación y búsqueda de nuevos compuestos.

La superfamilia de la vía TGF β (Transforming Growth Factor Beta), tiene un papel crucial en la regulación de la transcripción de genes involucrados en la supervivencia, proliferación diferenciación y apoptosis celular en diferentes tejidos. Existen una serie de proteínas llamadas SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) que actúan como transductores de los ligandos de la superfamilia de la vía TGF β (Transforming Growth Factor Beta), regulando su actividad.

La superfamilia TGF β y las proteínas SMAD están desregulados en cáncer. Diferentes estudios teorizan que múltiples tejidos tumorales secretan unas moléculas anti-SMAD responsables en parte del aumento de la proliferación celular. Una de estas moléculas inhibidoras de SMAD es conocida como LEFTY, la cual está sobreexpresada en cáncer y parece regular la población de células madre en diferentes tumores.

En esta Tesis hemos caracterizado la expresión de LEFTY, que parece estar sobreexpresada en la población de células madre de glioma y en biopsias clínicas de Glioblastoma. De hecho, sus altos niveles correlacionan con peor supervivencia de los pacientes postulándose como una novedosa y atractiva diana terapéutica. Mediante un anticuerpo monoclonal anti-LEFTY hemos inhibido esta proteína y observado que se produce una disminución de la proliferación y de la capacidad de auto-renovación celular y un aumento de la apoptosis y senescencia tanto en cultivos celulares de líneas tumorales convencionales como en células madre de glioma derivadas de pacientes. Estos resultados in vitro fueron ampliados a modelos animales in vivo donde hemos identificado que el anticuerpo monoclonal anti-LEFTY provoca una disminución en la capacidad tumorigénica de las células de Glioblastoma y que ejerce una acción sinérgica con el agente quimioterápico Temozolomida.

En resumen, hemos demostrado que la vía LEFTY-SMAD está alterada en el Glioblastoma y que su inhibición reduce de manera drástica la actividad maligna de las células de glioma. Estos resultados postulan la inhibición de LEFTY como una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento de esta agresiva neoplasia del Sistema Nervioso Central.

4 ÍNDICE

1	AGRADECIMIENTOS.....	1
2	ABREVIATURAS.....	3
3	RESUMEN	5
4	ÍNDICE.....	6
5	INTRODUCCIÓN.....	8
5.1	Generalidades del glioblastoma.....	8
5.1.1	Definición y Epidemiología:.....	8
5.1.2	Clasificación:.....	9
5.2	Diagnóstico:.....	15
5.2.1	Manifestaciones clínicas:	15
5.2.2	Características radiológicas:.....	16
5.3	Tratamiento.....	18
5.3.1	Cirugía:	18
5.3.2	Quimioterapia y Radioterapia:.....	20
5.3.3	Valoración de la Respuesta al tratamiento:.....	21
5.3.4	Manejo terapéutico del Glioblastoma Recurrente	25
5.3.5	Nuevas Terapias en el Glioblastoma	26
5.4	Biología molecular del glioblastoma	30
5.4.1	Hallmarks del Glioblastoma	30
5.4.2	Vía de señalización TGFB.....	44
5.4.3	LEFTY:	48
5.4.4	Células Madre de Glioma	53
6	OBJETIVOS	55
7	MATERIAL Y MÉTODOS:	56
7.1	Cultivo celular.....	56
7.1.1	Líneas celulares:	56
7.2	Ensayos funcionales	57
7.2.1	Ensayo de formación de esferas y capacidad de auto renovación de células madre de Glioma (GNS).....	57
7.2.2	Ensayo de diferenciación de Células Madre de Glioma (GNS).....	58
7.2.3	Ensayo de viabilidad celular MTT	58

7.2.4	Senescencia	59
7.3	Ensayo de Carcinogénesis <i>IN VIVO</i>	59
7.3.1	Generación de tumores subcutáneos	59
7.4	Análisis de la expresión de proteínas	60
7.4.1	Extracción y cuantificación de proteína	60
7.4.2	Western Blot	60
7.4.3	Inmunofluorescencia	62
7.4.4	EdU (5-etinilo-2'-deoxiuridina):	62
7.4.5	Inmunohistoquímica	63
7.4.6	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	64
7.4.7	Análisis Estadístico	65
8	RESULTADOS	66
8.1	La expresión de las diferentes proteínas de la vía señalización LEFTY-SMAD es heterogénea en biopsias de glioblastoma.	66
8.2	La sobreexpresión de LEFTY se asocia a una menor supervivencia en biopsias de Glioblastoma.	67
8.3	Los niveles de expresión de LEFTY están aumentados en líneas celulares de Glioblastoma y en líneas de células madre de glioma	70
8.4	LA EXPRESIÓN DE LEFTY Y SMAD CAMBIA EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	71
8.5	La inhibición farmacológica de LEFTY disminuye la viabilidad de las células madre de Glioma y de las células de Glioblastoma	73
8.6	La inhibición Farmacológica de LEFTY reduce las características tumorogénicas de las células madre de Glioma y de las células de Glioblastoma	75
8.7	La modulación de la vía SMAD afecta a la capacidad de autorrenovación tumoral... 76	
8.8	La inhibición Farmacológica de LEFTY reduce el crecimiento tumoral en modelos de experimentación animal	77
8.9	El anticuerpo anti-LEFTY actúa de forma sinérgica con la Temozolomida reduciendo el volumen tumoral en modelos de experimentación animal	82
9	DISCUSIÓN.....	84
10	CONCLUSIONES	89
11	BIBLIOGRAFÍA	90

5 INTRODUCCIÓN

5.1 GENERALIDADES DEL GLIOBLASTOMA

5.1.1 *Definición y Epidemiología:*

Los Gliomas son tumores que derivan de las células de la Glía, las cuales fueron descritas en 1850 por el patólogo Alemán Rudolf Virchow (**Chvátal & Verkhatsky, 2018**) Glía en Griego significa “cola”, es decir, la neuroglia es el conjunto de células que “unen” a las Neuronas. Cumplen diversas funciones entre las que destacan soporte estructural y metabólico. En este grupo se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos, microglía, ependimocitos y células de Schwann (**Jessen, 2004**) De cada uno de estas estirpes celulares se origina un tipo de tumor. (Astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, etc)

El Glioblastoma es un tumor derivado de la población astrocitaria de las células gliales. Es el tumor primario del SNC más frecuente en la población adulta. (**Adamson et al., 2009**) Representa más del 60 % de todos los tumores cerebrales en la población adulta (**Rock et al., 2012**) y entre el 3-15% en la población pediátrica (**K. K. Das & Kumar, 2017**). Su incidencia es de aproximadamente 3 por 100.000 habitantes en las diferentes series a nivel global en la población adulta (**B. Chen et al., 2021; Hanif et al., 2017; Stupp et al., 2010**) y 0.85 por cada 100.000 habitantes en la población pediátrica (**K. K. Das & Kumar, 2017**). Presenta una menor incidencia en países en vías de desarrollo aunque se cree que es debido a que está siendo infradiagnosticado respecto a los países más desarrollados (**Ohgaki, 2009**) Es más frecuente en hombres que en mujeres y su incidencia es mayor en la población caucásica. Se han reportado casos en todos los grupos de edad, sin embargo su pico de incidencia se sitúa entre los 55 y los 60 años de edad (**B. Chen et al., 2021; K. K. Das & Kumar, 2017; Ohgaki, 2009**) El pronóstico de estos pacientes es muy pobre siendo la mediana de supervivencia de aproximadamente 15 meses tras realizar el tratamiento según el protocolo STUPP (**Rock et al., 2012; Stupp et al., 2005; Thakkar et al., 2014**). Solamente un 4,7 % de los pacientes presentan una supervivencia mayor a 5 años (**Ostrom et al., 2013**) y menos de un 1 % de los pacientes viven más de 10 años tras el diagnóstico (**Tykocki & Eltayeb, 2018**)

5.1.2 Clasificación:

La clasificación de los tumores cerebrales de origen glial ha ido evolucionando a lo largo de los años desde sus orígenes en 1926, cuando Cushing y Bailey correlacionaron sus características histogenéticas con el pronóstico (**«A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis, with a Correlated Study of Prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 Illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal», 1927**).

En 1979 se publicó por primera vez la clasificación de los Gliomas de la World Health Organization (WHO). En 1993 se publicó la segunda edición, en el año 2000 la tercera, en el 2007 la cuarta, en el año 2016 se realizó una actualización de la cuarta edición y en el 2021 se publicó la quinta edición (**Figarella-Branger et al., 2021**). Antiguamente los tumores gliales se caracterizaban basándose puramente en sus características histológicas, comparando las células de la muestra con las canónicas y valorando sus diferentes grados de diferenciación. Con el paso de los años el diagnóstico anatomopatológico ha ido haciéndose cada vez más complejo y específico, estudiando las características microscópicas en tinciones con hematoxilina eosina, expresión inmunohistoquímica de proteínas marcadoras de linaje, caracterización ultraestructural y molecular. Antaño se realizaba una agrupación de los tumores Gliales del SNC en Astrocíticos (entre los cuales se encontraba el Glioblastoma), tumores oligodendrogiales y tumores oligoastrocíticos. La WHO, históricamente ha realizado una gradación de los gliomas en cuatro escalones en función de determinadas características anatomopatológicas. Dicha escala presenta valor pronóstico. De este modo tenemos gliomas de grado I, los cuales son tumores circunscritos, que no presentan infiltración difusa, como algunos tipos de Astrocitoma Pilocítico; Grado II, para aquellos tumores que presentan atipia citológica aislada; Grado III aquellos que además presentan anaplasia y actividad mitótica elevada; Grado IV, los cuales también presentan proliferación microvascular y/o Necrosis (**Louis et al., 2007**).

El Glioblastoma es un Glioma derivadas de células astrocíticas pobremente diferenciadas, grado IV del WHO, que histológicamente se caracteriza por presentar una elevada presencia de mitosis en los cortes histológicos, atipia nuclear, necrosis en empalizada (la cual se caracteriza por la disposición de las células alrededor de un centro necrótico) y proliferación microvascular (**D'Alessio et al., 2019**) **Históricamente se han clasificado en Glioblastomas primarios y secundarios. Los primarios son tumores** que se originan de novo, y que son diagnosticados en pacientes sin historia de otros tumores gliales, generalmente mayores de 55 años (mediana de 44 años) y comprenden el 90 % de todos los Glioblastomas. Los secundarios son tumores que son producto de la transformación maligna de gliomas de bajo grado. Generalmente se dan en pacientes jóvenes, menores de 55 años (mediana de 44 años) y comprenden el 10 % de todos los Glioblastomas.

En la actualización de la cuarta edición de clasificación de la WHO realizada en el año 2016, además de tener en cuenta sus características histopatológicas, se clasificaron en función de sus características genéticas y moleculares (**Louis et al., 2016**). En cuanto al Glioblastoma la clasificación de la WHO de los tumores del Sistema Nervioso Central del 2016 establece dos entidades que se diferencian en función de la presencia o ausencia de la mutación de la proteína Isocitrato deshidrogenasa (IDH, marcador molecular del cual hablaremos más adelante). De este modo tenemos:

- **Glioblastoma, IDH-Wild Type:** Se caracteriza por la ausencia de mutación en el gen que codifica para la encima Isocitrato deshidrogenasa. Clínicamente se corresponde con los Glioblastomas primarios. Presentan una mediana de supervivencia de unos 15 meses con el tratamiento del Protocolo Stupp
- **Glioblastoma, IDH-mutado:** Se caracteriza por la presencia de mutaciones en el gen que codifica para la encima Isocitrato deshidrogenasa. Clínicamente se corresponde con los Glioblastomas secundarios. Presentan una mediana de supervivencia de unos 30 meses con el tratamiento del Protocolo Stupp.
- **Glioblastoma, NOS (Not Otherwise Specified):** Se reserva este grupo para aquellos tumores cuyo estudio histológico sea compatible con Glioblastoma pero no presente un perfil molecular IDH determinado porque por algún motivo no se pudo realizar su estudio.

Agrupadas dentro de clasificación anterior, existen variantes de Glioblastoma, es decir, un subtipo de una entidad, suficientemente caracterizada anatomopatológicamente y que presenta una potencial utilidad clinicopatológica. Dentro del grupo Glioblastoma, IDH-Wild Type se encuentran dos variantes; Gliosarcoma y Glioblastoma de células gigantes, a las cuales la clasificación de la WHO del 2016 añade una nueva variante conocida como Glioblastoma epitelioides. A continuación, mencionaremos muy brevemente las principales características de dichas variantes

1. **Gliosarcoma:** Subtipo del Glioblastoma que se caracteriza por presentar un componente histológico glial y un componente metaplásico mesenquimal. El componente glial cumple los criterios citológicos de glioblastoma y expresa Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), el componente sarcomatoso/mesenquimal expresa Reticulina y puede presentar morfologías de linajes variados como óseo, fibrocartilaginoso, muscular o adiposo. Presentan una localización de predominio temporal y en ocasiones presentan una imagen radiológica que imita la del meningioma. Producen metástasis extracraneales más frecuentemente que el Glioblastoma y su pronóstico es ligeramente peor (mediana de supervivencia de 4 meses sin tratamiento)(**S. J. Han et al., 2010**)
2. **Glioblastoma de células gigantes:** Subtipo de Glioblastoma que se caracteriza por la presencia de células multinucleadas de gran tamaño que puede superar los 500 µm de diámetro y por un pronóstico más favorable. Los pacientes con este subtipo tumoral presentan una supervivencia a los 5 años mayor del 10%. (**Karsy et al., 2012; Kozak & Moody, 2009**)
3. **Glioblastoma Epitelioides:** Subtipo de Glioblastoma que histológicamente se caracteriza por presentar células de aspecto rabdoide y epitelioides con abundante citoplasma eosinófilo, cromatina vesicular y nucleolos prominentes. Suelen afectar a niños y adultos jóvenes. En numerosas ocasiones radiológicamente presentan una localización más superficial con afectación cortical y una diferenciación bastante nítida con el tejido sano peritumoral. Típicamente tienen la mutación BRAF V600E. Presenta un pronóstico pobre

caracterizado por una rápida recurrencia e infiltración leptomenígea. (Sugimoto et al., 2016; S. Wang et al., 2020)

Otro de los cambios destacables propuestos por la clasificación de la WHO del 2016 es la retirada de la Entidad Gliomatosis Cerebri que pasa a ser un simple patrón de crecimiento encontrado en diferentes tumores astrocíticos y oligodendrogiales.

5.1.2.1 Cambios en la Clasificación del 2021 de los tumores del SNC de la WHO

La quinta y última clasificación publicada por la WHO en Noviembre del 2021 realiza cambios importantes que debemos conocer. Para empezar, los Glioblastomas ahora se encuentran en un grupo conocido como: **Gliomas, tumores glioneuronales y neuronales**. Dentro de esta gran categoría, los Gliomas se clasifican en función de si presentan un carácter difuso o circunscrito, de si aparecen en mayores de 25 años (tipo adulto) o en menores de 25 años (tipo pediátrico) y de su agresividad. Nuestros tumores de interés en esta tesis, los Glioblastomas, se localizan en el grupo *Glioma difuso del adulto*. Como hemos visto anteriormente, en la clasificación del 2016 teníamos dos tipos de Glioblastoma: Glioblastoma IDH-Wild Type o no mutado y Glioblastoma IDH-mutado

En la nueva clasificación del 2021 el primero se mantiene y se continúa denominando Glioblastoma, IDH- Wild Type o no mutado. El cambio importante es que un tumor astrocítico difuso en adulto IDH-wild type **SIN** las características histológicas de Glioblastoma (atipia nuclear, proliferación microvascular, necrosis en empalizada) pero que presente una o más de las siguientes mutaciones (mutación en el promotor de TERT, amplificación del Gen EGFR o ganancia del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10 [+7/-10]) será considerado como Glioblastoma.

El segundo tipo, el Glioblastoma, IDH- mutado **DEJA DE EXISTIR**. El término “Glioblastoma” deja de utilizarse en Gliomas con IDH mutado y este pasa a ser **“Astrocitoma de grado 4 con IDH mutado”**. El grado 4 en estos tumores astrocíticos difusos del adulto IDH-mutado puede venir dado por: las características histológicas (necrosis y proliferación microvascular) o por la presencia de la delección homocigótica del gen CDKN2A/B aún en ausencia de las características histológicas características de Glioblastoma. (Figarella-Branger et al., 2021; Wen & Packer, 2021)

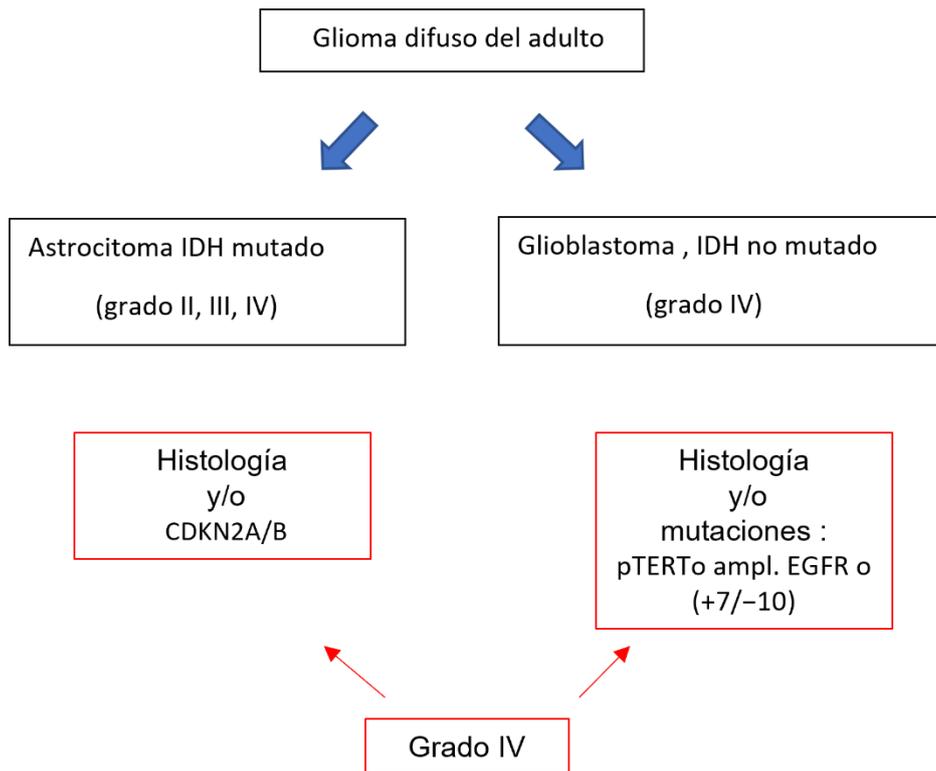


Figura 1 Cambios en la nueva clasificación de los tumores del SNC de la WHO: Desaparece el término Glioblastoma para los tumores Astrocíticos con IDH mutado. El alto grado ya no es solamente aportado por las características histológicas clásicas (atipia, necrosis en empalizada, microproliferación vascular) si no que este grado puede ser dado en ausencia de dichas características histopatológicas si se dan determinadas mutaciones (p TERT, amplificación del EGFR, (+7/-10) o CDKN2A/B)

5.1.2.2 Clasificación Molecular del Glioblastoma

En el año 2008 el TCGA caracterizó las mutaciones más características y comunes presentes en los tumores de Glioblastoma empleando los datos de las diferentes mutaciones encontradas en 206 muestras de Glioblastoma aportados por el TCGA (**The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008**) que sirvieron para que en el año 2010 Verhaak et al realizaron una nueva clasificación molecular del Glioblastoma. Esta nueva clasificación propone 4 subtipos Glioblastoma: Proneural, Neural, Clásico y Mesenquimal. Cada subtipo está caracterizado por un tipo de mutación y se asocia a un linaje neuronal así como a una respuesta diferente al tratamiento quimiorradioterápico (**Verhaak et al., 2010**). Lo más destacable de estos subtipos es la respuesta al tratamiento ya que parece que los subtipos Clásico y Mesenquimal se beneficiarían de un manejo más agresivo.

5.1.2.2.1 Subtipo Clásico:

Este subtipo se caracteriza por las siguientes alteraciones genéticas

- Amplificación del cromosoma 7 junto a pérdida del cromosoma 10 en el 100 % de los GBM Clásicos.
- Amplificaciones del Gen EGFR en el 97% de las muestras agrupadas en este subtipo.

- Mutaciones puntuales en el locus 9p21.3 o CDKN2A que codifica las proteínas p16/INK4A and p14/ ARF. Estas proteínas son supresoras de tumores que tienen un papel importante en la apoptosis y en detención del ciclo celular o senescencia ya que participan en las vías del p53 y pRB.
- Este subtipo se caracteriza por la presencia de marcadores de precursores neurales y células madre (stem), así como por presentar una expresión aumentada de vías como Notch (la activación de esta vía de señalización permite un mantenimiento de la proliferación de las células neurales y gliales stem mientras que su inhibición favorece la diferenciación de estas. **(Stockhausen et al., 2010; X.-P. Zhang et al., 2008)**)

5.1.2.2.2 Subtipo Mesenquimal:

Este subtipo se caracteriza por las siguientes alteraciones genéticas:

- Delecciones en la región 17q11.2 la cual contiene al gen NF1 el cual codifica la Neurofibrimina 1, una proteína GTPasa que inactiva a RAS y por tanto detiene la activación de las vías PI3K/Akt/mTOR y RAF/MERK/ERK ambas encargadas de promocionar señales de supervivencia, crecimiento y proliferación celular. El 50 % de las muestras del subtipo Mesenquimal presentan una baja expresión de NF1.
- Estas células expresan marcadores mesenquimales como YKL40 y presentan una alta expresión de vías proinflamatorias como la del TNF (“Tumor Necrosis Factor”) y NF-kappaB, (“Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”)

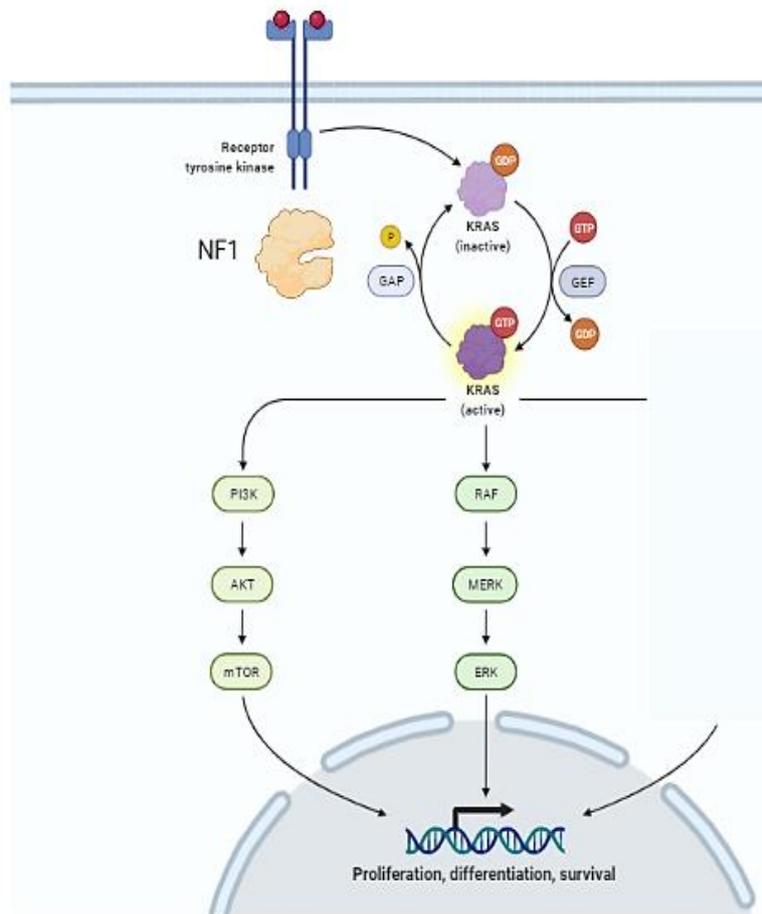


Figura 2: NF1 inactiva a RAS y las vías de señalización dependientes de esta proteína (PI3K/Akt/mTOR y RAF/MERK/ERK) Las cuales regulan la proliferación, crecimiento y supervivencia celular.

5.1.2.2.3 Subtipo Proneural:

En este subtipo se encontraron la mayoría de los Glioblastomas secundarios y los pacientes más jóvenes. Es el subtipo con una supervivencia mayor. Se cree que este subtipo puede desarrollarse a partir de un precursor común con los Oligodendrogliomas. Se caracteriza por las siguientes alteraciones genéticas:

- Amplificaciones del Gen 4q12 que codifica PDGFRA (“platelet-derived growth factor receptor A”) mutaciones en el Gen IDH1, p53 y PI3K.
- Expresión de genes de desarrollo Neuronal como SOX, DCX, DLL3 y TCF4.
- Expresión de Genes de desarrollo Oligodendrocítico como NKX2-2 y OLIG2.

5.1.2.2.4 Subtipo Neural:

Este subtipo se caracteriza por presentar marcadores Neuronales como NEFL, GABRA1, SYT1, y SLC12A5.

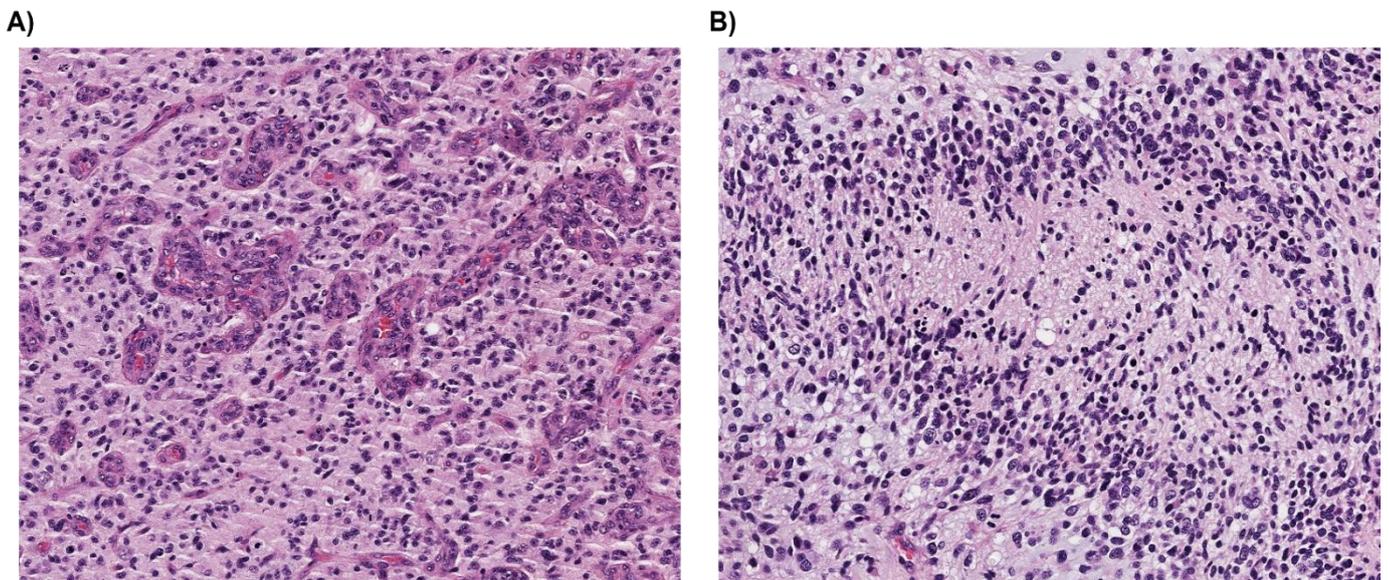


Figura 3: Estudio anatomopatológico de tejido de Glioblastoma de paciente del Hospital Universitario de Donostia. Tinción Hematoxilina-Eosina. En la figura A se aprecia atipia celular figuras de mitosis y abundante proliferación vascular. En la figura B podemos observar numerosas figuras de mitosis, atipia nuclear y la característica necrosis en pseudoempalizada. *Estas fotografías han sido cedidas por cortesía del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Donostia.*

5.2 DIAGNÓSTICO:

5.2.1 Manifestaciones clínicas:

Los pacientes con tumores cerebrales pueden presentar diferentes signos y síntomas dependiendo de la localización de este, del tamaño, de la velocidad de crecimiento del tumor y del edema que genere. El síntoma más frecuente es la cefalea, generalmente holocraneal que se intensifica durante el descanso nocturno del paciente. Con frecuencia los pacientes y familiares consultan debido a embotamiento mental, desorientación, confusión, alteraciones de memoria, alteraciones del equilibrio y cambios en la personalidad. También se pueden dar déficits neurológicos como alteraciones sensitivas y déficits de fuerza en extremidades. Alteraciones del lenguaje son frecuentes cuando la localización del tumor se encuentra cercana a las áreas motoras y sensitivas del lenguaje. Otra forma de presentación pueden ser las crisis comiciales parciales o complejas. La presentación clínica de estos tumores suele ser rápida y generalmente la evolución de la clínica desde su inicio hasta que es diagnosticada no suele superar los 6 meses(Stark et al., 2012)

En cuanto a la localización, el 95 % de los tumores se originan a nivel supratentorial. El lóbulo más afectado es el frontal (43%) seguido del temporal (28%) , parietal(25%) y occipital (3%)(Ali Kahn et al., 2003; Larjavaara et al., 2007) Aunque su prevalencia a nivel infratentorial es muy escasa , también pueden originarse en troco cerebral , cerebelo y médula espinal. (Hur et al., 2008; Malik et al., 2017; Timmons et al., 2018)

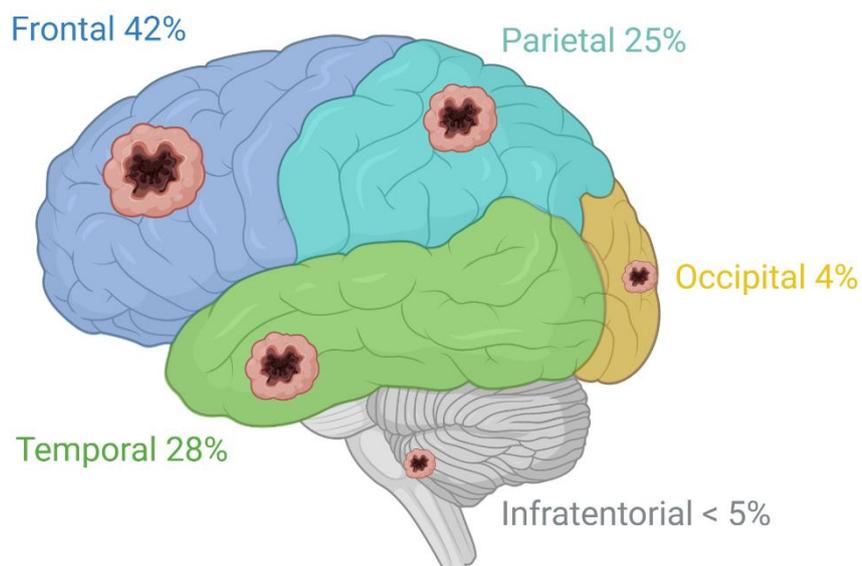


Figura 4: Localización del Glioblastoma en el SNC. Más del 95 % de los Glioblastomas se dan a nivel supratentorial y solamente un 3-4 % se dan a nivel infratentorial. Figura creada con Biorender.com

5.2.2 Características radiológicas:

Tras la sospecha clínica de lesión ocupante de espacio en el parénquima cerebral se realiza una TC (Tomografía Computarizada) para confirmarlo. El glioblastoma se comporta como una lesión situada a nivel subcortical, heterogénea, hipodensa, de forma ovoide irregular, con edema vasogénico perilesional abundante que suele causar desplazamiento de estructuras vecinas y de línea media. El centro de dicha lesión se muestra más hipodenso que la periferia y existe una captación de contraste yodado abigarrada (H. Singh et al., 2002)

Hoy la prueba diagnóstica más usada y que más información aporta al clínico en los primeros pasos del manejo de este tumor cerebral es la RM (Resonancia Magnética) Además de en el diagnóstico, es una pieza clave en el seguimiento del enfermo tras el tratamiento (lo veremos en detalle más adelante). El Glioblastoma se comporta como una lesión hipointensa en las imágenes potenciadas en T1 e hiperintensa en las imágenes potenciadas en T2. En la secuencia FLAIR ("increased T2-weighted Fluid-Attenuated Inversion Recovery"), el Glioblastoma también se aprecia hiperintenso comparado con el con el tejido sano circundante. Dicha secuencia elimina la señal que proviene del LCR (líquido Cefaloraquídeo) y muestra el edema causado por la microinfiltración tumoral en el tejido circundante. El volumen FLAIR pretumoral parece no asociarse con la Supervivencia pero sí lo hace el volumen FLAIR postradioterapia (**Garrett et al., 2017; Grossman et al., 2017**) La disrupción de la BHE (barrera hematoencefálica) producida por la lesión se hace patente al visualizar la captación de Gadolinio en la RM. Presenta, al igual que en el escáner una captación variable que va desde la captación en anillo más o menos esférico a la captación abigarrada y desestructurada (**Nelson & Cha, 2003**) Como sabemos la perfusión sanguínea de estas lesiones está aumentada en estas lesiones y esto lo podemos valorar mediante secuencias DSC (Dynamic susceptibility contrast) en las cuales se valora el spin eco que genera en paso de contraste (Gadolinio) antes durante y después en la zona dónde se encuentra la lesión. Así se puede valorar el rCBV (volumen de flujo sanguíneo cerebral relativo) que está muy aumentado en los tumores cerebrales de alto grado como el Glioblastoma (**Boxerman et al., 2016**). La RM funcional y las secuencias DTI que permiten realizar tractografías y localizar áreas del cerebro altamente elocuentes han permitido aumentar el grado de resección quirúrgica de dichas lesiones (**Abdullah et al., 2013**) (**Shukla et al., 2017**) La MRSI (Magnetic resonance spectroscopic image) es una técnica que permite determinar la cantidad de un determinado metabolito en una determinada región al ser sometido un tejido a una onda electromagnética. El Glioblastoma presenta generalmente una disminución de N-acetil-aspartato (metabolito que disminuye al haber pérdida o daño neuronal), un aumento de la Colina, la cual aumenta ante la proliferación celular. El Lactato está aumentado en regiones donde predomina la hipoxia y los Lípidos en regiones de necrosis. (**Shimizu et al., 1996**) Más adelante veremos como estas novedosas técnicas de imagen presentan un papel fundamental en el seguimiento de los pacientes con Glioblastoma después del tratamiento.

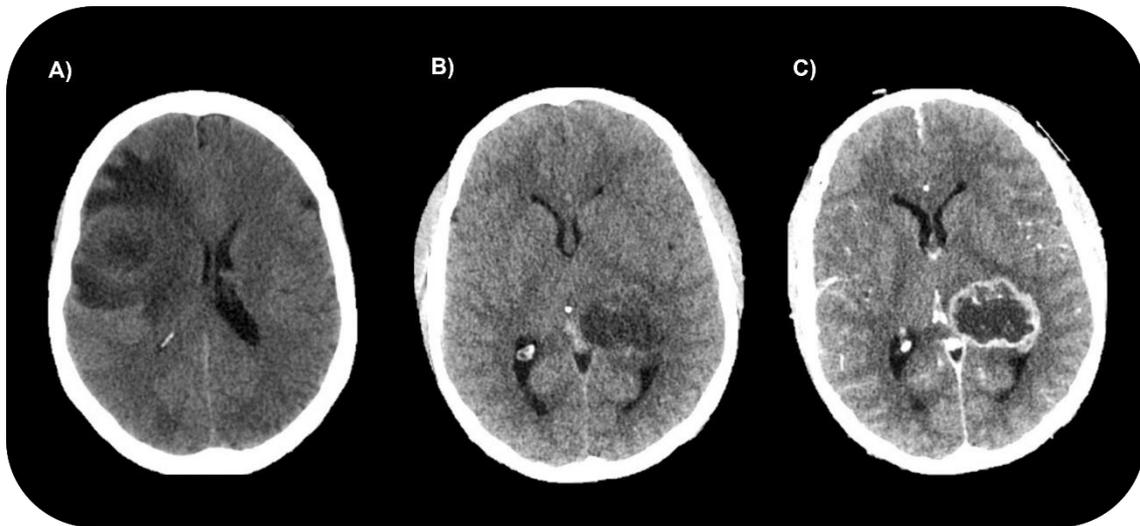


Figura 5: Imágenes de Tomografía Computerizada urgente de dos paciente del H.U.D que acudieron al Servicio de Urgencias por Cefalea y focalidad neurológica **A)**:TC sin contraste en el que se parecía LOE frontal derecha con importante edema vasogénico y compresión de astas frontales derechas. **B) y C)** : TC sin y con contraste yodado en el que se aprecia LOE localizada a nivel de atrio ventricular con captación de contraste en anillo, centro necrótico y edema perilesional.

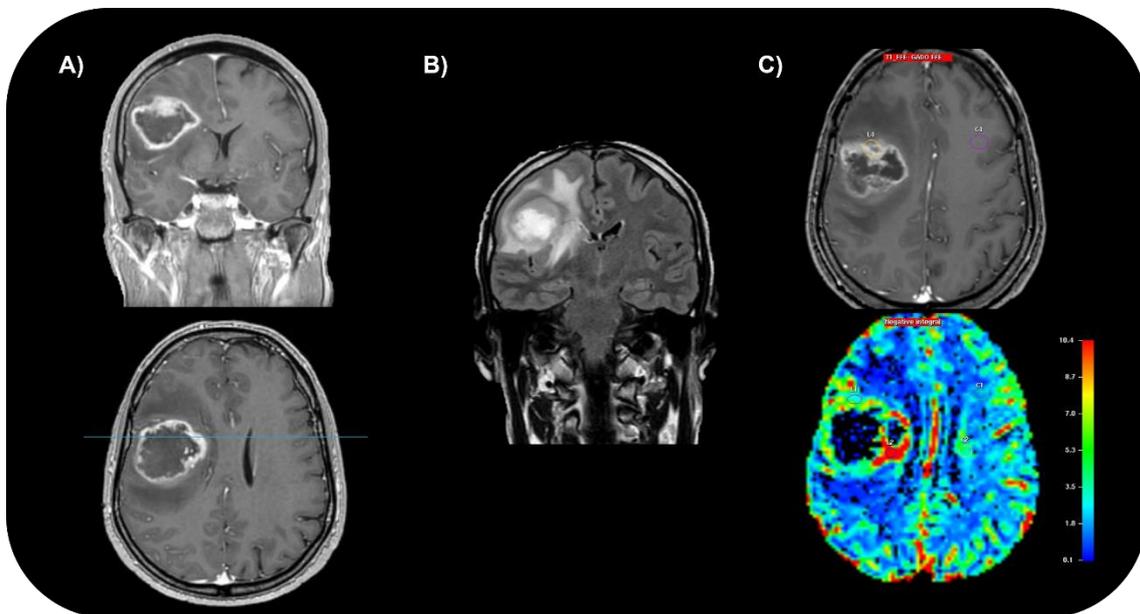


Figura 6: Imágenes de Resonancia Magnética de un paciente del H.U.D. A) Secuencia T1 con Gadolinio cortes coronal y axial. Se aprecia LOE frontal derecha con captación de contraste en anillo , centro hipointenso y edema vasogénico perilesional. B) Secuencia Flair corte coronal. Hiperintensidad de la lesión y abundante edema vasogénico circundante. C) Estudio de Perfusión sobre una secuencia T1-GAD. Se aprecian elevadas ratios de perfusión , compatible con Glioblastoma

5.3 TRATAMIENTO

Tras la confirmación de la sospecha clínica mediante las pruebas de imagen anteriormente comentadas se da inicio al tratamiento, el cual se asienta sobre tres pilares fundamentales; cirugía, la cual debe lograr la máxima resección tumoral posible que sea segura, radioterapia: en total 60 Gy y Quimioterapia: Temozolomida, usada inicialmente simultánea con la RT y posteriormente de forma adyuvante **(Stupp et al., 2005)**.

5.3.1 Cirugía:

Hemos de tener en cuenta una serie de consideraciones preoperatorias. Debido al gran edema vasogénico que estas lesiones presentan, en la actualidad, se lleva a cabo un tratamiento con Glucocorticoides (generalmente Dexametasona 4 mg cada 8 horas) Dicha sustancia actúa sobre los canales de K⁺ alterando la permeabilidad de los capilares peritumorales y mejorando el aclaramiento de agua extracelular de la barrera hematoencefálica **(Cenciarini et al., 2019)**. De este modo conseguimos una adecuada relajación del parénquima cerebral y por tanto una cirugía más segura. Es importante saber que los Glucocorticoides presentan una elevada morbilidad ya que presentan efectos secundarios como miopatía, metabolismo anormal de la glucosa, complicaciones gastrointestinales, irritabilidad, ansiedad, insomnio y está relacionado con un alto riesgo de infección por neumonía **(Kostaras et al., 2014)**. Además se ha visto que la Dexametasona induce un aumento de la proliferación y angiogénesis in vitro e in vivo de la población de GSC (Glioma Stem Cells) **(Aldaz et al., 2020; Luedi et al., 2018)** por lo que cada vez se cuestiona más su uso en el tratamiento del Glioblastoma. En cuanto a los fármacos antiepilépticos son recomendables siempre que se vaya a realizar estimulación cortical o subcortical debido a alto riesgo de crisis comiciales intraoperatorias. Tras la cirugía, se debe llevar a cabo una pauta descendente hasta su retirada. Si el paciente no ha presentado crisis no está indicado el tratamiento profiláctico **(Glantz et al., 2000)**.

Los objetivos de la cirugía en el Glioblastoma son: máxima resección segura, obtención de tejido para realización de diagnóstico anatomopatológico , mejora de las condiciones para optar a QMT y RT , retraso del empeoramiento clínico y mejora de la calidad de vida del paciente .En cuanto a los predictores de buen pronóstico relacionados con el tratamiento del Glioblastoma , el grado de resección es el más importante de todos. Cuanto mayor es el grado de resección tumoral mayor es la supervivencia de estos pacientes, siendo los que alcanzan una mayor supervivencia los que presentan GTR (Gross Total Resection) seguidos de RT (radioterapia) y TMZ (Temozolomida). La resección tumoral debe ser mayor al 74 % de la masa para que la resección tenga un efecto significativo en la supervivencia **(Y. M. Li et al., 2016; Wolbers, 2014)** sin que el paciente presente un deterioro de la función neurológica. Para conseguir este objetivo contamos con técnicas quirúrgicas y herramientas intraoperatorias que nos ayudan a conseguir una cirugía más segura. Una de estas es la resección quirúrgica con mapeo funcional intraoperatorio ya sea con el paciente dormido o despierto que nos permite valorar dónde se localizan ciertas áreas elocuentes como la regiones del lenguaje, cálculo, lectura, escritura, motoras, sensitivas, etc. **(Lowenstein & Castro, 2012)**. Existen sustancias fluorescentes que nos permiten visualizar restos tumorales en los márgenes quirúrgicos. El 5 ALA (5-aminolevulinic acid) es un aminoácido precursor del grupo hemo que se le da al paciente que va a ser intervenido 6 horas antes de la cirugía a una dosis de 20 mg/Kg. Las células tumorales lo metabolizan en la mitocondria produciéndose protoporfirina IX , cuando estas células son expuestas a una luz azul con una longitud de onda 400-410 nm , debido a la gran cantidad de PP IX que acumulan desprenden fluorescencia roja y pueden distinguirse del parénquima cerebral

sano incrementando la GTR y por tanto la Supervivencia (Certo et al., 2020; Waqas et al., 2017). Existe otra sustancia fluorescente perteneciente al grupo de los Xantenos conocida como Fluoresceína Sódica. Su uso en Neurocirugía se remonta al año 1948. Se aplica por vía intravenosa en el momento en el que se incide la piel del paciente. Esta sustancia viaja en el torrente sanguíneo y pasa a la matriz extracelular del parénquima cerebral en las áreas en donde la BHE está dañada, siguiendo el mismo mecanismo de actuación que el contraste de la RM, el Gadolinio. Esta sustancia absorbe luz y emite una luz de unos 560 nm de longitud de onda que puede ser vista por el ojo humano empleando unos filtros específicos. De este modo, veremos que el área tumoral será fluorescente mientras que el tejido sano no lo será, guiándonos de este modo en la resección (Bömers et al., 2020; Della Puppa et al., 2019). Otra herramienta fundamental en el quirófano es el Navegador. Dicho instrumento consiste en un ordenador en el cual introducimos un estudio de imagen determinado del paciente que vamos a operar y un equipo de seguimiento, óptico o magnético, que nos permite mostrarle a la computadora dónde están en el espacio determinados puntos del estudio de imagen. De este modo durante la cirugía podremos saber en todo momento en qué región del parénquima cerebral nos encontramos respecto al estudio de imagen introducido, permitiéndonos realizar cirugías más seguras, y con unos márgenes de resección mayores (Gerard et al., 2017).

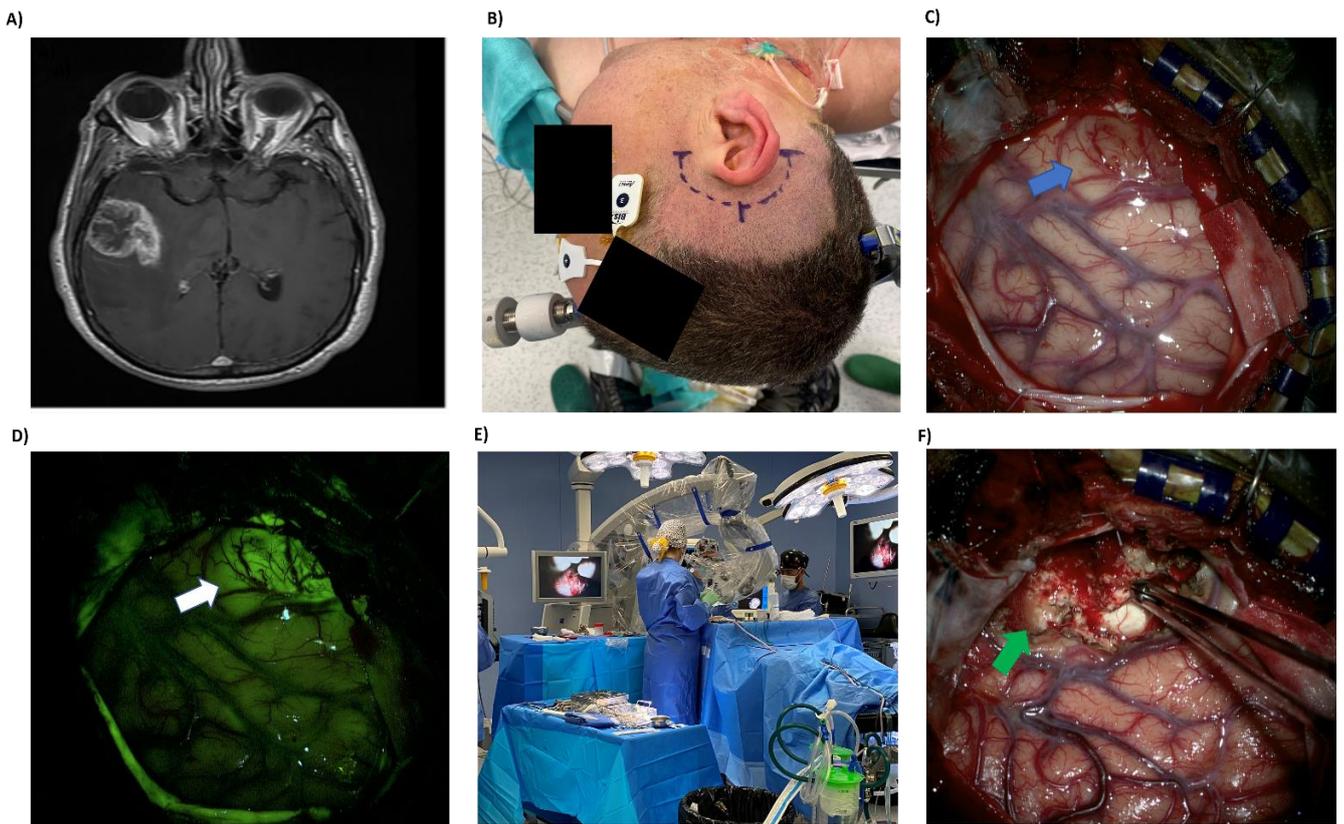


Figura 7: **A:** Lesión temporal derecha sugestiva de Glioma de alto grado de paciente del Hospital Universitario de Donostia **B:** Colocación quirúrgica del paciente: Decúbito supino, cabeza fijada a la mesa quirúrgica con cabezal de Mayfield y lateralizada hacia la izquierda. **C:** Una vez realizada la craneotomía y durotomía se aprecia corteza cerebral sana y corteza cerebral tumoral (flecha azul) **D:** Misma imagen que la anterior pero vista con modo que permite ver la luz amarilla de la Fluoresceína tras ser expuesta a luz azul de 494nm en las zonas donde la BHE está rota. **E:** Quirófano de Neurocirugía del H.U.D **F:** Resección quirúrgica macroscópicamente completa. Lecho tumoral (flecha verde)

5.3.2 Quimioterapia y Radioterapia:

Tras la cirugía, el postoperatorio y la comprobación de la correcta cicatrización de las heridas quirúrgicas se lleva a cabo el tratamiento complementario, cuyos pilares fundamentales son la Quimioterapia (con Temozolomida) y la Radioterapia (Radiación X). La Temozolomida es un agente alquilante, que de forma espontánea, al entrar en contacto con un PH mayor a 7 se hidroliza en su forma activa. Es liposoluble y atraviesa la BHE. Su mecanismo antiproliferativo consiste en la adición de un grupo alquilo (C_nH_{2n+1}) al extremo O o N de una base Nitrogenada del ADN. En concreto la forma activa de la TMZ añade grupos Metilo (CH3) al O6 de la Guanina. De esta forma se interrumpe la transcripción y replicación del ADN. (Strobel et al., 2019; Tsang et al., 1991) La radioterapia consiste en el empleo de radiaciones ionizantes, generalmente Rayos X, para dañar las células tumorales. Para ello se emplea un acelerador médico lineal que se encarga de acelerar fotones para que estos choquen contra un metal pesado y generar rayos X que serán conformados y dirigidos de forma específica contra el tumor a tratar. Dicha radiación produce la ionización de ciertas moléculas de la célula, radicales libre y alteraciones en el ADN y nuestro celular. Estos efectos son mucho mayores en las células que están proliferando que en las que están quiescentes. (Dunne-Daly, 1999) La máxima dosis de radiación que el cerebro puede tolerar son 20-25 Gy en una sola dosis o 60 Gy si se da de forma fraccionada. (Smart, 2017) El protocolo de tratamiento que se utiliza en la actualidad después de lograr la máxima resección segura consiste en dar 60 Gy de Radioterapia de forma fraccionada en 6 semanas, es decir, 30 días de tratamiento en los que cada día se dan 2 Gy de radiación de forma concomitante con TMZ 75mg/m² al día, diariamente, durante 6 semanas. Tras un mes de descanso se inicia una segunda etapa de tratamiento con TMZ en monoterapia 150-200mg/m² diariamente durante 5 días cada 28 días durante 6 ciclos. Este protocolo ha mostrado un aumento de la mediana de supervivencia (de unos dos meses de media) respecto al tratamiento con Radioterapia exclusivamente en diferentes estudios. (Feng et al., 2017; Szczepanek et al., 2013; Stupp et al., 2005) Tras la finalización de este protocolo de tratamiento las guías NICE: "National Institute for Health and Care Excellence" recomiendan la realización de RM de control cada 3-6 meses durante los primeros dos años, cada 6-12 meses hasta los 5 años y anualmente a partir de los 5 años de la finalización del tratamiento. El 50 % de los pacientes presentarán progresión o recurrencia a los 6.5 meses desde la finalización del protocolo STUPP (Stupp et al., 2005)

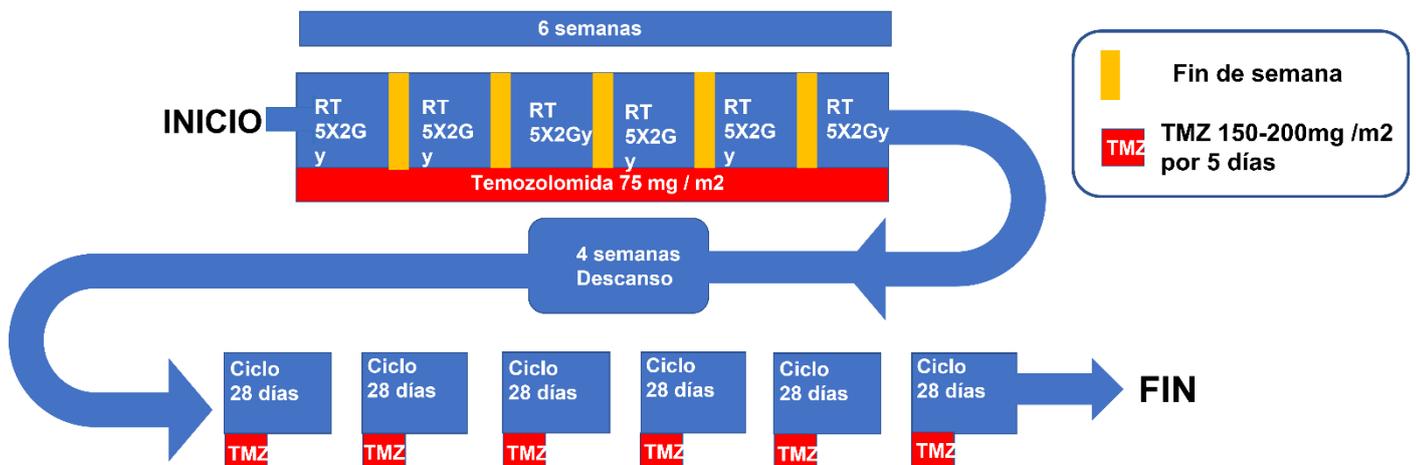


Figura 8: Esquema del tratamiento del Protocolo Stupp: TMZ+RT concomitante durante 6 semanas + 6 ciclos de 5 días de TMZ cada 28 días.

A)



B)

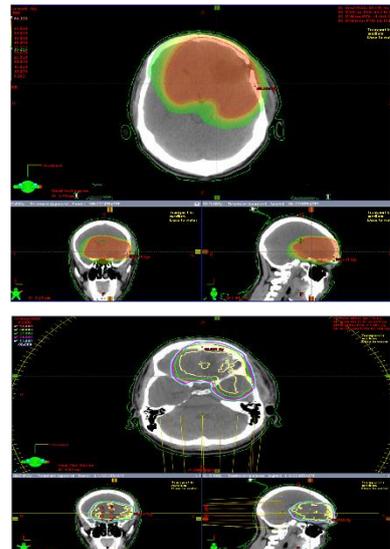


Figura 9: A: Sala de radioterapia. B: Estudio de planificación de radioterapia en paciente con Glioblastoma frontal. *Imágenes cedidas por cortesía del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Donostia.*

5.3.3 Valoración de la Respuesta al tratamiento:

En 1990 Macdonald publicó una serie de criterios que permitían valorar la respuesta al tratamiento de los Gliomas de alto grado de una forma objetiva. (**Macdonald et al., 1990**). Los criterios basan en la valoración de tres pilares: mediciones de los diámetros perpendiculares de la región captante de contraste en TAC (Tomografía Axial Computerizada) o RM (Resonancia Magnética), el incremento o disminución de la dosis de Corticoides y los cambios en la exploración neurológica. Es decir, un criterio radiológico (CT O RM) criterio clínico (estado neurológico) y criterio farmacológico (dosis de corticoides). Debemos saber que los estudios de imagen se comparan con el estudio de imagen justamente posterior a la máxima resección quirúrgica. En función de dichas variables los pacientes se asignaban a 4 grupos de respuesta al tratamiento: **Respuesta completa**, en la cual se aprecia una desaparición de la captación de contraste junto con una estabilidad o mejoría del estado neurológico en ausencia de corticoterapia; **Respuesta parcial**, en el cual se aprecia reducción igual o superior al 50 % del volumen de tejido captante de contraste, y estabilidad del estado neurológico y de la dosis de corticoterapia; **Progresión de enfermedad** o incremento en el 25 % del volumen captante, empeoramiento del estado neurológico y estabilidad o aumento de corticoterapia; **Enfermedad estable** o cualquier otra escenario diferente a los comentados anteriormente. Los criterios de Mcdonald fueron ampliamente empleados, pero presentaban una serie de limitaciones que comentaremos a continuación:

En ocasiones, tras el tratamiento con Quimio-Radioterapia en la RM se aprecian captaciones de Gadolinio mayores a las existían en la RM postoperatoria que desaparecen con el paso de los

meses y que no tiene que ver con progresión tumoral, si no con el daño de la radiación al tejido cerebral. Este escenario se conoce como Pseudoprogresión y no es tomada en cuenta en los criterios de Macdonald.

El Bevacizumab, anticuerpo monoclonal anti VEGF-A, produce una disminución de la permeabilidad capilar. Esto hace que la captación de contraste se mantenga estable o disminuya de una forma muy eficaz. Sin embargo, hasta en un 40 % de los pacientes esta estabilidad o disminución en la captación de contraste está acompañada de un incremento del volumen tumoral visto en secuencias T2/FLAIR. **(Delgado-López et al., 2018)**. Este escenario se conoce como Pseudorespuesta y tampoco está considerado en los criterios de Mcdonald.

Para dar respuesta a las limitaciones de los criterios anteriormente mencionados se estableció en el año 2010 un grupo de trabajo multidisciplinar en el que estaban incluidos Radiólogos, Oncólogos, neurólogos, Neurocirujanos y Neuropsicólogos conocido como grupo RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology) **(Wen et al., 2010)**. Los cambios más importantes introducidos fueron:

- La definición de lo que era medible radiológicamente y lo que no: se define como enfermedad medible cuando se pueden delimitar por RM los diámetros máximos perpendiculares entre sí de al menos una lesión que mida 10mm, visible en dos o más cortes axiales de 5mm.
- La valoración de la secuencia T2/FLAIR además del T1-Gadolinio.
- La introducción de los conceptos Pseudorespuesta y Pseudoprogresión.

Se establecieron 4 grupos de respuesta que pasamos a describir a continuación:

Respuesta Completa (RP): Se tienen que dar todas las condiciones que siguen a continuación

1. Desaparición completa de todas las lesiones con captación de contraste, medibles y no medibles, durante al menos 4 semanas
2. No aparición de nuevas lesiones.
3. Estabilidad o mejoría de las lesiones sin captación de contraste(T2/FLAIR)
4. El paciente debe estar sin corticoterapia y presentar mejoría o estabilidad neurológica.

Respuesta Parcial (RP): Se tienen que dar todas las condiciones que siguen a continuación

1. Reducción del 50 % o más de la suma de los productos de los diámetros mayores transversales de todas las lesiones captantes durante al menos 4 semanas.
2. No progresión de lesiones no medibles
3. No aparición de nuevas lesiones
4. Estabilidad o mejoría de lesiones sin captación de contraste (T2/FLAIR) mientras el paciente tiene una dosis de corticoides igual o inferior a las que presentaba cuando se realizó la RM basal.
5. El paciente debe presentar estabilidad o mejoría clínica.

Enfermedad Estable:

1. Estabilidad de las lesiones no captantes (T2/FLAIR) mientras el paciente se encuentra con dosis de glucocorticoides iguales o menores a las que presentaba cuando se realizó la RM basal.

Progresión de Enfermedad: Se tiene que dar CUALQUIERA de las siguientes:

1. Incremento del tamaño de las lesiones captantes del 25 % en comparación con la menor lesión captante de la RM basal o con la mejor respuesta obtenida.
2. Incremento en tamaño de las lesiones no captantes (T2/FLAIR) mientras el paciente presenta dosis estables o incrementadas de glucocorticoides comparado con la RM basal
3. Cualquier nueva lesión
4. Deterioro clínico que solamente se pueda explicar por la progresión tumoral.
5. Necesidad de incrementar dosis de glucocorticoides.

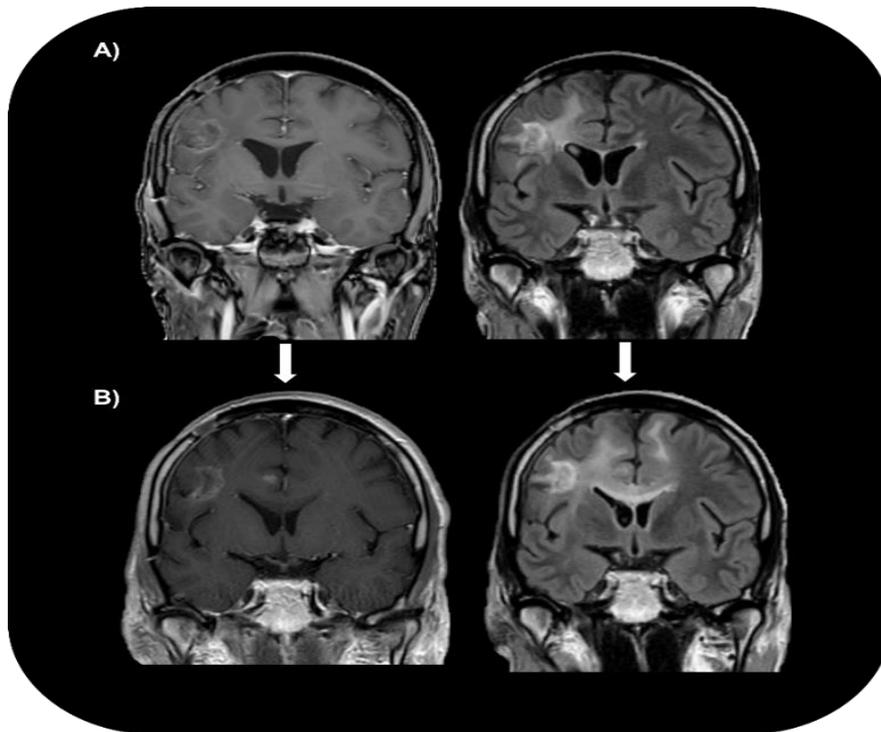


Figura 10: Ejemplo de Pseudorespuesta: Imagen de RM de paciente con Glioblastoma frontal derecho del H.U.D antes (A) y después (B) de tratamiento con Bevacizumab. Secuencias T1-Gad y Flair. En la imagen B se observa una disminución en la captación de gadolinio y un aumento en el volumen de tejido hiperintenso en el Flair en comparación con la imagen A. Típica imagen de pseudorespuesta tras manejo con Bevacizumab.

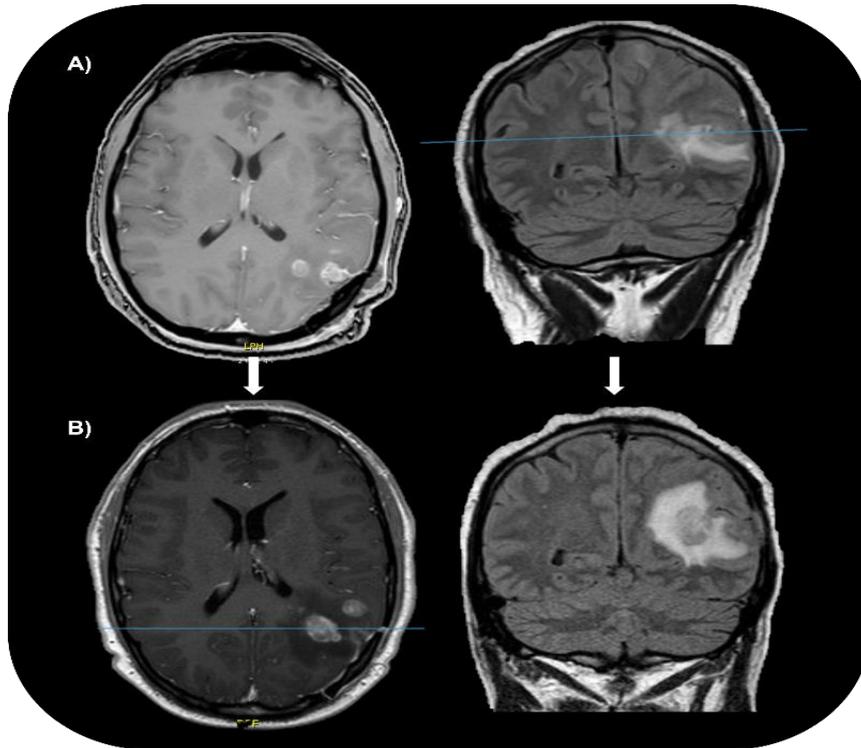


Figura 11: Ejemplo de Progresión Radiológica: Imagen de RM de paciente con Glioblastoma parietal izquierdo del H.U.D. Secuencias T1-Gad y Flair. En la imagen B se observa aumento de la captación de gadolinio y un aumento en el volumen de tejido hiperintenso en el Flair en comparación con la imagen A.

5.3.4 Manejo terapéutico del Glioblastoma Recurrente

Como hemos visto anteriormente tarde o temprano todos los pacientes con Glioblastoma presentarán una recurrencia o progresión tumoral. Ahora comentaremos las diferentes alternativas de tratamiento empleadas como segunda línea.

5.3.4.1 Recirugía:

Una segunda cirugía es posible hasta en un cuarto de los pacientes con recurrencia **(Niyazi et al., 2011)** Es necesario llevar a cabo una valoración previa del estado del paciente mediante la escala funcional de Karnofsky. Un estado funcional mayor a 70 (Actividad normal con esfuerzo) es uno de los mejores factores pronósticos de la reintervención quirúrgica **(Carson et al., 2007)**. Es necesario valorar la extensión tumoral en el parénquima cerebral y dilucidar si la resección es posible sin dejar déficits neurológicos Existe una escala que predice la supervivencia de los pacientes con recurrencia reintervenidos. Dicha escala tiene dos variables Karnofsky < 70 (1 punto) y captación de contraste en región endocranial (1 punto) y zona subventricular. Si el resultado obtenido es menor a 2 , se recomienda llevar a cabo actitud activa (reintervención más terapia complementaria) **(Park et al., 2013)** Si la recirugía está indicada varios estudios han comprobado que mejora la Supervivencia respecto a la abstención terapéutica y presenta una mediana de supervivencia de 9,6 meses desde la reintervención **(Pasqualetti et al., 2021)**

5.3.4.2 Quimioterapia:

Numerosos fármacos (combinados o en monoterapia) han sido comparados en función de la Supervivencia para el tratamiento del Glioblastoma recurrente. Según las guías NICE (“National Institute for Health and Care Excellence”) del año 2021 los tratamientos quimioterápicos recomendados para el Glioblastoma recurrente son los siguientes; Temozolomida, Losmustina(fármaco alquilante) sola o en combinación con otros quimioterápicos como la Procarbazona (alquilante) y Vincristina (impide la separación celular durante la mitosis por alteración de los microtúbulos) **(National Institute for Health and Care Excellence (Great Britain), 2018)** Una Revisión sistemática de la Chocrane recomienda el uso de Lomustina en monoterapia para el manejo del Glioblastoma recurrente ya que no ha encontrado mejorías en la OS pero sí mayor número de efectos adversos al combinarlo con otros fármacos quimioterápicos. **(Lawrie et al., 2020)**

5.3.4.3 Re-Radioterapia:

Al igual que el apartado anterior no existen estudios con la consistencia necesaria como para establecer un manejo obligado. **(Niyazi et al., 2011)** El principal problema de la Re-radiación es la radionecrosis del tejido circundante, sin embargo parece que no se produce un aumento de la incidencia de necrosis significativo hasta que las dosis aplicadas no superan los 100Gy **(Mayer & Sminia, 2008)** Para disminuir la toxicidad se recomienda usar técnicas que apliquen radiación en una zona localizada del parénquima cerebral como son la Radioterapia Estereotáctica Hipofraccionada o la Radiocirugía Estereotáctica. A pesar de la falta de estudios aleatorizados y controlados parece que en pacientes jóvenes , con un buen estado funcional y con un volumen tumoral pequeño podrían beneficiarse de radioterapia fraccionada localizada **(Chapman et al., 2019; Lawrie et al., 2020)**

A pesar de estos tratamientos la supervivencia desde la recurrencia es escasa (**Woodroffe et al., 2020**) por lo que nuevas estrategias centradas en los aspectos moleculares del Glioblastoma están siendo cada vez más estudiadas.

5.3.5 *Nuevas Terapias en el Glioblastoma*

La supervivencia de los pacientes con Glioblastoma es muy pobre aún con un tratamiento multimodal muy agresivo. El manejo estándar que consiste en cirugía, quimioterapia y radioterapia se ha mantenido sin cambios desde el 2005. Desde entonces solamente dos nuevos tratamientos han sido aprobados por la FDA e incluidos en las guías de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (**Nabors et al., 2020**); el Bevacizumab y los “Tumor-Treating Fields” (TTF) En este apartado comentaremos primero estos dos nuevos abordajes terapéuticos para después echar un vistazo a las líneas terapéuticas emergentes en Glioblastoma.

5.3.5.1 *Bevacizumab:*

El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular A (VEGF-A). Dicho factor se une a sus receptores (VEGFR) en las células endoteliales estimulando la angiogénesis, vasculogénesis, aumentando la permeabilidad vascular, estimulando la migración celular e inhibiendo la apoptosis. (**Kazazi-Hyseni et al., 2010**) En el año 2009 este fármaco fue aprobado por la FDA para ser usado en el manejo del Glioblastoma (**Cohen et al., 2009**) sin embargo ensayos posteriores mostraron que el tratamiento con Bevacizumab mejora la Supervivencia libre de enfermedad pero NO mejora la supervivencia global por lo que fue indicado como tratamiento para el Glioblastoma recurrente (**Feng et al., 2017**)

5.3.5.2 *Tumor-Treating Fields*

En cuanto al tratamiento con TTF o “Alternating Electric field therapy” consiste en la aplicación transcutánea de campos eléctricos de baja intensidad (1-3V/cm) y frecuencia intermedia (200 kHz) sobre la zona próxima a la localización tumoral. (**Rominiyi et al., 2021**) Este campo eléctrico altera las moléculas polares del interior celular inhibiendo la separación del material genético durante la división celular. Fue aprobado por la FDA en el 2011 para el tratamiento del Glioblastoma recurrente, y en 2015 para el tratamiento del Glioblastoma de nuevo diagnóstico, tras realizar un ensayo clínico en el que se observó que el tratamiento concomitante TMZ-TTF aumentaba la supervivencia global en 5 meses comparado con manejo estándar. (**Fisher & Adamson, 2021; Stupp et al., 2017**)

En los últimos años se han iniciado docenas de Ensayos Clínicos en los que se han testado numerosas nuevas moléculas pertenecientes a nuevos abordajes multimodales. A continuación, describiremos brevemente los conceptos más destacables de dichos abordajes terapéuticos emergentes.

Berubicina: Pertenece al grupo de las antraciclinas, fue creada por Dr Waldemar Priebe. Es un derivado de la Doxorubicina (Adriacina), a la cual se le añadió un grupo químico que la vuelve

altamente lipófila y por tanto presenta la capacidad de atravesar la BHE. La berubicina interrumpe la actividad de la enzima Topoisomerasa II, la cual tiene un papel fundamental durante la replicación del ADN ya que es la encargada de relajar la banda de ADN evitando el superenrollamiento que se forma delante de la burbuja replicativa. De este modo la Berubicina impide la replicación del ADN de las células en estado proliferativo en el SNC. **(National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 9874592, Berubicin., 2021)** La FDA le ha otorgado a la empresa CNS PHARMACEUTICALS la designación de “fast track” a la Berubicina para la realización de un Ensayo Clínico fase II en el tratamiento del Glioblastoma recurrente. **(linicaltrials.gov : identifier NCT04762069).**

Inmunoterapia: Esta terapéutica centra su objetivo en ayudar al sistema inmune humoral y celular del paciente a reconocer y destruir células cancerosas. Esta terapia ha obtenido resultados prometedores en el tratamiento de tumores extracraneales como el melanoma o tumores pulmonares de célula no pequeña **(Giroux Leprieur et al., 2017; Weiss et al., 2019)** por lo que se han llevado a cabo múltiples ensayos clínicos con diferentes moléculas que veremos a continuación **(Weenink et al., 2020):**

- Moléculas inhibidoras de puntos de control (Check Point Inhibitors): Los puntos de control inmunitarios son moléculas receptoras de las células inmunitarias que al estimularse producen la inhibición de estas, deteniendo así la respuesta inmune. Este es un mecanismo empleado en el funcionamiento normal del organismo para impedir eventos autoinmunitarios. Las más destacadas son PD-1 (Programmed cell death protein 1) y CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ambas expresadas en la membrana de los Linfocitos T CD8. **(He & Xu, 2020; La-Beck et al., 2015)** Los tumores consiguen sobreexpresar estas moléculas (immune check point) para inhibir la inmunidad del huésped y así conseguir desarrollarse. Los inhibidores de estas moléculas contrarrestan esta evasión de la respuesta inmune tumoral. Cemiplimab, Nivolumab, Pembrolizumab, Ipilimumab son algunos de los anticuerpos monoclonales anti PD1 y anti CTLA4 que se han probado en Glioblastoma **(Ready et al., 2020; Reardon, Brandes, et al., 2020)**
- Vacunas: La estrategia de estas vacunas es muy similar al de las vacunas empleadas para la prevención de ciertas enfermedades infecciosas. Consiste en la estimulación de poblaciones de Linfocitos T que respondan de forma específica contra ciertos antígenos tumorales mediante la inoculación de antígenos asociados a tumores o antígenos específicos tumorales. En el Glioblastoma se ha realizado numerosos ensayos clínicos de vacunación introduciendo antígenos de GSC, péptido de la variante 3 del EGFR, IDH, células tumorales irradiadas, tumor lisado, ARNm de células stem etc. Un ejemplo es el Rindopemimut, vacuna en la que se introdujo el péptido EGFRvIII en pacientes con tumores con expresión de esta mutación. La fase II de este ensayo no mostró mejorías en la supervivencia. **(Reardon, Desjardins, et al., 2020)**
- Transferencia de células efectoras modificadas genéticamente: Esta idea consiste en la introducción en el organismo del paciente de Linfocitos T, y otras células efectoras como las NK autólogas que han sido modificados genéticamente para que presenten en su superficie receptores antigénicos quiméricos contra un antígeno tumoral específico de forma que reconozcan antígenos específicos de las células tumorales contra los que se van a emplear. **(Chow & Gottschalk, 2011)** . Un ejemplo son las EGFRvIII directed CAR-T

cells, el contrapunto de esta terapia es que se ha visto que los tumores llevan a cabo un escape antigénico con facilidad dejando de expresar este antígeno y portando haciendo inefectiva esta terapia. **(O'Rourke et al., 2017)**. Se han realizado múltiples ensayos clínicos de esta terapia en Glioblastoma y ninguno en fase III ha mostrado mejoría en la OS **(Goff et al., 2019; Migliorini et al., 2018)**

Los resultados de la inmunoterapia en el Glioblastoma han sido poco satisfactorios. Esto se debe a una serie de características del microambiente tumoral que comentaremos brevemente: El TMB ("Tumor Mutational Burden") es más bajo que en otros tipos de tumores. El TMB se define como el número de mutaciones somáticas detectadas por Megabase de DNA tumoral (nº mutaciones/Mb). Los tumores que presentan un TMB alto son portadores de multitud de neoantígenos tumorales fácilmente reconocibles como no-proprios por el Sistema Inmune provocando la activación de las células T y una respuesta inmune específica contra las células tumorales. **(Fusco et al., 2021)** Además, el privilegio inmune del SNC tiene como consecuencia la escasa aparición de linfocitos TCD 8 en los Glioblastomas en comparación con otros tumores extracraneales. La infiltración tumoral de Linfocitos TCD8 se asocia a una mayor supervivencia en Glioblastoma. **(Yang et al., 2010)** En contraste con el bajo número de LTCD8 existe un elevado número de Tumor Associated Macrophages (TAMs). Los TAMs presentan un efecto inmunosupresor debido a la activación de la vía TGF b y de los linfocitos T reguladores. **(Hambardzumyan et al., 2016)** En resumen, este microambiente tumoral inmunosupresor explica los limitados resultados de la inmunoterapia en Glioblastoma.

Terapias Dirigidas: Como veremos a continuación, en las células de Glioblastoma, al igual que en cualquier tipo de célula tumoral, existen multitud de vías de señalización desreguladas debido a la sobreexpresión de moléculas que participan estas. Esto induce que estas células tumorales presenten ventajas metabólicas, proliferativas y de supervivencia respecto a las células del tejido sano. Las terapias dirigidas se basan en la creación de compuestos (pequeñas moléculas, anticuerpos monoclonales o conjugados Fármaco-Anticuerpo) que logren la inhibición de determinadas moléculas claves en estas vías de señalización celular, logrando su regulación y por tanto disminuyendo la capacidad tumorigénica de las células tumorales.

A continuación, simplemente nominaremos las principales moléculas estudiadas en los últimos años. No nos centraremos en explicar el mecanismo de la molécula a la que inhiben y cómo esta actúa en determinada vía de señalización celular ya que esto lo trataremos en el apartado de Biología Molecular del Glioblastoma.

Como ejemplo de pequeñas moléculas inhibitoras tenemos el Gefitinib y Erlotinib, las cuales se unen al EGFR y anulan sus cascada de señalización **(Lassman et al., 2005)**, Abemaciclib o Ribociclib, los cuales inhiben las CDK 4 y CDK 6. **(Tien et al., 2019)** En cuanto a los anticuerpos monoclonales podemos citar el conocido Bevacizumab explicado anteriormente o el Cetuximab, el cual inhibe al EGFR. Depatuzumab-mafodotín es un conjugado Fármaco-Anticuerpo que se une a las células que amplifican en el EGFR y libera una toxina que daña los microtúbulos e impide la proliferación de esas células. **(Van Den Bent et al., 2020)**.

Otras Terapias

El empleo de fármacos radiosensibilizantes es otra estrategia terapéutica novedosa en estudio. En este campo están siendo estudiadas los inhibidores de la PARP :[Poly-(ADP-Ribose)-DNA Polymerase] (Olaparib)(**Lesueur et al., 2019**), los inhibidores de la ADN-PK (CC-115) y los inhibidores de las vías ATM-ATR (AZD1390) (**Munster et al., 2019**) Nuevas formas de Radioterapia están siendo estudiadas en numerosos ensayos clínicos entre las que se encuentran la Radiocirugía ZapX, el Gamma tile , Flash Radiotherapy y la Terapia Térmica Intersticial Laser.(**Ferreira et al., 2021; Weidlich et al., 2019**)

Hemos de saber que todas estas terapias que tan buenos resultados han tenido en otros tipos de cáncer, en Glioblastoma a pesar de presentar resultados prometedores a nivel preclínico, no han demostrado mejoría respecto al tratamiento convencional en ensayos clínicos.

5.4 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GLIOBLASTOMA

En apartados anteriores hemos visto que tanto el Diagnóstico como el tratamiento del Glioblastoma se basa en el estudio de las moléculas más destacables de múltiples vías de señalización celular, es decir de la biología molecular de este tumor cerebral. A continuación, trataremos de explicar y contextualizar los aspectos más destacados de la biología molecular del Glioblastoma.

5.4.1 *Hallmarks del Glioblastoma*

Hanahan y Weinberg nos ayudaron a comprender las complejidades de la enfermedad del cáncer resumiendo el proceso múltiple de oncogénesis en 8 capacidades biológicas que permite el crecimiento tumoral: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, Resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción la angiogénesis y activando la invasión y metástasis, reprogramando el metabolismo energético y evadiendo la destrucción inmunológica. **(Hanahan & Weinberg, 2000, 2011)**

Aquí intentaremos resumir los aspectos principales de cada “Hallmark” en Glioblastoma. Dentro de cada Hallmark mencionaremos y haremos hincapié en el funcionamiento de determinados marcadores moleculares importantes en el Glioblastoma como son EGFR, P53, PTEN e IDH

5.4.1.1 *Mantenimiento de la señalización proliferativa:*

Las células normales necesitan señales de crecimiento mitogénicas (GS) proporcionadas por el entorno (estimulación heterotópica / endocrina) para que puedan pasar de un estado inactivo a un estado proliferativo. Las células cancerosas, en cambio, no dependen de la estimulación del crecimiento exógena porque adquieren autonomía de estimulación del crecimiento a través de 3 estrategias comunes:

- **Adquisición de alteraciones en las señales de crecimiento extracelular:** Por lo general, los factores de crecimiento mitógenos solubles (FG) son creados por un tipo de célula para estimular la proliferación en otro tipo, esto se llama señalización heterotópica. La mayoría de las células cancerosas son capaces de crear sus propios FG y se estimulan por sí mismas, esto se denomina estimulación autocrina. Un ejemplo de este mecanismo en el Glioblastoma es la producción autocrina del factor de crecimiento soluble TGF alfa (Factor de crecimiento tumoral alfa) estimulando los receptores EGFR y activando la cascada de señalización celular que estimulará la proliferación celular **(Tang et al., 1997)**

- **Adquisición de alteraciones en los receptores de la superficie celular:** Este mecanismo implica que los receptores de la superficie celular, normalmente Tirosina Kinasa, que transducen las señales de crecimiento hacia el circuito citoplasmático, están sobreexpresados. Esta sobreexpresión consigue que la célula puede sobreproliferar incluso con un nivel ambiental normal de FG. Los receptores también pueden sufrir alteraciones estructurales que conducen a la señalización de crecimiento independiente del ligando. Como ejemplo de receptores de superficie celular alterados tenemos al

- **EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).** Este es un receptor transmembrana del tipo tirosin quinasa perteneciente a la familia de receptores ErbB (EGFR , HER2/neu , Her 3 y Her 4) cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 7p12 (**H. Zhang et al., 2007**). Este receptor puede ser activado por varios ligandos entre los que se encuentran EGF y TGF α . Tras dicha activación se fosforilan los residuos de Tirosina produciéndose una activación de la vía MAPK, lo que , tras la activación en cadena de diferentes proteínas intracelulares, conlleva a la activación del complejo mTOR y la inactivación de P27 lo que produce el aumento de la proliferación , supervivencia y síntesis de ADN celular(**Narita et al., 2002; Tanaka et al., 2011**). Existen diferentes tipos de alteraciones del EGFR: La sobreexpresión de este receptor se da en el 22- 89 % de los astrocitomas de grado IV, y consiste en un aumento de la transcripción del gen sin que exista alteraciones en el ADN. Las amplificaciones se observan en el 34-64% de los astrocitomas de grado IV, siendo la polisomía del cromosoma 7 la más frecuente alteración del número de copias de EGFR en Gliomas. Dichas amplificaciones ocurren en 57,4% de los GBM primarios , mientras que solamente se dan en el 8 % de los secundarios (C. W. Brennan, Verhaak, McKenna, Campos, TCGA Research Network, et al., 2013; Maire & Ligon, 2014) Las deleciones de determinados dominios de extracelulares del EGFR dan lugar a cinco variantes de las cuales dos son Oncogénicas : EGFR VII (delección de exones 14 y 15) y EGFR VIII (delección de exones 15-15) Siendo esta última la más frecuentes(**An et al., 2018**). En diferentes estudios se ha valorado la expresión de EGFR como marcador pronóstico de la enfermedad o de respuesta a tratamiento en casos de administración de EGFR ITKs (Erlotinib, Gefitinib) o anticuerpos monoclonales contra EGFR (Cetuximab, Nimotuzumab) sin embargo muestran resultados contradictorios y por lo tanto el estatus de EGFR como marcador clínico es controvertido (**Saadeh et al., 2018**).

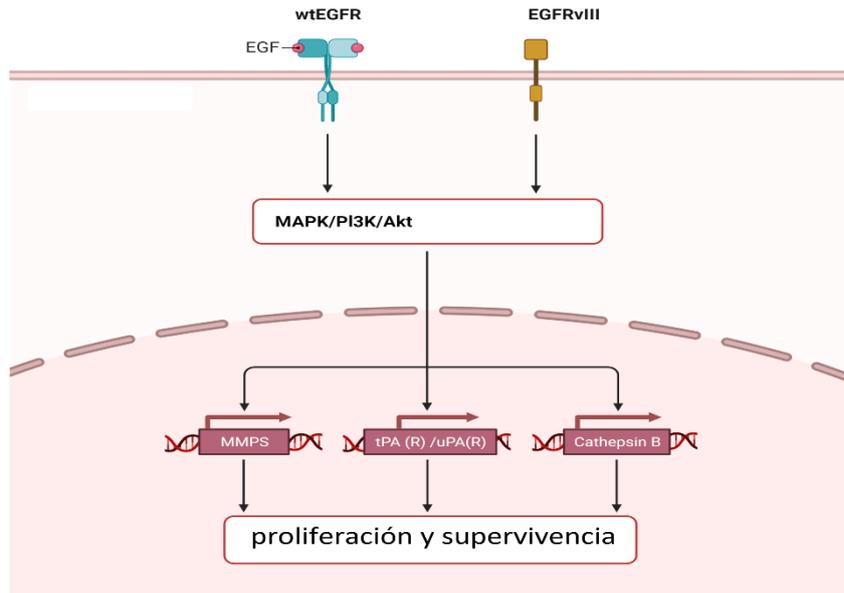


Figura 12: La activación del EGFR desencadena señales que promueven proliferación y supervivencia celular.

- **Adquisición de alteraciones en los componentes del circuito citoplasmático de las principales vías de señalización del crecimiento celular:** Tras la activación de un receptor celular se produce una activación de moléculas citoplasmáticas que son las encargadas de la transducción de la señal. En ocasiones las células tumorales presentan alteraciones a este nivel lo que genera que se puedan activar señales proliferativas sin la estimulación continua de los receptores. La principal cascada mitogénica está constituida por SOS-Ras-Raf -MAPK entre otros. Una cuarta parte de todos los tumores humanos presentan alteraciones en las proteínas RAS. El 2 % de los Glioblastomas presentan mutaciones en las diferentes proteínas RAS. (C. W. Brennan, Verhaak, McKenna, Campos, McLendon, et al., 2013; Holmen & Williams, 2005; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

5.4.1.2 Evasión de los supresores de Crecimiento:

El ciclo celular en un tejido normal consta de cuatro fases:

Fase G1 en la cual la célula crece de tamaño y duplica orgánulos pero no cambia el contenido genético. Fase S en la cual la célula duplica el material genético. Fase G2 la célula aumenta su tamaño y se prepara para la fase M (mitosis y citocinesis). Después de la fase M, la célula puede mantener la fase inicial G1 o pasar al estado de reposo G0, saliendo del ciclo celular **Fig 13**

Las células normales reciben señales antiproliferativas para mantener la inactividad celular y la homeostasis tisular. Todas estas señales son que impiden que la célula pase de la fase G1 a la fase S son procesadas principalmente por la proteína del retinoblastoma (pRB) que forma parte de la vía p16INK4a /CDK4 / RB1. Esta vía funciona de la siguiente manera: Cuando la pRB está hipofosforilada, bloquea a los factores de transcripción E2F responsables del paso de la célula de la fase G1 a la fase S. p16INK4a se encarga del bloqueo a las CDK que son las que fosforilan a pRB, impidiendo su función como supresor de tumores (Fåhræus et al., 1996). Las mutaciones en esta vía se encuentran en el 50 % de los Glioblastomas primarios y en el 40 % de los secundarios (Biernat et al., 1997) En el estudio del TCGA (The Cancer Genome Atlas) el 78 % de las muestras de Glioblastoma presentaban mutaciones en la vía de señalización de pRB (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

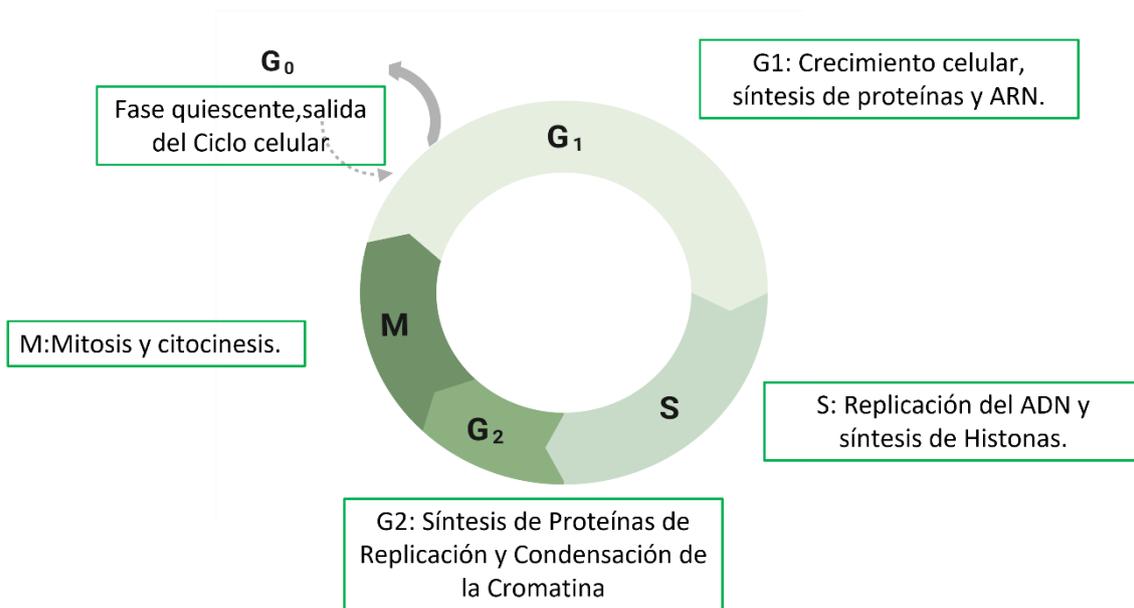


Figura 13: Fases del Ciclo Celular. Creado con BioRender.com

5.4.1.3 Activación de invasión y metástasis:

Las metástasis a distancia en el Glioblastoma son extremadamente raras, se dan en menos del 0,5 % de los pacientes y se cree que es debido a una suma de factores: la rápida progresión tumoral sumado al aislamiento del SNC del resto del organismo gracias a la BHE (Rossi et al., 2020) Sin embargo la invasión de zonas cerebrales adyacentes al tumor es frecuente y se produce en poco tiempo. Las células de Glioblastoma presentan una expresión disminuida de Conexina 43, una de las proteínas fundamentales en el correcto funcionamiento de las uniones celulares GAP o en hendidura. Esta alteración de las uniones entre células tiene un papel importante en la capacidad invasiva de este tumor (Aftab et al., 2015) Un mecanismo fundamental en el proceso de invasión tumoral del Glioblastoma es la Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) de las células tumorales. A continuación, daremos unas pinceladas sobre este concepto. La EMT es un proceso biológico mediante el cual células polarizadas epiteliales, adheridas a la membrana basal, se desprenden de dicha membrana basal y adquieren características de células mesenquimales. Como hemos dicho, es un proceso biológico que ocurre de forma natural en el organismo durante la embriogénesis, en la cual las células epiteliales adquieren la movilidad necesaria para la gastrulación y la formación de la cresta

neural (**Knecht & Bronner-Fraser, 2002**) y durante el proceso de cicatrización de las heridas. La EMT se produce también en células de diferentes tumores y les permite adquirir características más favorables para la invasión y metástasis. Este proceso parece ser reversible y estar muy influenciado por el microambiente tumoral (**Dumont et al., 2008**) La hipoxia tisular y el proceso inflamatorio del entorno tumoral activan una serie de cambios epigenéticos que desencadenan la EMT (**Charles et al., 2011**) En concreto parece que la hipoxia tisular y la llegada de células inflamatorias desencadenan la liberación de TGF β , factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDGF) y Factor de crecimiento fibroblástico II (FGFR2) que desencadena la activación de una serie de factores de transcripción como son Twist, Snail, Slug, Zeb etc. requeridos para el inicio de la EMT (**Nagaishi et al., 2012**). Tras este proceso las células tumorales pierden la E-caderina (glucoproteína que participa en la formación de las uniones intercelulares) y se desanclan de la matriz, adquiriendo gran capacidad de movilidad, de invasión y presentando mayor Resistencia a los agentes genotóxicos y a la apoptosis (**Dongre & Weinberg, 2019; Iwadate, 2016; Kalluri & Weinberg, 2009**).

5.4.1.4 Inmortalidad Replicativa

Las células humanas presentan una capacidad finita de división. Si dejamos en una placa de cultivo células dividiéndose veremos que pasado cierto tiempo presentarán un stop de ese proceso replicativo. Ese primer punto de control es el que conocemos como senescencia replicativa ejercido sobre todo a través de las vías de p53 y de p16/ Ink4a (**Collado et al., 2007**). Si alteramos las vías anteriores de forma que la célula pueda seguir dividiéndose todavía más llegará un punto en el que se producirá una muerte celular masiva en nuestra placa de cultivo. En ocasiones, una célula de ese cultivo (1 de 10^7) escapa a esa muerte celular masiva y continua dividiéndose de forma ininterrumpida. Decimos que esa célula se ha inmortalizado (**Irfan Maqsood et al., 2013**) Lo que hace que las células humanas presenten una capacidad finita de división son los Telómeros. Estos son estructuras de recubrimiento situadas al final de los cromosomas circulares de los organismos eucariotas. Consisten en secuencias de 6 nucleótidos (TTAGGG y su complementario) que se repiten en tándem unas 2000 veces. Su función es la de dar estabilidad a los cromosomas, evitar que estos se fusionen, protegiendo así los genes (**Hug & Lingner, 2006**). La replicación del ADN produce un acortamiento de los telómeros debido a la imposibilidad de la ADN polimerasa 3 de añadir pares de bases al extremo 5'. Cuando el telómero es demasiado corto se producen errores en la replicación que llevan a la célula a la senescencia replicativa. Uno de los mecanismos de escape de la senescencia replicativa de las células tumorales consiste en la ampliación de estas estructuras. Esto ocurre debido a mutaciones en

- **TERT, ATRX, DAXX:** La Telomerasa es una ribonucleoproteína transcriptasa inversa. Se encarga de ampliar los telómeros para evitar su degradación y que así la célula pueda seguir dividiéndose al añadir desoxiribonucleótidos a los extremos de los telómeros. Presenta un componente ribonucleotídico (TER) y un componente proteico (TERT) que

es el que tiene la actividad Transcriptasa Inversa. Es en el promotor de esta subunidad (TERTp) dónde se hallan las mutaciones que originan una telomerasa hiperactivada que permite que las células tumorales escapen a la Senescencia replicativa (**O'Sullivan & Karlseder, 2010**) Existen dos tipos mutaciones en este gen (C228T y C250T), son mutuamente excluyentes y se encuentran hasta en el 80 % de todos los gliomas y en el 50 % de los Glioblastomas(**Eckel-Passow et al., 2015; Olympios et al., 2021**) En cuanto a TERTp como factor pronóstico independiente los estudios son contradictorios y hay evidencia tanto a favor como en contra. En la actualidad las terapias dirigidas contra TERTp están siendo investigadas y aún no hay ningún fármaco comercializado(**Hewer et al., 2017; Pekmezci et al., 2017**). Además del alargamiento de los telómeros dependientes de la Telomerasa existe una vía alternativa mediante la cual la célula tumoral consigue alargar los telómeros a través de un mecanismo independiente de la telomerasa. Dicho mecanismo se denomina ALT(“ alternative lengthening of Telomers”) y está presente en el 75 % de los Glioblastomas secundarios que presentan expresión normal de Telomerasa y TERT WT(**Fan et al., 2019**) La ATRX , también conocida como Helicasa ATRX dependiente de ATP o Helicasa II ligada al cromosoma X es una proteína remodeladora de los complejos de cromatina que junto a DAXX (“death-domain-associated protein”) añade la histona H3.3 a la cromatina nuclear impidiendo el proceso ALT.(**De La Fuente et al., 2011; Haase et al., 2018**).

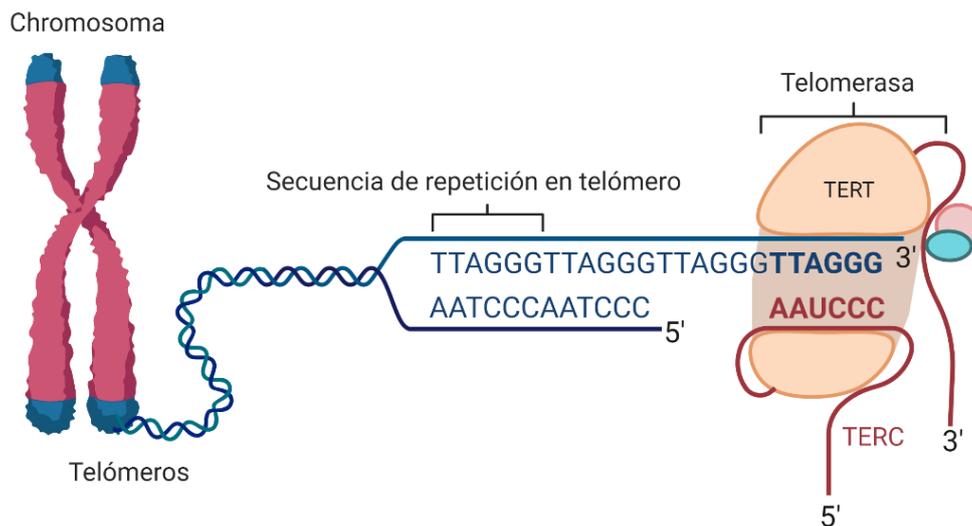


Figura 14: Debido a la imposibilidad de la ADN Polimerasa 3 de añadir pares de bases en el segmento 5', se produce un acortamiento progresivo de los extremos de los telómeros. La telomerasa es la enzima que se encarga de añadir pares de bases al extremo 5'. *Figura Creada con BioRender.com*

5.4.1.5 *Inducción de la angiogénesis:*

Todas las células del organismo requieren estar situadas a una distancia de menos de 150 micras de un capilar para poder llevar a cabo sus requerimientos homeostáticos (**Bryant, 1984**) Durante la embriogénesis se produce el desarrollo de nuevas células endoteliales que se agrupan formando una estructura vascular (vasculogénesis) además del brote de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya formados (angiogénesis) Este proceso se mantiene quiescente durante nuestra edad, salvo que se necesite la formación de nuevos vasos como puede ser en procesos de adaptación fisiológica al deporte o en el caso de autoreparación tisular (**Papetti & Herman, 2002**). Este balance se mantiene mediante la correcta regulación de factores pro y antiangiogénicos que se unen a receptores de las células endoteliales. Durante la tumorigénesis, en un estado temprano del desarrollo tumoral, se produce un cambio angiogénico que altera el balance a favor de las sustancias angiogénicas. El VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) y el FGF 1 y 2 son las principales proteínas que tras unirse a receptores Tirosin-Kinasa de las células endoteliales estimulan la vasculogénesis y angiogénesis. Por la contra TSP-1 es un péptido que se une al receptor CD36 de las células endoteliales impidiendo su proliferación y migración (**Hanahan & Folkman, 1996**). La hipoxia del microambiente del Glioblastoma estimula la liberación de VEGF por las células tumorales, la vasculogénesis y la angiogénesis. Estudios recientes indican que las Glioma Stem cells, además de sus conocidas capacidades (**Ahmed et al., 2013**) (gran capacidad de autorrenovación, capacidad de formación de tumores tras xenotransplante, resistencia a quimioterapia y radioterapia) tienen un papel fundamental en la formación de nuevos vasos intratumorales ya que sufren un cambio fenotípico y derivan en células endoteliales y pericitos (**S. Das & Marsden, 2013**).

5.4.1.6 *Evasión de la muerte celular:*

La capacidad de un tumor para expandirse no solo viene determinada por la capacidad de sus células para proliferar sino por la capacidad de sus células de evadir la muerte celular programada. La resistencia a la apoptosis es una característica que se da en todos los tipos tumorales (**Hanahan & Weinberg, 2000**) La apoptosis consiste en la inactivación de una célula o grupo de células de una forma controlada de forma que tras la activación de este proceso las membranas celulares se rompen, el citoplasma y los esqueletos nucleares se descomponen, el citosol se extruye, los cromosomas se degradan y el núcleo se fragmenta, todo en un lapso de 30 a 120 min. (**Wong, 2011**) La maquinaria apoptótica está constituida por una serie de sensores que monitorizan las señales intra y extracelulares y una serie de efectores que desencadenan la respuesta. En cuanto a los sensores que reciben señales de extracelulares tenemos a ligandos que emiten señales de supervivencia como IGF1 , IGF2 e IL3 y sus correspondientes receptores transmembrana, y ligandos que emiten señales de muerte celular programado como son TNF alfa y FAS. En el interior celular tenemos sensores que monitorizan el estado de la célula, el más conocido es

- **P53, el guardián del genoma:** Este sensor está localizado en el cromosoma 17p13.1. y codifica la proteína p53 la cual está compuesta por 293 aminoácidos y tiene un peso molecular de 53KDa. Dicha proteína funciona como factor de transcripción y está formada por diferentes dominios. El dominio de mayor tamaño (98 residuos) es el que se une al ADN y el que acumula el mayor número de mutaciones de este gen en el GBM. Los otros dominios se comunican con vías que regulan su actividad transcripcional.

(Joerger & Fersht, 2008). La función de P 53 consiste en mantener la integridad del genoma respondiendo a estímulos nocivos (daño del ADN celular, genotoxicidad, activación de señales de crecimiento aberrantes, activación de oncogenes) promoviendo detención del ciclo celular , senescencia y apoptosis. Además, p53 presenta un papel importante en la regulación del metabolismo celular, autofagia , invasión , metástasis , microambiente e inmunidad (Kasthuber & Lowe, 2017). Antes de pasar a describir las mutaciones que más frecuentemente se dan en la vía P53 debemos explicar brevemente el funcionamiento de la vía p53-ARF-MDM2/4: Cuando un estímulo estresante se produce se activan una serie de proteínas (MYC, E2F1, E1A) que activan la proteína ARF (miembro de la superfamilia RAS) la cual produce degradación de MDMD2 y MDM4, proteínas que regulan negativamente a P53 por lo que se produce un aumento de la concentración de p53 (Sherr, 1998) Dicha vía está desregulada en el 84 % de los GBM (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013). La mutación más frecuente es la delección homocigota del locus de ARF , la cual ocurre en el 60% de los GBM. Dicha delección impide la degradación de MDM2 y M2M4 por lo que estás mantendrán concentraciones anormalmente bajas de p53. Las mutaciones que más frecuentemente afectan al gen que codifica p53 son las mutaciones puntuales sin sentido en el dominio de unión al ADN. La prevalencia de las mutaciones en TP53 varían entre GBM primario y secundario (30%-65%) (Xiong et al., 2020) y los diferentes subtipos de GBM (Proneural 54%, mesenquimal 32% , neural 21% y clásico 0%) Otro de los mecanismos por los cuales se puede deteriorar la actividad de p53 es por la amplificación de las regiones que codifican MDM2 Y MDM4, esto se da en el 7-14 % de los GBM(Crespo et al., 2015; Verhaak et al., 2010; Y. Zhang et al., 2018).

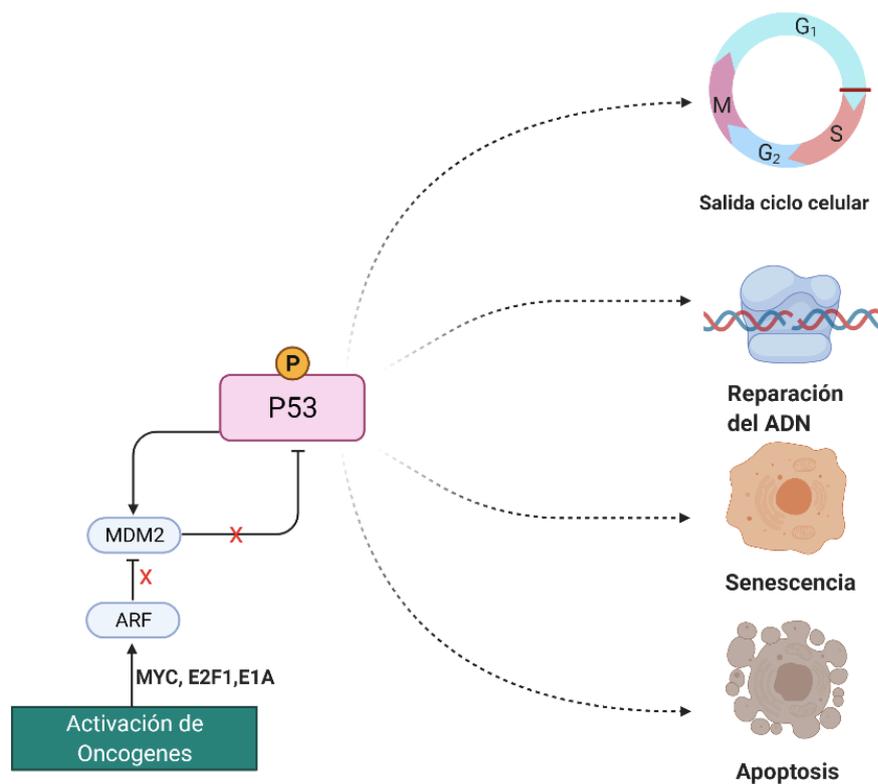


Figura 15: El estrés oncogénico favorece la activación del supresor de tumores ARF quien inactiva a MDM2 generando una mayor expresión de P53. *Figura Creada con BioRender.com*

Las señales enviadas por estos sensores convergen en unas proteínas de la familia Bcl2 que pueden ser proapoptóticas como Bax, Bid, Bak y Bim o antiapoptóticas como Bcl2, bclXL y Bcl W que cuando se activan alteran la permeabilidad mitocondrial impidiendo o permitiendo la liberación de Citocromo C. Este citocromo activa dos Caspasas, 8 y 9 que desencadenan la activación en cadena de múltiples caspasas que se encargarán de destruir los orgánulos y el material genético celular .Además de las mutaciones mencionadas en P53 existen mutaciones sobre todos los componentes de la vías implicadas en la apoptosis, las más frecuentes se dan sobre Bcl-2, Bcl xL, Bid, Bak, Bax, Bad, Bim, caspasas-8, -10, -9 y Fas entre otros **(Blahovcova et al., 2015; Steinbach & Weller, 2004)**.

Además de lo comentado hasta ahora debemos mencionar una vía que tiene un papel fundamental en la regulación de la supervivencia y apoptosis celular, la vía PI3K- AKT. Esta vía funciona de la siguiente manera: La unión de ligandos como IGF 1 e IGF 2 a receptores TK activan a la proteína PIK3. Esta a su vez provoca la activación de AKT la cual migra al núcleo e inactiva factores de transcripción de genes proapoptóticos como las proteínas FOX. Por lo tanto, esta vía es una vía que promueve la Supervivencia celular. El principal regulador de esta vía es

- PTEN:** El locus de este gen se encuentra en el cromosoma 10q23. Codifica una proteína de 403 aminoácidos y un peso molecular de 48 KDa. Presenta dos dominios principales, el dominio C2 mediante el cual se ancla a la membrana celular y el dominio catalítico que presenta la función fosfatasa (**Worby & Dixon, 2014**) PTEN actúa como supresor de tumores ya que inhibe la vía PI3K/AKT/mTOR la cual está relacionada con aumento de la proliferación, crecimiento y supervivencia entre otras funciones. (**Knobbe et al., 2002**). El mecanismo mediante el cual inhibe esta vía es el siguiente: cuando PI3K se activa mediante la acción de un factor de crecimiento unido a su receptor, produce la fosforilación de un lípido de membrana, PIP₂, que pasa a PIP₃, el cual es el responsable de la activación de AKT. PTEN retira un grupo fosfato de PIP₃ que pasa a PIP₂ lo que frena la vía PI3K/AKT (**Álvarez-García et al., 2019**) (**Worby & Dixon, 2014**). Las mutaciones que producen disminución de la función de PTEN son frecuentes en GBM. Hasta en el 85 % de los GBM presentan deleciones en este gen según el Atlas del genoma del Cáncer (**Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013**). Sin embargo no se observan diferencias en la frecuencia de mutaciones de este gen en los diferentes subtipos de GBM (**Verhaak et al., 2010**).

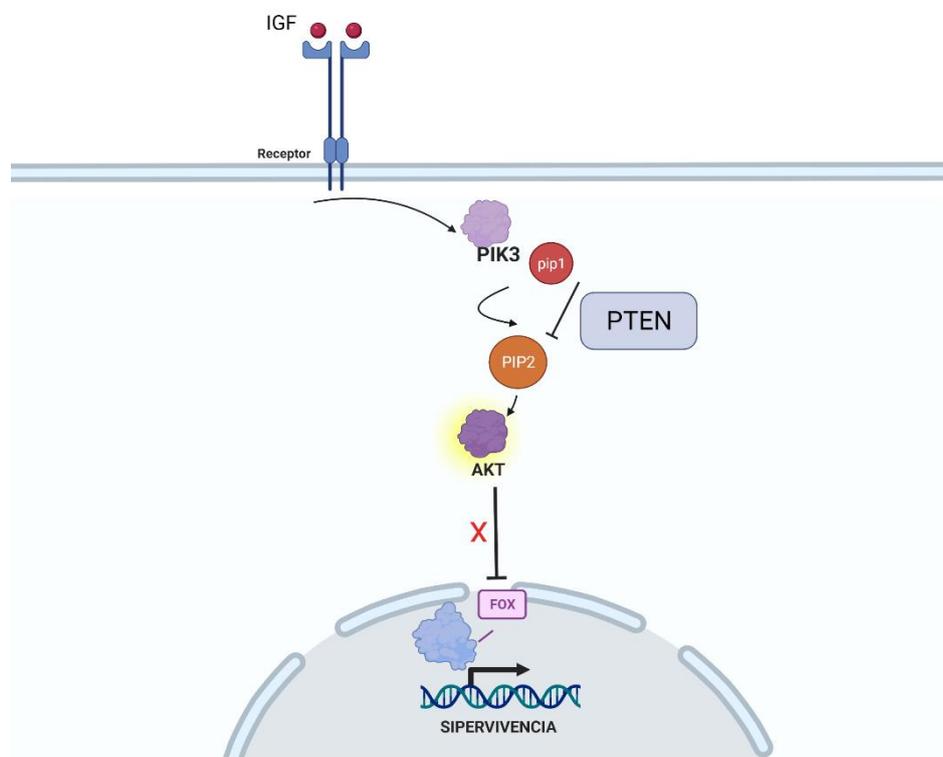


Figura 16: PTEN actúa como supresor de tumores al inhibir la vía PIK3/AKT. Dicha vía culmina con la inactivación de genes proapoptóticos promoviendo la supervivencia celular.

5.4.1.7 *Evasión de la respuesta inmune*

Los diferentes efectores del sistema inmune constantemente detectan y eliminan células cancerosas de nuestro organismo. Los tumores que consiguen crecer y ser significativos consiguen de alguna manera evitar esta vigilancia inmunológica. Modelos experimentales animales a los que se les ha suprimido la respuesta inmune celular (linfocitos T y Natural Killers) presentan una incidencia muy elevada de tumores **(Teng et al., 2008)**. Como vimos en el apartado de Nuevas Terapias, la evasión de la respuesta inmune ha sido estudiada en los últimos años y ha originado la el campo de la Inmunoterapia.

5.4.1.8 *Reprogramación del metabolismo energético:*

Las células tumorales que han ido seleccionándose, empleando cada uno de los Hallmarks explicados previamente, presentan una tasa muy elevada de replicación en comparación con las células normales. Esta alta tasa replicativa conlleva un gasto energético muy elevado. Las células tumorales necesitan desarrollar un metabolismo más eficiente que sus vecinas no tumorales **(Hanahan & Weinberg, 2011)** ¿Cómo logran las células tumorales obtener esta gran cantidad de energía? Para explicarlo debemos antes conocer las rutas metabólicas celulares normales. Como sabemos, la principal fuente de energía celular es la Glucosa. Dicho metabolito sufre un proceso oxidativo tras el cual se obtiene Adenosín Trifosfato (ATP). Existen 2 rutas de Glicólisis que se dan en función de la disponibilidad de OXÍGENO en el ambiente celular. La glucólisis aerobia consiste en la oxidación de la molécula de glucosa en el citosol hasta obtener piruvato. El piruvato se transforma en AcetilCoA y entra en la mitocondria. Comienza entonces el ciclo de Krebs mediante el cual, el AcetilCoA se une al Oxalacetato formando Citrato. A consecuencia de estas reacciones del Ciclo de Krebs se forman moléculas de NADH. El NADH de la matriz mitocondrial entrará en las crestas mitocondrales e intervendrá en la cadena respiratoria con la consiguiente formación de ATP. A modo resumen; tras el metabolismo aeróbico de una molécula de Glucosa se obtienen 38 moléculas de ATP **(Naifeh et al., 2021)**.

En cambio, cuando no se dispone de Oxígeno suficiente, se produce la Glucolisis anaeróbica, proceso que se da en el citosol en el cual la molécula de Glucosa se transforma en 2 moléculas de Piruvato y estas a su vez en 2 moléculas de Lactato gracias a la enzima Piruvato Deshidrogenasa. Como consecuencia de la Glucolisis anaeróbica se obtienen 2 moléculas de ATP por cada molécula de Glucosa **(Melkonian & Schury, 2021)**.

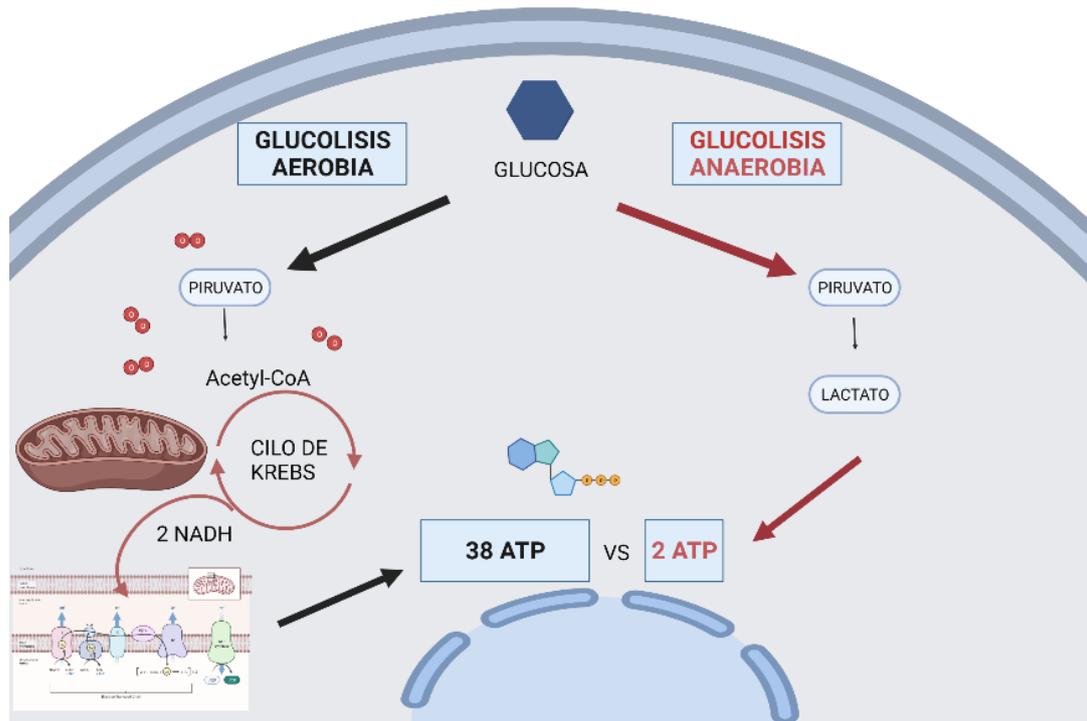


Figura 17: Esquema de la Glucolisis aerobia y anaerobia. *Figura Creada con BioRender.com*

Parece lógico pensar que en las células tumorales predominará la vía que más moléculas de ATP produce por cada molécula de Glucosa, es decir, la Glucólisis Aerobia. Pues contra toda lógica, la vía que predomina en las células tumorales es la Glucólisis Anaerobia, a esto se lo conoce como Efecto Warburg. (Lunt & Vander Heiden, 2011) Los motivos por los cuales se cree que ocurre esto son los siguientes: La velocidad de la oxidación anaerobia de la glucosa es casi 100 veces más rápida que la aerobia, por lo cual, ante un ambiente pobre en O₂ como es el microambiente tumoral, las células tumorales podrán robar la mayoría de las moléculas de Glucosa a sus vecinas no tumorales en las que predomina la vía lenta. Además parece que de la vía anaeróbica se derivan varios precursores que pueden ser utilizados en la biosíntesis de macromoléculas y orgánulos necesarios para la creación de nuevas células (Liberti & Locasale, 2016).

No podemos terminar este Hallmark sin comentar la repercusión de la mutación de

La Enzima Isocitrato deshidrogenasa (IDH) en el pronóstico del Glioblastoma. Existen tres isoformas del Enzima Isocitrato deshidrogenasa, IDH 1, IDH 2 e IDH3. Las dos primeras son las que juegan un papel en la oncogénesis de los gliomas. IDH1 se localiza en el citoplasma celular e IDH 2 presenta una localización mitocondrial. Su principal función es la participar en el Ciclo de Krebs catalizando el paso de Isocitrato a alfa-cetoglutarato (α -KG). Dicha reacción emplea NADP como cofactor, que se oxida y se transforma en NADPH, por lo que además presenta una función en el sistema de oxigenación-reducción celular. (S. H. Lee et al., 2004) (Badur et al., 2018) Las mutaciones del IDH relacionadas con oncogénesis se sitúan en el residuo de Arginina localizado en la posición 132 en la isoforma IDH 1 y en la posición 140 o 172 en la isoforma IDH2 (Yan et al., 2009) Solamente el 3,7% En los Glioblastomas primarios presentan IDH mutado. En el 70 % de los Glioblastomas secundarios una de las copias del gen está mutada (Nobusawa

et al., 2009). De forma que se produce un heterodímero con un IDH wild type y un IDH mutado. El IDH mutado transformará el α -KG en o D-2-hydroxyglutarate (D-2-HG). El D-2-HG se acumula en el citosol y conlleva una serie de cambios epigenéticos, ya que induce un estado de hipermetilación del ADN e histonas nucleares haciendo que no se expresen genes relacionados con la diferenciación y proliferación celular. (Turcan et al., 2012) Además estos cambios epigenéticos provocan la disfunción de la piruvato deshidrogenasa, encima necesaria para la formación del Lactato y por tanto impidiendo el Efecto Warburg. (S. Han et al., 2020) El acúmulo de 2-HG estimula IHF-1-alfa (Hypoxia-Inducible Factor) e inhibe la Endostatina lo que produce un aumento de la angiogénesis. Estas mutaciones tienen un valor predictivo en cuanto al pronóstico de la enfermedad. Como hemos visto anteriormente los pacientes que presentan mutaciones del gen IDH presentan una OS mayor (27 -30 meses vs 11-15 meses) que los que presentan el genotipo wildtype. (J.-R. Chen et al., 2016) (Nobusawa et al., 2009; Yan et al., 2009).

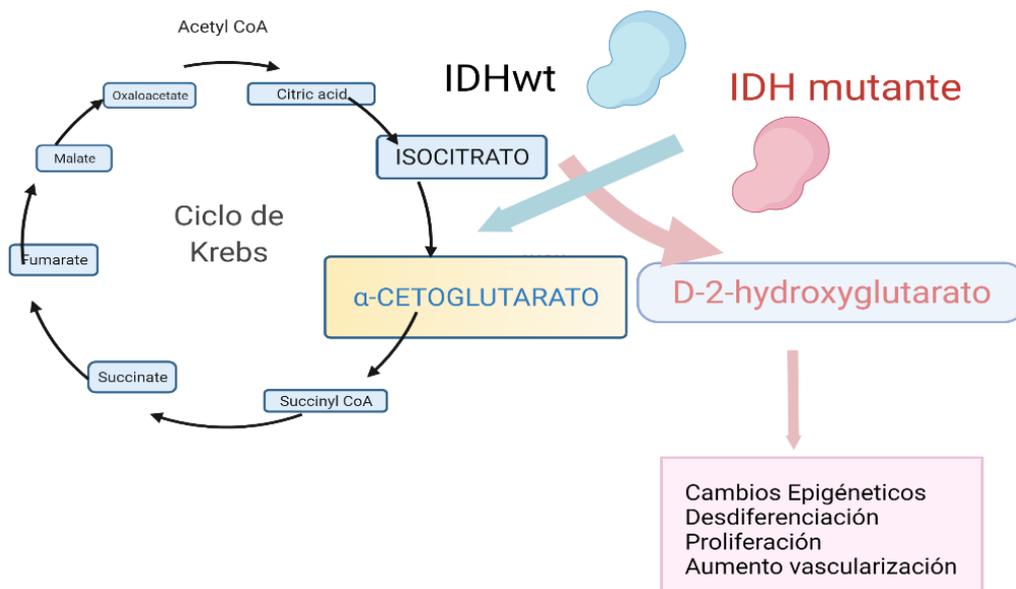


Figura 18: IDH mutante crea 2-HG que se acumula en el citosol y produce alteraciones epigenéticas.

Para terminar, debemos hablar de un marcador molecular que no está asociado a Hallmarks pero que presenta una relevancia clave debido a sus implicaciones pronósticas en el Glioblastoma. Dicho marcador es el

- **MGMT:** Uno de los procesos metabólicos que pueden producir daño en el ADN celular es la alquilación. Dicha reacción consiste en la unión de un grupo alquilo (el grupo alquilo es una molécula cuya fórmula general es C_nH_{2n+1}) con determinados átomos de ciertas bases nitrogenadas de la cadena de ADN impidiendo por tanto la replicación y transcripción del ADN y produciendo la Apoptosis celular (Ochs & Kaina, 2000; Ralhan & Kaur, 2007). Es de este modo cómo funciona la Temozolomida, agente alquilante indicado para el tratamiento del GBM. En concreto, la forma activa de la Temozolomida, añade grupos metilo (CH_3) en la posición O6 de la Guanina (Strobel et al., 2019) Es aquí dónde MGMT adquiere importancia. O6 Metil Guanin Metil

Transferasa también conocida por sus siglas MGMT es un enzima cuyo gen se encuentra en el cromosoma 10q26 que se encarga de retirar los grupos alquilo que han sido añadidos a la posición O6 de las bases de Guanina del ADN mediante la transferencia del grupo alquilo de la posición O6 a una cisteína propia de la MGMT. Por lo tanto, MGMT soluciona el “error” causado por la temozolomida y contribuye a la supervivencia de las células tumorales (Pegg, 1990; Pegg & Byers, 1992) Sin embargo se sabe que en ciertas poblaciones celulares de diferentes neoplasias se produce una metilación del promotor del gen del MGMT lo que conlleva una disminución de los niveles de dicha encima.(Esteller et al., 1999) Tras el estudio del 2005 del grupo de Stupp diferentes grupos han observado que los pacientes que presentan metilación del promotor deL GEN MGMT tienen una mayor supervivencia (mediana de 18-24 meses) que aquellos sin metilación del promotor del gen MGMT (mediana de 12-14 meses)Además se observó que dentro del grupo de los no metilados , no hay diferencias significativas entre los grupos tratados con o sin temozolomida. A pesar de lo comentado anteriormente hemos de citar un artículo en el que no se encontró asociación entre metilación MGMT y aumento de supervivencia en pacientes con Glioblastoma(Egaña et al., 2020). En resumen, debemos saber que conocer el estado de metilación del Promotor del gen MGMT es crucial ya que es un marcador pronóstico importante. (Alnahhas et al., 2020; Hegi et al., 2005).

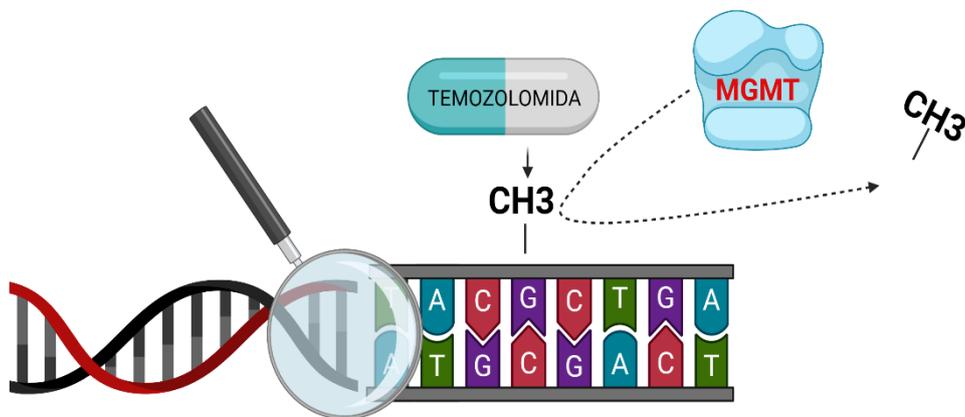


Figura 19: O6 Metil Guanin Metil Transferasa retira el grupo metilo de la Guanina que fue añadido por la Temozolomida. *Figura Creada con BioRender.com*

5.4.2 Vía de señalización TGFB

La vía de señalización del Factor de crecimiento transformante beta (TGFB) se encarga de múltiples funciones en el embrión en desarrollo y en el humano adulto. Entre estas funciones se encuentran el control del crecimiento, proliferación, migración y apoptosis celular. Esta vía de señalización presenta un complejo y crucial papel en cáncer ya que dependiendo del contexto celular la activación de esta vía puede impedir o favorecer el desarrollo tumoral. En estados premalignos esta vía presenta una importante función supresora de tumores ya que genera una importante señal antiproliferativa, apoptótica y promueve la diferenciación celular. Sin embargo, en estados de malignidad celular avanzada, alteraciones en esta vía promueven la ETM, migración, invasión, proliferación y angiogénesis (Akhurst & Derynck, 2001; S. Liu et al., 2017). A continuación veremos los principales componentes y características de esta vía (Ikushima & Miyazono, 2010; Tzavlaki & Moustakas, 2020).

5.4.2.1 Componentes:

Existen 32 componentes en la Superfamilia TGFB. Estos se dividen en dos ramas en función de su función y sus características estructurales: La subfamilia TGFB contiene a los tres ligandos de la vía que son TGFB1, TGFB2 y TGFB3, dos Activinas (A y B), Nodal, LEFTY (Left-right determination Factor), Factores de Diferenciación y Crecimiento (GDFs) GDF1, GDF3, GDF8, GDF9 y GDF11. La subfamilia BMP ("bone morphogenic proteins") contiene 10 BMPs, varios GDFs y la hormona antimülleriana.

5.4.2.1.1 Ligandos:

TGFB: Existen 3 isoformas del Ligando de TGFB, conocidas como TGFB1, TGFB2 y TGFB3. Estas proteínas son sintetizadas en los ribosomas del Retículoendoplasmático rugoso del Aparato de Golgi. Son sintetizadas como precursores. Estos precursores se unen a otras dos proteínas (LAP y LTBP) y formarán LLC (large latent complex). LLC es expulsado a la Matriz Extracelular, donde por acción de proteínas proteolíticas dará lugar a la forma activa del ligando de TGF.

BMP: Las Bone Morphogenic proteins son ligandos de la superfamilia TGFB. Existen 20 tipos diferentes de BMP

5.4.2.1.2 Receptores:

TGFB: Son receptores transmembrana Serina/Treonina Kinasa y se agrupan en dos subfamilias TGFB R tipo I y TGFB R tipo II. El genoma codifica siete receptores tipo I y cinco receptores tipo II.

Bmp: Son receptores transmembrana Serina/Treonina Kinasa: El genoma codifica cuatro tipos de receptores tipo uno conocidos como ALK y tres tipos de receptores tipo II.

5.4.2.1.3 Correceptores:

Existen una serie de proteínas que presentan una alta afinidad por los ligandos TGFB1,2y3 y por los receptores TGFB y BMP. Dichas proteínas actúan como Correceptores y tienen un papel importante en la modulación de la señal de la vía ya que pueden activar o inhibir dicha señal. Estos correceptores son: Proteoglicano, Cripto, Endoglina y BMG.

5.4.2.1.1 Proteínas SMAD ("small mothers against decapentaplegic")

Tienen un papel fundamental en la trasducción de la señal de la vía TGFB. El genoma humano codifica 8 tipos de proteínas SMAD. Estas proteínas se dividen en tres grupos:

- R-SMAD (Receptor-regulated SMAD): son las proteínas que se unen directamente al TGFb y consisten en SMAD1, SMAD2 y SMAD 5.
- Co-SMAD (comon partner SMAD): La única Co-SMAD es SMAD 4, y tiene la función de unirse a otras SMADs formando complejos.
- I-SMAD (inhibitory SMAD): Inhiben la señalización de la vía TGFb. En este grupo están SMAD 6 y SMAD 7. Contienen entre 400 y 500 aminoácidos y están formadas por dos dominios globulares un N-terminal y un C-terminal conocidos como MH1, al que se une el ADN, y MH2 al que se une a TFGb.

5.4.2.2 *Funcionamiento de la vía de señalización:*

Como hemos visto anteriormente el precursor del Ligando TGFb se produce en el Aparato de Golgi y se secreta a la matriz extracelular como un gran complejo proteico que tras la sufrir proteólisis se convierte en la forma activa del Ligando TGFb. El ligando TGF b se une al receptor dimérico transmembrana tipo II (Solo o en combinación con uno de los correptores vistos anteriormente), el cual se activa y cataliza la fosforilación del receptor Tipo I. En el citoplasma celular, una proteína llamada SARA se encarga de la formación del complejo SMAD2/3 o SMAD5/8 y une a las R-SMAD al receptor transmembrana tipo I fosforilado. La fosforilación de este receptor hace que aumente su afinidad por el dominio MH2 de las R-SMAD y cuando entran en contacto son fosforiladas. La fosforilación del complejo SMAD 2/3-SARA hace que estas pierdan afinidad por SARA (“Smad anchor for receptor activation”) y la ganen por Co-SMAD (SMAD4) uniéndose a esta y formando el complejo R-SMAD/Co-SMAD (SMAD2/3/4).

A continuación, los los complejos R-SMAD/Co-SMAD fosforilados migran al núcleo celular mediante la unión a la proteína Importina 1 que es la encargada de lograr que atraviesan la membrana nuclear. En el núcleo este complejo R-SMAD/Co-SMAD se une a una secuencia específica de ADN conocida como SBE (SMAD Binding Element), 5´-GTCTAGAC-3´. La afinidad de SMAD 2 y 3 por esta secuencia es baja y por eso necesitan unirse a otros factores y cofactores de transcripción. Todo esto hace que se transcriban determinados genes implicados en múltiples procesos celulares al activarse la vía TFGb. **(Tzavlaki & Moustakas, 2020)**

En cuanto al papel inhibitorio de las I-SMAD (SMAD6 y SMAD7) debemos saber que estas presentan un dominio MH2 altamente específico para el Receptor TFGb tipo I. Estas se unen al dicho receptor e impiden la fosforilación de las R-SMADs. Además, las I-SMAD reclutan las ubiquitinas ligasa, SMURF1 y SMURF 2, que generan la ubiquitinación del Receptor tipo I y su posterior degradación. SMAD6 y SMAD7 también ejercen su actividad inhibitoria de la vía TGFb al competir con los complejos R-SMAD/Co-SMAD por unirse a las secuencias regulatorias de los genes diana de TGFb.

Vía BMP-SMAD 1/5/8: Debemos saber que existe un tipo de ligando, los BMP, que se unen a receptores transmembrana de BMP (BMPR tipo I y tipo II) y cuya unión desencadena la activación de la vía SMAD mediante la fosforilación y creación del complejo SMAD 1, SMAD 5 y SMAD 8. Al igual que en la vía TGFb este complejo migrará al núcleo y participará en la transcripción de genómica **(D. Chen et al., 2004)**.

Esta vía BMP-SMAD tiene un papel muy importante en la regulación de la formación del SNC y en la regulación del desarrollo neuronal y glial. BMP induce durante la embriogénesis y en adulto

la diferenciación de NSC(Neural Stem Cells) en Neuronas y Astrocitos y regula negativamente la proliferación de NSC (**Hegarty et al., 2013**).

A demás de esta función dentro del desarrollo del SNC, diferentes estudios le han otorgado a esta vía un papel reseñable en Cáncer, y al igual que la vía TGB b parece comportarse de una forma dual, bien como supresor o favorecedor de la formación tumoral en diferentes tumores. En meduloblastoma (**Zhao et al., 2008**), cáncer colorrectal (**Lombardo et al., 2011**), cáncer de próstata (**Buijs et al., 2007**) y en cáncer de mama (**T. Wang et al., 2017**) entre otros, la activación de la vía BMP/SMAD 1/5/8 ejerce una función de supresión tumoral.

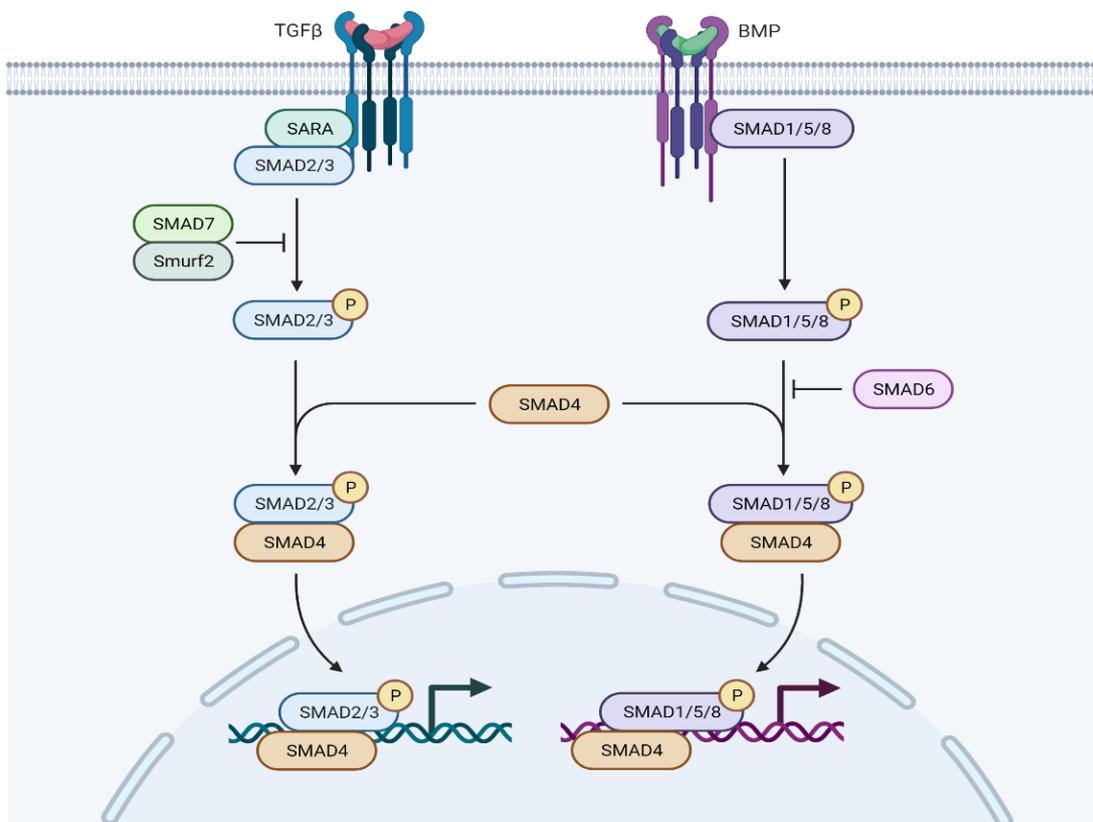


Figura 20: Esquema en el que se sintetiza la cascada efectora de las moléculas SMAD en la vía de señalización TGFb Y BMP. *Figura Creada con BioRender.com*

5.4.2.3 TGF B como supresor de tumores:

La vía TGFb presenta una función dicotómica en el desarrollo tumoral. En células sanas, o en células que han sufrido un escaso número de mutaciones oncogénicas y se encuentran en un estado de premalignidad, esta vía se comporta como una vía supresora de tumores. (**Yeh et al., 2019**). A continuación veremos los principales mecanismos mediante los cuales esta vía actúa como supresora de tumores:

Respuesta Citostática: TGF b inhibe la progresión del ciclo celular más allá de la fase G1 mediante dos sucesos principales:

1: Aumento de la expresión de los inhibidores de CDK: Como hemos visto en apartados anteriores, cuando CDK4/6 se une a Ciclina, este complejo fosforila a p RB, haciendo que este libere al Complejo de Transcripción E2F que tenía secuestrado. E2F migrará al núcleo y participará en la transcripción de genes encargados de pasar de la fase G1 a la fase S. En las células de Glioma, la activación de TGFb resultará en la activación del complejo SMAD que se unirá a complejos de transcripción como FoxO o C/EBPb dando lugar la activación de p15/INK4b and p21/CIP1, dos de los principales inhibidores de CDK (Seoane et al., 2004).

2: Disminución de la expresión de c-Myc: Tras la activación del complejo SMAD y su migración al núcleo este se une a factores de Transcripción E2F4/5 Y A C/EBPb lo que disminuirá la expresión de c-Myc, por lo que no podrá activar a las CDK ni inhibir a p15 y p21.

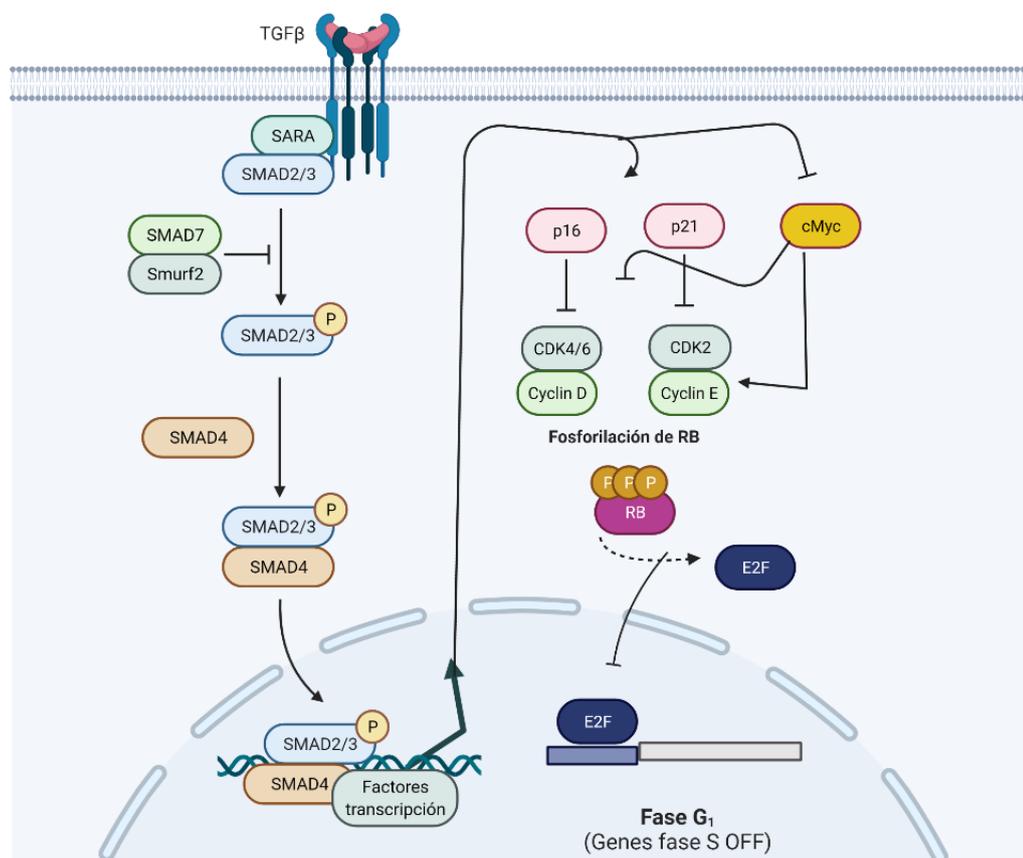


Figura 21: Esquema en el que se aprecia cómo la activación del complejo SMAD y su unión a diferentes factores de transcripción regula negativamente la actividad proliferativa de la célula. *Figura Creada con BioRender.com*

Estimulación de la Diferenciación y Apoptosis Celular: TGF b promueve la diferenciación de las Neural Stem Cells cultivadas in vitro (Izsak et al., 2020) Además TGFb promueve la apoptosis celular mediante la activación de la transcripción de DAPK, que activa la apoptosis mediada por p53. (Jang et al., 2002), aumento de la transcripción BAX y disminución de BCL2 y BCLxl, lo cual

promueve la liberación de Citocromo c de la mitocondria y por tanto genera activación de la cascada apoptótica (**Bakhshayesh et al., 2012**)

Supresión de la inmortalización y mantenimiento de la estabilidad cromosómica:

Estudios en modelos in vivo e in vitro muestran que el silenciamiento del gen TGF b produce una disminución en la apoptosis y un aumento de alteraciones cromosómicas cuando los tejidos son expuestos a fármacos alquilantes y a radiaciones ionizantes. (**Ewan et al., 2002; Glick et al., 1996**)

5.4.2.4 TGFb como oncogén:

Como hemos comentado anteriormente, el acúmulo de mutaciones sobre las moléculas encargadas de llevar a cabo la respuesta reguladora de la vía TGF b produce que esta se convierta en una vía de señalización que promueve el desarrollo tumoral a través de los siguientes mecanismos:

Aumento de la proliferación celular: Anteriormente comentamos la importancia de las vías que dependen de c-Myc, p21 y p15 en el control de la proliferación celular. Pues en estados celulares protumorales de Glioma encontramos alteraciones en SMAD , PI3K, y FoxG1 que median la resistencia al control de la proliferación celular inducida por TGFb (**Seoane et al., 2004**).

Aumento de la migración e invasión celular: El Glioblastoma presenta una gran capacidad para invadir el parénquima cerebral sano. Esto es debido a la producción de proteasas que degradan la Matriz Extracelular permitiendo el avance celular (**Rao, 2003**). TGFb1 exógeno aumenta directamente la movilidad celular mediante el aumento de la expresión de integrinas α y β y ciertas metaloproteasas en células de Glioma in vitro (**Platten et al., 2000; Wick et al., 2001**).

Aumento de la angiogénesis: La elevada proliferación microvascular es una de las características histológicas fundamentales de Glioblastoma. El TGFb participa en el aumento de los vasos tumorales mediante el aumento de la transcripción de VEGF (“Vascular Endotelial Growth Factor”), FGF (“Fibroblastic Growth Factor”) y PAI-1 (“Plasminogen Activator Inhibitor”). (**Guerrero & McCarty, 2017**) Ciertos estudios sugieren que la hipoxia tisular y el TGFb realizan una acción sinérgica en la regulación de la transcripción del VEGF, ya que una determinada región del promotor del gen VEGF presenta regiones de unión de ADN para SMADs y HIF(Hipoxia-Inducible factor (**Sánchez-Elsner et al., 2001**).

Mantenimiento de las GSC: Como veremos en el apartado siguiente las Glioma Stem Cells presentan un papel importante en malignidad del Glioblastoma ya que son las responsables de su resistencia a la quimiorradioterapia y recurrencia tumoral. La señalización autocrina de TGFb presenta un papel importante en la capacidad de autorrenovación de las GSC al inducir la transcripción de Sox4 y Sox2 (**Ikushima et al., 2009**)

5.4.3 LEFTY:

A continuación, nos centraremos en una molécula en concreto perteneciente a la superfamilia TGFb, la cual es una de las principales dianas de nuestro estudio.

Estructura: es una proteína que forma parte de la superfamilia TGF b. El locus de LEFTY se encuentra en el cromosoma (1q42.1) y contiene 3 genes, dos de los cuales son funcionales y un tercero (LEFTY 3) el cual es un pseudogén. LEFTY es secretada como un polipéptido de 42 KDa

que después es escindido en 2 dando lugar a sus dos isoformas LEFTY 1 (LEFTY A) y LEFTY 2 (LEFTY B) (Ulloa & Tabibzadeh, 2001). Ambas moléculas son prácticamente idénticas, el 96% de su secuencia es igual y ambas proteínas difieren en solamente 16 aminoácidos (Yashiro et al., 2000).

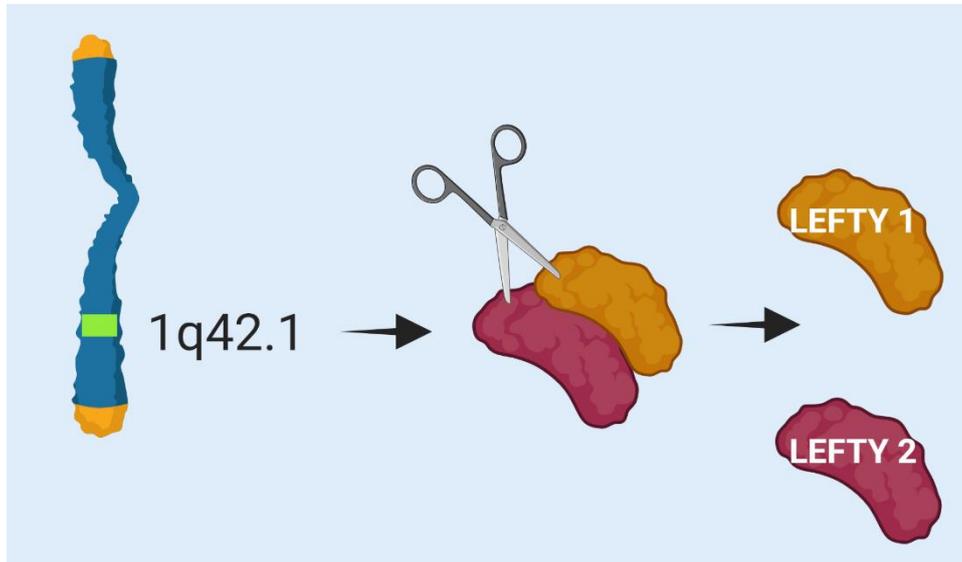


Figura 22: El loci de LEFTY se encuentra en el cromosoma 1. Se secreta como un polipéptido que después es escindido en dos isoformas, LEFTY 1 y LEFTY 2. *Figura Creada con BioRender.com*

Función:

LEFTY tiene un papel fundamental en la regulación de la vía TGF β , en concreto de la vía de señalización activada por NODAL, una molécula de la familia TGF β (Ulloa & Tabibzadeh, 2001) Para poder entender mejor la función de Lefty explicaremos brevemente las principales características de la vía NODAL:

Como hemos mencionado anteriormente, NODAL es una proteína codificada por el gen del mismo nombre situado en el cromosoma 10 (10q22.1). Forma parte de los ligandos de la familia del TGF β y es secretada como un precursor que se activa en el espacio extracelular. Una vez en su forma activa, NODAL se une con un correceptor EGF-CFR conocido como CRIPTO. Este complejo NODAL-CRIPTO se une a los receptores transmembrana serina/treonina kinasa tipo I y tipo II (ALK4 y ACTRIIB) (Bianco et al., 2002) Una vez formado este complejo NODAL(ligando)-CRIPTO(correceptor)-ALK4-ACTRIIB(receptor) se produce la fosforilación de SMAD2 / SMAD 5 lo que desencadena la cascada de señalización SMAD de la vía TGF β con la consecuente migración del complejo R-SMAD/Co-SMAD al núcleo y regulación de la transcripción genómica.

El papel de LEFTY consiste en la regulación de esta vía. En concreto LEFTY bloquea la activación de la vía y detiene la cascada de señalización de diferentes formas: LEFTY se une al complejo NODAL-CRIPTO impidiendo que este se una a los receptores transmembrana (Schier, 2003) LEFTY también impide la fosforilación de las R-SMAD por el complejo Ligando-Receptor

evitando la activación de la cascada SMAD. Además de esto LEFTY evita la translocación del complejo SMAD al núcleo celular impidiendo que formen complejos de transcripción genómica (Ulloa & Tabibzadeh, 2001).

Debemos saber que, entre otras acciones, la activación de esta vía por NODAL favorece la transcripción de LEFTY, estableciéndose así una regulación negativa de la vía (Schier, 2003).

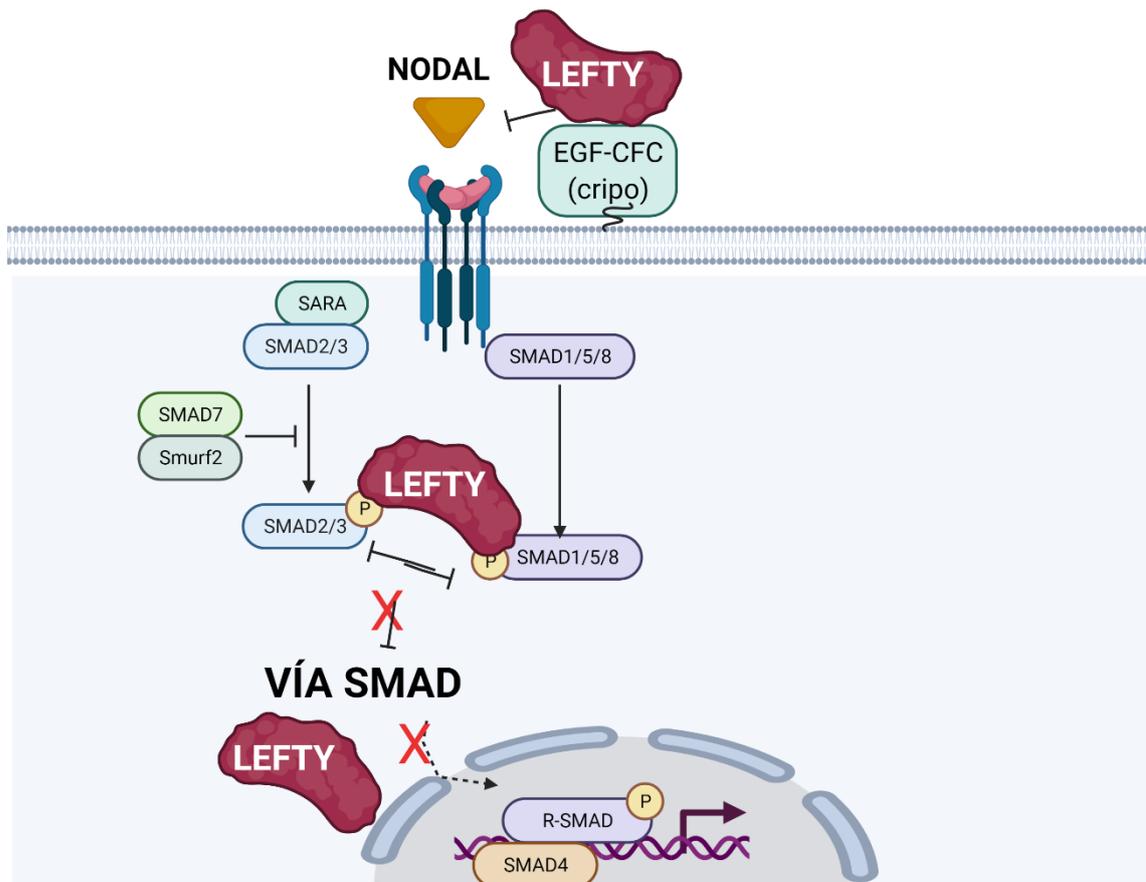


Figura 23: LEFTY actúa como inhibidor de la vía NODAL al impedir la activación de la cascada de señalización dependiente de las proteínas SMAD. *Figura Creada con BioRender.com*

PAPEL FISIOLÓGICO DE LEFTY DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS:

Como hemos visto NODAL y LEFTY funcionan de forma conjunta, formando un ciclo regulatorio. La cascada de señalización que establecen a través del complejo SMAD presenta un papel fundamental durante el desarrollo embrionario: A continuación, realizaremos una breve explicación de los eventos en los que participa NODAL-LEFTY de forma fisiológica:

Debemos saber que tras la fecundación del óvulo por el espermatozoide comienza una etapa conocida como desarrollo embrionario que dura 8 semanas y que está dividida a su vez en varias

subetapas. De estas, las que a nosotros nos interesan por la implicación de NODAL son la pregastrulación y la gastrulación. La gastrulación consiste en el proceso mediante el cual el embrioblasto, que consiste en una estructura formada por solamente una capa de células, pasa a tener tres capas: endodérmica, mesodérmica y ectodérmica. Durante estas etapas se establece el eje proximal-distal (PD), anterior-posterior (AP) y derecha-izquierda (DI) del embrión. El primer eje que se establece es el PD: Inicialmente, la activación de NODAL en el Epiblasto proximal induce la expresión de LEFTY en el Epiblasto distal, y esto genera un gradiente en la expresión de NODAL (**J. Brennan et al., 2001**). Sucesivamente la expresión de NODAL quedará limitado al epiblasto proximal donde se formará la Estría Primitiva donde dará comienzo la Gastrulación. Tras el proceso de gastrulación, la expresión de NODAL queda confinada a la porción más proximal de la Estría Primitiva, región que tomará el nombre de NODO VENTRAL y en la que se iniciará el proceso de LEFTY RIGHT ASIMTRY (Proceso que da nombre a la proteína LEFTY). La activación de nodal desde el Nodo mediante interacciones con Correceptores Cripto en la Placa Lateral Mesodérmica definen el lado izquierdo. En el lado derecho la expresión de LEFTY y un flujo ciliar hacia la izquierda impiden que NODAL ejerza su función en el lado derecho, estableciéndose así una asimetría izquierda-derecha. (**Little & Norris, 2021**) Mutaciones homocigotas en SMAD 2, LEFTY, NODAL son mortales para el embrión en desarrollo. Mutaciones heterocigotas conllevan importantes alteraciones craneofaciales en el neonato (**Nomura & Li, 1998**) condiciones como situs inversus, ambiguous o heterotaxia (**Schweickert et al., 2017**). Debemos saber que LEFTY y NODAL, están altamente expresados en células Stem humanas por lo que son considerados marcadores de células Stem (**Wei et al., 2005**).

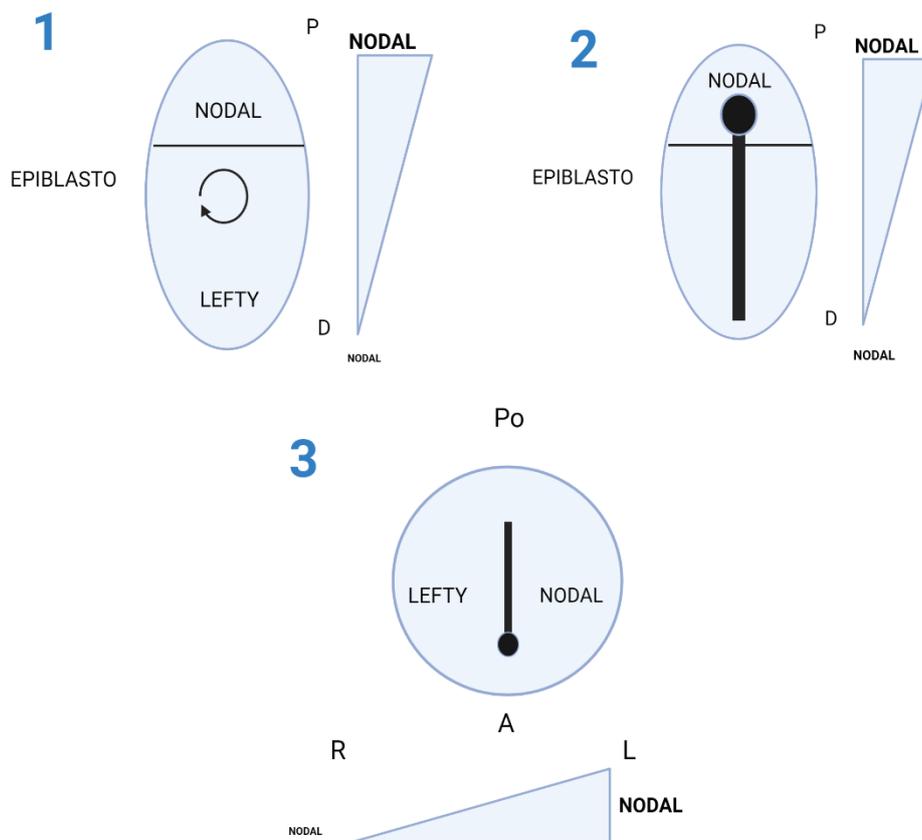


Figura 24: La expresión de LEFTY y NODAL regula la determinación de los ejes en la embriogénesis. P: proximal, D: distal, Po: posterior, A: anterior, R: derecha, L: izquierda. *Figura Creada con BioRender.com*

Como hemos visto LEFTY presenta una importante función reguladora durante la embriogénesis, pero ¿cómo se asocia esto con cáncer?, pues bien, en la última década diferentes artículos relacionan la alteración de diferentes vías regulatorias embrionarias con el desarrollo tumoral. Un ejemplo es el estudio in vivo que realizaron Hendrix y colaboradores en el que introdujeron dos grupos de células de melanoma, uno altamente agresivo y otro pobremente agresivo, en el embrión de pez zebra en el estado de bástula. Lo que se encontraron fue que las células altamente agresivas presentaron la capacidad de inducir la formación de un eje embrionario prácticamente completo. Lo cual sugiere que las vías de desarrollo embrionarias son funcionantes en las células tumorales con elevada capacidad tumoral. **(J. T. Lee & Herlyn, 2006; Topczewska et al., 2006)** Numerosos estudios teorizan sobre la implicación de vías de la superfamilia TGF β relacionadas con embriogénesis fisiológica (vías NODAL y BMP, ambas reguladas por LEFTY) en el mecanismo tumorigénico de diferentes linajes celulares. **(Buijs et al., 2007; Fu & Peng, 2011; C.-C. Lee et al., 2010; Lombardo et al., 2011; T. Wang et al., 2017; G. Xu et al., 2004; Zhao et al., 2008)**

Lefty en Cáncer :

Escasas son las publicaciones en las que se estudie el papel de LEFTY en Cáncer. A continuación, daremos una pincelada a los estudios que describen las principales características de este inhibidor de SMAD, que parece actuar como oncogén:

En 2018 Matsumoto et al analizaron la expresión de LEFTY en Carcinoma de Ovario de células claras viendo que estaba elevada. Relacionaron un aumento de la expresión de LEFTY con un aumento en las propiedades EMT/CSC de estas células **(Matsumoto et al., 2018)**. Zabala et al publicaron un estudio reciente en el que LEFTY , mediante la inhibición de SMAD 2 y SMAD 5 , estimula la renovación celular y la proliferación en el epitelio basal de la mama y en células cancerosas de mama in vivo **(Zabala et al., 2020)**. En cuanto a LEFTY en Glioblastoma, Matsumoto et al publicaron un estudio en 2020 en el que observaron que este inhibidor de SMAD, era upregulado en las condiciones hipóxicas , y originaba un aumento de la supervivencia celular mediante cambios en la apoptosis , proliferación y características de la EMT y las GSC **(Matsumoto et al., 2020)**.

5.4.4 Células Madre de Glioma

El Glioblastoma es uno de los tumores que más heterogeneidad intratumoral presenta. Patel et al realizaron un RNA-seq de 430 células de 5 tumores diferentes de Glioblastoma encontrando una gran variabilidad intercelular a nivel molecular (**Patel et al., 2014**). Variabilidad molecular quiere decir que dentro del mismo tumor, existen poblaciones celulares con alteraciones en diferentes moléculas de diferentes vías celulares. Esto genera poblaciones celulares diferentes dentro de un tumor, cada una de ellas caracterizada por presentar diferentes ventajas adaptativas respecto a las células sanas. Así podemos encontrar un clon cuyas alteraciones moleculares le hayan conferido una gran resistencia a la hipoxia, otro clon con capacidad para evadir la respuesta inmune, otro que presente una elevada resistencia al daño a su ADN etc. Dentro de un tumor encontramos un subgrupo celular que presenta las diferentes capacidades comentadas anteriormente sumadas a una gran capacidad de autorrenovación, este subgrupo celular se conoce como Células Madre de Glioma o Glioma Stem Cells (GSC) y vamos a detenernos a comentar sus principales características y su peso en la patogénesis del Glioblastoma.

La historia de las Glioma Stem Cells comenzó en 1994 cuando Dick et al publicaron una proliferación mantenida de células de Leucemia de humano en ratones inmunosuprimidos (**Lapidot et al., 1994**). A partir de ahí comenzaron a buscarse en otros tumores estas células que podían diferenciarse en modelos in vivo y que presentaban elevada capacidad de autorrenovación. En los años 2003 y 2004 Singh et al encontraron un subgrupo celular dentro de los tumores cerebrales que presentaba la capacidad de autorrenovación y de generación de tumores humanos al ser inyectada en modelos animales, las Glioma Stem Cells (**S. K. Singh et al., 2003, 2004**).

Este subgrupo celular podría definirse en base a una serie de criterios funcionales que deben cumplirse en su totalidad : célula del tejido tumoral que presenta la capacidad de autorrenovarse , que al ser inyectada modelos de experimentación genera tumores que presentan a su vez heterogeneidad intratumoral (**Gimple et al., 2019**). Debemos destacar que este subgrupo celular NO tiene un marcador patognomónicos si no que presentan una serie de marcadores lo caracterizan. Los marcadores más característicos incluyen proteínas intracelulares como SOX2, OLIG2, MYC, and NESTIN y proteínas de membrana celular como CD133, L1CAM, CD44, and A2B5 (**Hassn Mesrati et al., 2020**).

El aspecto más destacable de las Glioma Stem Cells es que son las responsables que ciertos tumores presenten quimioresistencia y radioresistencia mediante la activación de puntos de control de respuesta al daño del ADN y al presentar una elevada capacidad reparación del material genético celular (**Bao, Wu, McLendon, et al., 2006**). También son las responsables de la recurrencia tumoral tras el tratamiento (**Auffinger et al., 2015**). Estas células además favorecen la angiogénesis microvascular mediante diferentes mecanismos como son la diferenciación en células endoteliales o pericitos o la liberación de moléculas proangiogénicas (**Bao, Wu, Sathornsumetee, et al., 2006**). Otra de sus características es la capacidad que presentan de contribuir al silenciamiento de la inmunidad en el microambiente tumoral (**Ma et al., 2018**).

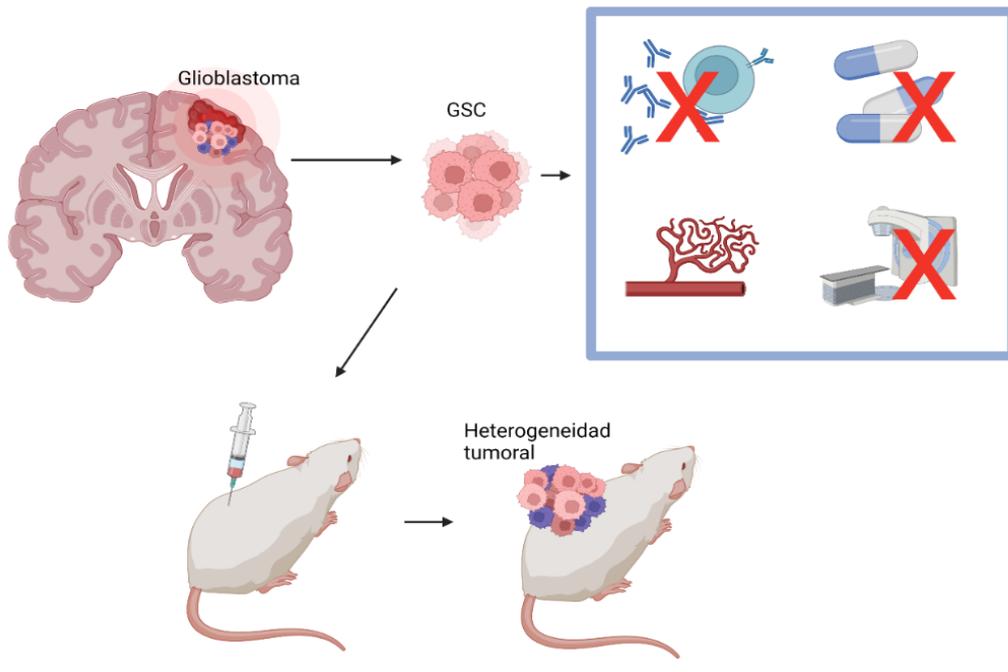


Figura 25: Las GSC se caracterizan por la capacidad de generar tumores heterogéneos en animales de experimentación y ser las responsables de las características más agresivas del Glioblastoma. *Figura Creada con BioRender.com*

6 OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es estudiar la implicación de la vía de LEFTY en la progresión y tratamiento del Glioblastoma.

Para el desarrollo del estudio hemos realizado una división del objetivo principal en Objetivos específicos que son

1: Estudiar la expresión y relevancia clínica de Lefty en Glioblastoma:

1.1 Caracterización de la expresión de las proteínas LEFTY y SMAD en líneas celulares de Glioblastoma.

1.2 Caracterización de la expresión de las proteínas LEFTY y SMAD en biopsias humanas de Glioblastoma y correlación con la supervivencia.

2: Estudiar el impacto de la inhibición farmacológica LEFTY en la capacidad tumorigénica del Glioblastoma:

2.1 Evaluar como la inhibición farmacológica de LEFTY afecta al crecimiento del Glioblastoma in vitro.

2.2 Evaluar cómo la inhibición farmacológica de LEFTY afecta la población de células madre de glioma.

2.3 Evaluar como la inhibición farmacológica de LEFTY afecta al crecimiento del Glioblastoma in vivo.

2.4 Evaluar cómo la inhibición farmacológica de LEFTY afecta al crecimiento del Glioblastoma de manera combinada a quimioterapia.

7 MATERIAL Y MÉTODOS:

7.1 CULTIVO CELULAR

7.1.1 Líneas celulares:

Las líneas celulares de Glioma con las que trabajamos en la realización de este proyecto fueron las siguientes: U87, U251, U373, A 172, T 98, GNS 166, GNS 179.

Las primeras 5 líneas mencionadas son líneas celulares obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y fueron cultivadas de forma adherente en medio DMEM (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco, Gibco, Waltham, MA, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Gibco), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL).

Las dos siguientes, las células madre de Glioma o GNS (Glioma Neural Stem Cell) 166 y 179 son células madre de Glioma derivadas de paciente y fueron cedidas por el Dr Steve Pollard del Centre for Regenerative Medicine and Edinburgh Cancer Research Centre de la Universidad de Edimburgo (Ref Pollard SM 2009 Cell Stem Cell). Fueron cultivadas en adhesión tras tratar la superficie de cultivo con 10 µg/mL de Laminina (L2020, Sigma Aldrich) durante 3 h a 37 °C en un medio selectivo para células madre medio : DMEM/F12 (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, Ham F12, Sigma) en proporción 1:1 y suplementado con B27 10x (Gibco) N2 100x (Gibco), glucosa 45% y 20 ng/mL de factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF, R&D Systems) y epidérmico (EGF, Sigma, St. Louis, MO, USA)

Los cultivos de células madre de esferas en suspensión fueron realizados en placas no tratadas para evitar la adherencia, en medio de cultivo selectivo para células madre (descrito anteriormente) y sometidas a disgregación enzimática con acutasa (Invitrogen A1110501) para su subcultivo. Trabajamos también con la línea celular NHA de Astrocitos primarios obtenidos de córtex cerebral humanos (ScienCell Research Laboratories #1800) de que empleamos como control. Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar a 37°C de temperatura, 95% de humedad, 21% de O₂ y 5% de presión de CO₂. Todos los procedimientos se realizaron en campanas de flujo laminar de seguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Class II Biohazard Safety Cabinet, ESCO).

LÍNEA CELULAR	TIPO CELULAR	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO	PROCEDENCIA
U87	Glioma	Glioblastoma	DEMEN+10%SBF	ATCC(HTB-14)
U251	Glioma	Glioblastoma	DEMEN+10%SBF	ATCC
U373	Glioma	Glioblastoma	DEMEN+10%SBF	ATCC(HTBJ-17)
A172	Glioma	Glioblastoma	DEMEN+10%SBF	ATCC(CRL-1620)
T98	Glioma	Glioblastoma	DEMEN+10%SBF	ATCC(CRL-1690)
GNS166	Célula madre de glioma.	Glioblastoma	DMEN/F12	Steve Pollard
GNS179	Célula madre de glioma.	Glioblastoma	DMEN/F12	Steve Pollard
NHA	Astrocito	Cerebro sano	DEMEN+10%SBF	ScienCell #1800

Tabla 1: Características de las líneas celulares empleadas.



Figura 26: Imágenes de microscopía óptica de 3 líneas celulares diferentes en cultivo adherente

7.2 ENSAYOS FUNCIONALES

7.2.1 *Ensayo de formación de esferas y capacidad de auto renovación de células madre de Glioma (GNS)*

Se sembraron $0,5 \cdot 10^3$ células de las líneas convencionales por pocillo por triplicado en placas de 12 pocillos no tratadas y se mantuvieron en cultivo durante 10 días añadiendo 0,5 mL de medio selectivo para célula madre cada 3 días. Transcurridos 10 días, se contaron las esferas (primarias) formadas con ayuda de un microscopio óptico. A continuación, para analizar la capacidad de auto-renovación de las células madre, las esferas se disgregaron mediante digestión mecánica y enzimática con acutasa (Invitrogen A1110501) y se sembraron a la misma densidad en las condiciones anteriormente descritas. Las células se mantuvieron en cultivo durante 10 días y se procedió nuevamente al contaje de la nueva generación de esferas formadas (esferas secundarias).

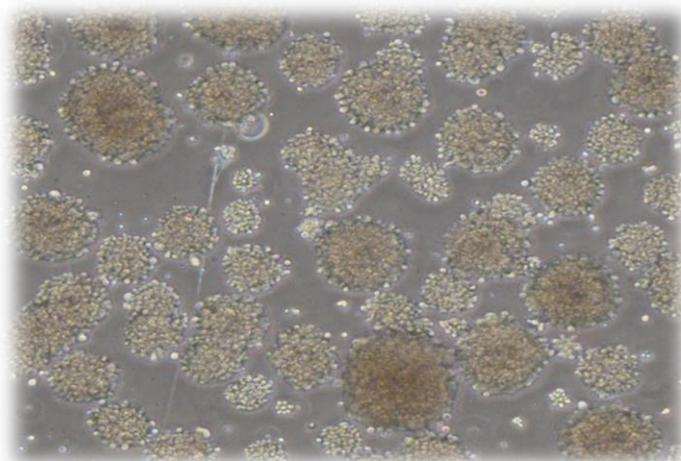


Figura 27: Fotografía de microscopía en el que se aprecian esferas primarias justo antes de ser disgregada.

7.2.2 *Ensayo de diferenciación de Células Madre de Glioma (GNS)*

Se sembraron 50×10^4 células en suspensión. Tras 3 días se sembraron en placas de forma adherente mediante el uso de Laminina. Para conseguir la diferenciación celular empleamos medio F12 (Ham F12) suplementado con un 10% de FBS (suero fetal bovino) en ausencia de factores FGF y EGF.

7.2.3 *Ensayo de viabilidad celular MTT*

Con el objetivo de evaluar los efectos del anticuerpo monoclonal inhibidor de LEFTY en las diferentes líneas celulares anteriormente descritas se realizó el ensayo colorimétrico de viabilidad celular basado en el metabolismo del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este ensayo se basa en la medición del color púrpura del Formazán, metabolito insoluble, producido por la reducción del reactivo MTT por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables.

Para ello, se sembraron 1500 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Corning™, 3585) por sextuplicado y tras 24 horas fueron tratadas con el anticuerpo monoclonal inhibidor de LEFTY a las concentraciones indicadas en cada experimento. Como control para los tratamientos se utilizó medio de cultivo respectivo de cada línea celular. Tras 72 horas se añadió 30 μL /pocillo de reactivo MTT (Sigma-Aldrich, Cat. No. M2128) 1,9 mg/mL y se incubó durante 3 horas a 37°C y 5 % de CO₂. A continuación, se aspiró el contenido de los pocillos y se añadieron 150 μL de DMSO (Sigma-Aldrich, Cat. N° D1650) para disolver los cristales de formazán. Tras 15 minutos de incubación en agitación y a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan Ascent (Thermo Scientific). Se asignó el 100 % de viabilidad al valor medio de absorbancia de los pocillos tratados con vehículo y respecto a ello se calcularon los porcentajes de viabilidad de las células sometidas a las diferentes concentraciones de inhibidores.

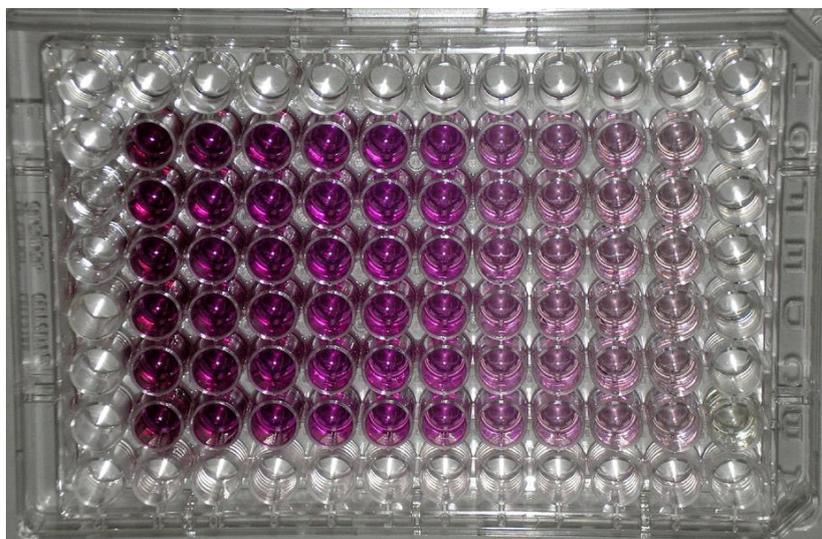


Figura 28: Placa de 96 pocillos que muestra la coloración violácea del Formazán precipitado.

7.2.4 Senescencia

Para medir la senescencia se utilizó un kit comercial de actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia (Cell Signaling, Cat. N° 9860S). Este kit detecta la actividad de β -galactosidasa a pH 6, característica propia de las células senescentes, que son capaces de hidrolizar X-Gal produciendo un producto de color azul. Se sembraron $2 \cdot 10^4$ células por triplicado en placas de 24 pocillos (Corning TM , 3527) y tras 24 horas se retiró el medio de cultivo, se hizo un lavado con PBS 1x (Gibco, Cat. N° 10010-015) y se añadió a las células una mezcla de reacción con X-Gal preparada de acuerdo al protocolo del kit. Tras 16-18 horas de incubación a 37°C en un incubador sin CO_2 , las células senescentes (azules), fueron contabilizadas y fotografiadas con un microscopio Eclipse TS100 (Nikon).

7.3 ENSAYO DE CARCINOGENÉISIS *IN VIVO*

7.3.1 Generación de tumores subcutáneos

Llevamos a cabo la generación de tumores subcutáneos en ratones inmunosuprimidos (ratones FOXn1Nu/FOXn1Nu) Dichos ratones presentan una mutación que inactiva el gen FOXn1. Dicho gen es fundamental para el desarrollo de pelo y del Timo en el animal, por lo que estos ratones carecen de células T maduras. Para ello se levantaron células de Glioma U87 con Tripsina, se lavaron con PBS y se inyectaron 500.000 células / tumor de Glioma U87 en el tejido subcutáneo de los modelos animales. Realizamos mediciones con calibre periódicas y esperamos el tiempo necesario para que dichos tumores llegasen a un volumen entre 25 y 50mm^3 . El volumen fue calculado introduciendo el diámetro mayor (D) y menor (d) en la fórmula $:0,52 \times D \times d^2$. A continuación se procedió al tratamiento con inhibidor de LEFTY.

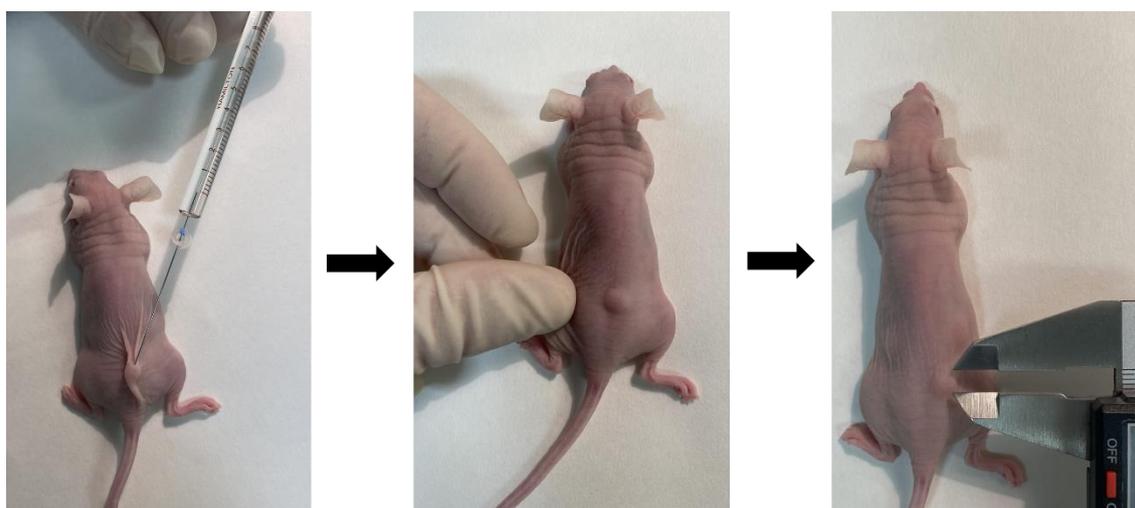


Figura 29: Inoculación de células de Glioblastoma a nivel subcutáneo, crecimiento y medición tumoral.

7.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

7.4.1 *Extracción y cuantificación de proteína.*

Las células de interés se recogieron en tubos cónicos para precipitarlas por centrifugación, eliminar el sobrenadante y posteriormente lavarlas con PBS. Los *pellets* celulares se lisaron en 100 μ L de tampón de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) suplementado con una mezcla de distintos inhibidores de proteasas (Cat. No. P8340, Sigma-Aldrich) y el inhibidor de serina proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, Cat. N° P7626) en una relación de 1 μ L de mezcla por cada millón de células e inhibidores de fosfatasas (Cat. No. P7626, Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para que se efectuara la lisis. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12.000 x g (RCF) en una (microcentrífuga 22R, Beckman Coulter) durante 10 minutos a 4°C para precipitar el material no solubilizado. Los sobrenadantes de la centrifugación constituyeron los extractos de proteínas, que fueron trasvasados a nuevos tubos para ser cuantificados.

La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el método del ácido bicinónico (Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat. N° 23227, Thermo Scientific). Este compuesto es capaz de formar un complejo púrpura intenso (absorbe luz a 562 nm) con iones Cu¹⁺ en un medio alcalino, en el que los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu⁺⁺. La absorbancia del compuesto será proporcional a la concentración de proteína presente. Según esto, se incubó 1 μ L de muestra de extracto con BCA durante 25 minutos a 37°C y se cuantificó la intensidad colorimétrica de las muestras en un lector de placas MutiSkan Ascent (Termo Scientific). Se emplearon muestras de albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones conocidas (BSA 0,25 μ g/mL-2 μ g/mL) para realizar una recta patrón (concentración de proteína *versus* absorbancia) en la que se interpoló la absorbancia de las muestras para obtener sus concentraciones.

7.4.2 *Western Blot*

Se tomó el volumen correspondiente a los microgramos de proteína deseados (generalmente 30 μ g) y se le añadió una quinta parte de tampón de carga 5x (312,5 mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol, 0,5% (p/v) azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol). Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos para la completa desnaturalización de las proteínas y posteriormente fueron separadas mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Esta técnica está basada en la utilización de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes que contienen SDS para conferir carga negativa a las proteínas, por lo que éstas se separan en función de su peso molecular al aplicar una diferencia de voltaje. Se realizaron geles de poliacrilamida de 1,5mm de grosor compuestos por una porción concentradora (4,5% poliacrilamida) y una porción separadora del gel en la que el porcentaje de poliacrilamida se escogió en función del peso molecular de las proteínas a detectar (10-15%). La electroforesis se desarrolló empleando tampón de electroforesis (Tris 20 mM, glicina 0.2 M, SDS 0,1% p/v y pH 8.3) y una fuente de alimentación BioRad HC Power Pac.

Posteriormente, las proteínas ya separadas por tamaño fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,2 μ m NC; Cat. N° 10600001, GE Healthcare Life Science), la cual tiene carga positiva, de forma que, aplicando una diferencia de potencial, las proteínas

migran y quedan inmovilizadas en ella. Se realizó mediante transferencia húmeda en tampón de transferencia 25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 20 % de metanol, pH 8.6) durante 90 minutos a un amperaje constante de 300mA. La eficacia de la transferencia de proteínas se comprobó mediante la tinción de las proteínas de la membrana con Rojo Ponceau S (Cat. N° P7170, Sigma). A continuación, la membrana se incubó con una solución de tampón de Tris Buffer salino 0,01% Tween 20 (Cat. N° 8221840500, Merck Millipore) con 5% de leche en polvo (Cat. N° 70166, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación para bloquear la reactividad inespecífica de los anticuerpos primarios que posteriormente se utilizaron.

Tras el bloqueo, se procedió a la incubación de las membranas de nitrocelulosa en agitación a 4°C durante 15-18 horas con los diferentes anticuerpos primarios según las especificaciones de sus hojas técnicas.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios [Tabla 3], las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con Tris Buffer Salino 0,01% -Tween 20 (Cat. No. 8221840500, Merck Millipore) (TBST) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente [Tabla 8] durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa fueron preparados a una dilución 1:2000 en TBST y 5% de leche en polvo. Tras la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST.

La detección de las proteínas se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia NOVEX ECL Chemi Substrate (Cat N° WP20005, ThermoFisher), que está basado en la reacción quimioluminiscente de oxidación del luminol por parte de la peroxidasa de los anticuerpos secundarios. La señal lumínica emitida de la reacción fue transmitida a películas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL films (GE Healthcare), las cuales fueron reveladas mediante incubación en líquido revelador.

Anticuerpo	ESPECIE DE ORIGEN	DILUCIÓN	REFERENCIA
Primarios			
LEFTY	Ratón	1:500	SC 365845
LEFTY 1	Conejo	1:1000	Ab 22569
p-SMAD2	Conejo	1:1000	Invitrogen 10125104
p-SMAD5	Conejo	1:1000	Invitrogen 163254884
SMAD2	Conejo	1:1000	Ab5339
SMAD5	Conejo	1:1000	Ab12534
SOX2	Conejo	1:500	Milipore AB5603
SOX9	Conejo	1:1000	Milipore AB5535
B actina	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich AC-15
Secundarios			
Goat anti-rabbit HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc- 2004
Goat anti-mouse HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc- 2004

Tabla 2: Características de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot

7.4.3 Inmunofluorescencia

Para determinar la expresión y/o localización subcelular de determinadas proteínas en células, se sembraron 20×10^3 células en su medio de cultivo correspondiente en pocillos de cámaras de inmunocitoquímica (Lab-Tek II Chambers Thermo Scientific) y tras 24 horas fueron fijadas con 4% de paraformaldehído durante 10 minutos. Tras la fijación se procedió al bloqueo y permeabilización con PBS-0,3% Tritón X-100 (Cat. N° T8787, Sigma) suplementado con 5% SBF durante una hora a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo, las muestras fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario [Tabla 3] durante 2 horas a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con PBS 1x para posteriormente ser incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras 3 lavados con PBS 1x se realizó el montaje usando Vectashield Mounting Medium con DAPI Hard set (Cat. N° H-1400, Vector Laboratories). La inmunofluorescencia se observó en un microscopio Eclipse 80i y las imágenes se adquirieron con el software NIS Elements Advances Research (Nikon).

Anticuerpo	ESPECIE DE ORIGEN	DILUCIÓN	REFERENCIA
Primarios			
Fosfo-Histona 3	Ratón	1:2000	Abcam Ab 14955
Caspasa 3	Conejo	1:1000	RDSystems AF835
Secundarios			
Goat anti-rabbit HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc- 2004
Goat anti-mouse HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc- 2004

Tabla 3: Características de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en Inmunofluorescencia.

7.4.4 EdU (5-etinilo-2'-deoxiuridina):

Para evaluar la habilidad de la célula de proliferar se utilizó la técnica basada en la detección de la incorporación de EdU. Se usó el kit comercial *Click-IT EdU Imaging* (C10338, Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello se sembraron 20×10^3 células en pocillos de cámaras de inmunofluorescencia. Tras realizar el tratamiento, las células fueron incubadas 24 h con 10 μ M de EdU. Tras este tiempo, se fijaron con formaldehído al 4% durante 15 min y se permeabilizaron con PBS al 0.3% Tritón X-100 durante 20 min a temperatura ambiente. Tras realizar dos lavados con PBS al 3 % BSA, las células se incubaron con el cóctel de reacción (Click-IT Buffer: 172 μ L, CuSO₄ : 8 μ L, Alexa Fluor Azida: 0.48 μ L, Buffer aditivo: 20 μ L) durante 30 min. Posteriormente se incubaron con *Hoechst* durante 10 min para y se retiraron los compartimentos del porta para realizar el montaje utilizando el medio de montaje Fluoro-Gel.

7.4.5 Inmunohistoquímica

Realizamos inmunohistoquímicas (IHQ) con el objetivo de identificar y cuantificar la expresión de diferentes proteínas de interés en los tumores generados en el tejido subcutáneo de modelos animales.

7.4.5.1 TUMORES DE ENSAYOS IN VIVO

Los tumores generados en el tejido subcutáneo de los ratones inmunodeprimidos (Fox1Nu/Fox1/un) fueron extraídos y fijados en 10% de formalina durante 48 horas a temperatura ambiente para posteriormente ser embebidos en parafina y cortados en secciones de 4 µm de grosor con un microtomo. Los cortes fueron desparafinados, rehidratados mediante baños sucesivos en alcoholes decrecientes e incubados en tampón citrato en ebullición durante 10 minutos para la recuperación antigénica. A continuación, se incubaron en solución de bloqueo (PBS-0,3% Tritón X-100-5% FBS) y fueron incubados con los correspondientes anticuerpos primarios [Tabla 4] a 37°C durante 2 horas. Tras la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron e incubaron con los anticuerpos secundarios [Tabla 10]. Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con el sustrato 3,3'Diaminobenzidina (DAB, Cat. No. SPR-DAB-060, Spring Bioscience), produciéndose como producto de la reacción DAB oxidada, un precipitado marrón detectable en el tejido. Las tinciones se observaron en un microscopio Eclipse 80i y fueron procesadas con el software NIS Elements Advances Research (Nikon).

Anticuerpo	ESPECIE DE ORIGEN	DILUCIÓN	REFERENCIA
Primarios			
Fosfo-Histona 3	Ratón	1:1000	Abcam Ab 14955
SOX2	Conejo	1:500	Milipore AB5603
Caspasa 3	Conejo	1:1000	RDSYSTEMS AF835
LEFTY 1	Conejo	1:1000	Ab 22569
p-SMAD2	Conejo	1:1000	Invitrogen 10125104
p-SMAD5	Conejo	1:1000	Invitrogen 163254884
Ki67	Conejo	1:250	Abcam16667
Secundarios			
Goat anti-rabbit HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc- 2004
Goat anti-mouse HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc- 2004

Tabla 4: Características de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en IHQ.

7.4.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Con el objetivo de estudiar la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de los genes de interés en líneas celulares de glioma mediante PCR cuantitativa, se purificó el ARN y se obtuvo el ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de retrotranscripción (RT).

7.4.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para el aislamiento del ARN celular se lisaron las células con una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol (Trizol® Cat. No. AM-9738, Life Technologies). La lisis en Trizol se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente mediante pipeteo vigoroso. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo (Cat. No. C2432, Sigma), se mezcló mediante inversión y se dejó actuar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12.000 x g a 4°C durante 10 minutos (microcentrífuga 22R, Beckman Coulter) obteniendo así 3 fases bien definidas: una fase superior, acuosa, formada por el ARN, una interfase que contenía el ADN y una fase inferior que contenía las proteínas. La fase superior con el ARN se trasvasó a nuevos tubos tratados con DEPC (Dietil pirocarbonato, Cat. No. 159220, Sigma) y se descartaron el resto de las fases. Se añadieron 500 µL de alcohol isopropílico (Cat. No. I9516, Sigma) y 1 µL de glicógeno (5 µg/µL) (Cat. No. AM9510, Ambion) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar el ARN. Se realizó otra centrifugación a 12.000 x g a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7.000 x g a 4°C durante 5 minutos para lavar el precipitado. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se secó el *pellet* en una cámara de vacío durante 10 minutos y se resuspendió con agua libre de ARNasas. La concentración y pureza del ARN aislado se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific).

7.4.6.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Para la obtención del ADN complementario de cadena simple se realizó la retrotranscripción mediante el método de cebadores aleatorios y el Kit MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Cat. N° 4311235, Life Technologies), partiendo de 1 µg de ARN total. Las muestras se sometieron a los siguientes ciclos de temperatura en un termociclador BioRad C1000 Thermal Cycler: incubación de 10 minutos a 25°C, fase de calentamiento a 37°C durante 120 minutos y fase de calentamiento final a 85°C durante 5 minutos. El ADNc resultante se diluyó en agua libre de ARNasas a una concentración final de 4 ng/µL.

7.4.6.3 PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

Para determinar los niveles de expresión de los genes de interés se utilizó la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), que se basa en la reacción de PCR para amplificar el producto específico, y permite la monitorización del proceso ciclo a ciclo. Se empleó ADN complementario como molde, dos cebadores específicos y una mezcla de reacción (Absolute SYBR Green mix (Cat. N° 4368706G, Applied Biosystem) que contiene

desoxirribonucleótidos (dNTPs), enzima ADN polimerasa y el fluoróforo SYBR Green, el cual se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena y permite la cuantificación del producto en cada ciclo.

Las PCR se realizaron en placas de 96 pocillos (cada muestra por triplicado) y en cada pocillo se dispusieron 20 ng de ADNc en un volumen final de 12 μ L constituidos por 6 μ L de Absolute SYBR Green mix, 0,75 μ L de agua libre de ARNasas y 0,25 μ L de mezcla de cebadores (*forward* y *reverse*) específicos para cada gen de estudio [Tabla 5] a una concentración de 0,4 μ M. La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 96 (Roche) con los siguientes ciclos de temperatura: ciclo de 120 segundos a 50°C; 1 ciclo de 600 segundos a 95°C, 41 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C y un último paso de disociación consistente en 10 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C y 1 segundo a 97°C.

Como gen de control interno para corregir las variaciones de los niveles de ADNc se usó la amplificación de GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa). Para realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que consiste en calcular la expresión normalizada del gen de interés en la muestra con respecto a las muestras de referencia. Los datos se presentan como el “cambio de veces de expresión” del gen diana normalizado con el gen control y a su vez relativizada respecto a la correspondiente muestra control.

GEN	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG	GACGGTGCCATGGAATTTGC
LEFTY-1	AGAGCTGGCGATGACTGAAC	AAACTGAGCAAGGGCTCTCC
LEFTY-2	ACGTGAGGGCCCAGTATGTA	TCCATGCCGAACACCAGC
SMAD-2	GCCGGGAGGTTGATAACAAG	AGTCTCTTCACAACTGGCGG
SMAD-5	GCGGCCGAGCTGCTAATAAA	CAGCTTCCTTTTCGCGAGC

Tabla 5: Secuencias de cebadores empleados.

7.4.7 Análisis Estadístico

Los datos mostrados en el presente trabajo representan la media \pm error estándar de la media (SEM). Las medias fueron comparadas mediante el test estadístico t de Student y los datos se representaron usando GraphPad 8. Los asteriscos indican los diferentes grados de significación estadística: #p<0,1 * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

Los análisis de correlación se basaron en el coeficiente de Pearson cuando las muestras estaban normalmente distribuidas o el coeficiente de Spearman cuando no estaban normalmente distribuidas. El análisis de la normalidad se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, usando el software GraphPad 8. Para los estudios de asociación entre supervivencia y otras variables se empleó el método de Regresión de COX.

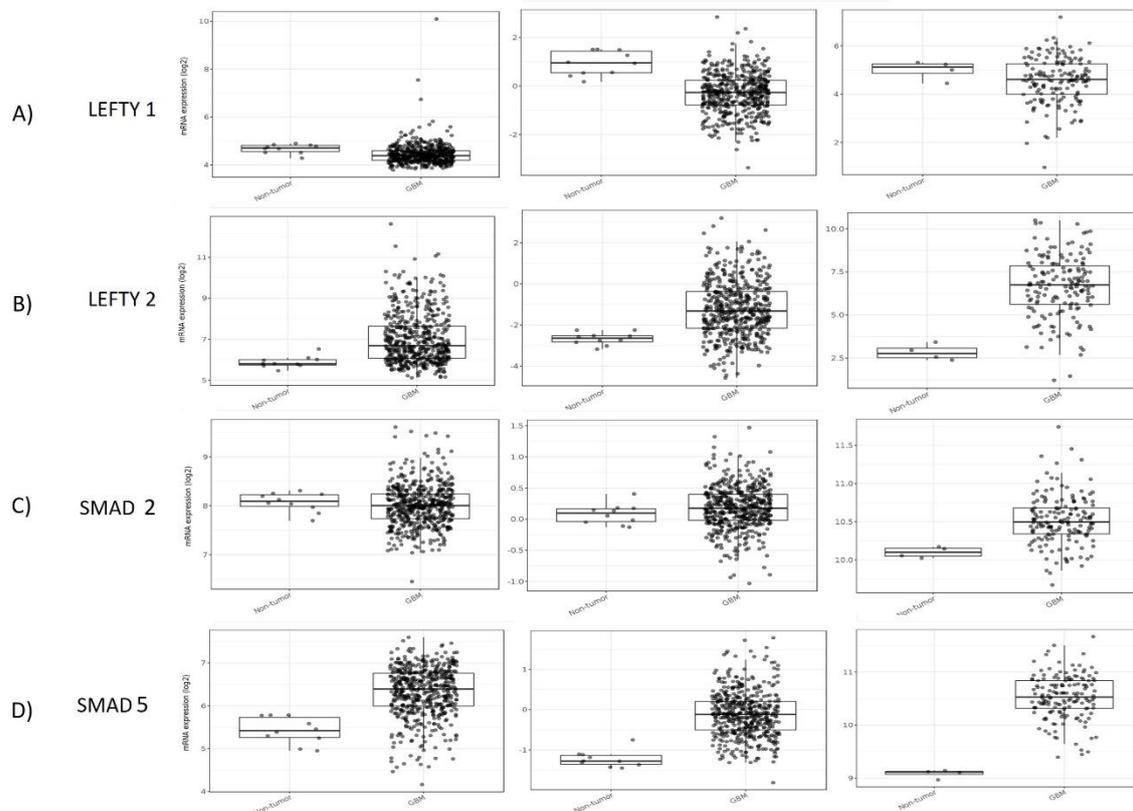
8 RESULTADOS

8.1 LA EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS DE LA VÍA SEÑALIZACIÓN LEFTY-SMAD ES HETEROGÉNEA EN BIOPSIAS DE GLIOBLASTOMA.

Inicialmente estudiamos la expresión de LEFTY1, LEFTY2, SMAD2 y SMAD5 en biopsias tumorales de glioblastoma. Para ello, empleamos el portal **GlioVis (Bowman et al., 2017)** donde están almacenados y accesibles datos de muestras de Glioblastomas del TCGA. Analizamos la expresión de estos 3 genes según tres plataformas de secuenciación diferentes RNA-seq, Agilent-4502A y HG-U133A.

La expresión, a nivel transcripcional, de los genes citados en las muestras de glioblastoma fueron comparados con los obtenidos en tejido sano cerebral, usado como control en cada estudio.

Los niveles de *LEFTY1* se encuentran disminuidos en las biopsias de glioblastoma independientemente de la plataforma utilizada (Fig. 30A), mientras que los de *LEFTY2* están aumentados respecto al tejido sano cerebral (Fig. 30B). En cuanto a las SMAD; los niveles de *SMAD2* no parecen estar alterados en 2 de las plataformas mientras que en RNA-seq están elevados (Fig. 30C). Por último, la expresión de *SMAD5* está elevada al ser comparada con el tejido cerebral control (Fig. 30D). Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de los genes de interés es heterogénea.



8.2 LA SOBREPRESIÓN DE LEFTY SE ASOCIA A UNA MENOR SUPERVIVENCIA EN BIOPSIAS DE GLIOBLASTOMA.

Consultamos el Portal Gliovis (**Bowman et al., 2017**) para determinar cómo se relacionaba la supervivencia con la expresión de LEFTY y SMAD.

Analizamos, por un lado, una cohorte de muestras del TCGA que incluye Glioblastomas primarios, secundarios y recurrentes; y; por otro lado, analizamos específicamente la cohorte de Glioblastomas recurrentes. Los resultados muestran que, en ambas cohortes, los pacientes con mayor expresión de LEFTY, tanto de LEFTY 1 como de LEFTY 2, en las muestras analizadas, presentaban una menor supervivencia que aquellos con niveles bajos de LEFTY. Parece que en la cohorte que analiza la expresión de LEFTY específicamente en los Glioblastomas recurrentes estas diferencias en la supervivencia son todavía más significativas.

Dentro de la cohorte que incluye Glioblastomas primarios, secundarios y recurrentes, la mediana de supervivencia es de 12,4 meses en los niveles altos de LEFTY 1 y de 12,7 en los niveles bajos de LEFTY 1. En cuanto a LEFTY 2, la mediana de supervivencia es de 11,4 meses en los niveles altos y de 13,9 meses en los niveles bajos. En la cohorte que incluye exclusivamente Glioblastomas recurrentes, la mediana de supervivencia es de 8.2 meses en los niveles altos de LEFTY 1 y de 10.8 en los niveles bajos de LEFTY 1. En cuanto a LEFTY 2, la mediana de supervivencia es de 8.15 meses en los niveles altos y de 10.5 meses en los niveles bajos.

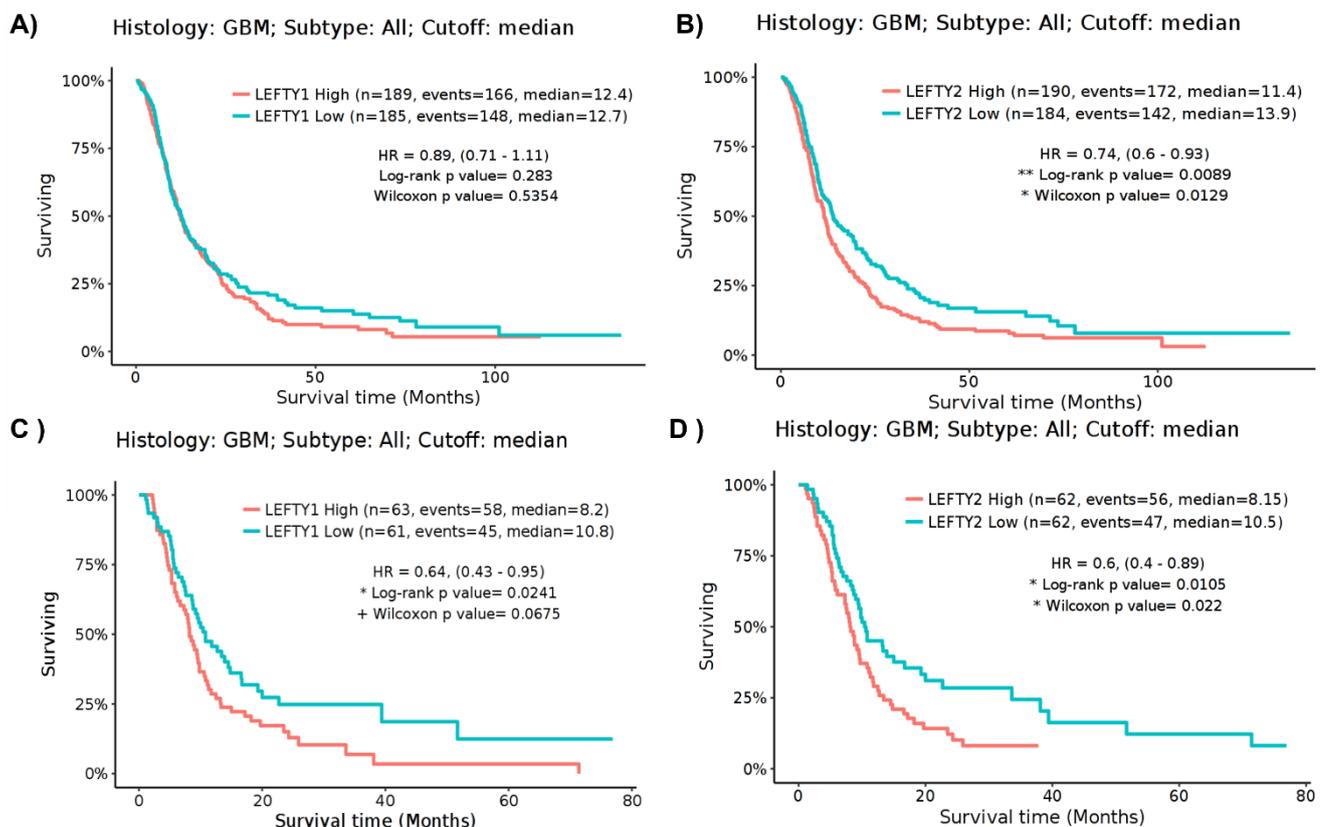


Figura 31: Análisis de supervivencia Kaplan-Meier: A) y B) Análisis de supervivencia de pacientes con muestras de GBM primarios, recurrentes y secundarios en función del nivel de expresión de LEFTY 1 y LEFTY 2 C) y D) Análisis de la supervivencia de pacientes con muestras de GBM recurrentes en función del nivel de expresión de LEFTY1 y LEFTY2.

Analizamos también la relación entre la supervivencia y la expresión de SMAD 2 y SMAD 5 en cohortes de Glioblastoma que incluía muestras de Glioblastoma primario, secundario y recurrente y de forma individual por subgrupos (primario, secundario y recurrente) y no encontramos diferencias significativas en cuanto a la supervivencia en función de la expresión de SMAD 2 y SMAD 5.

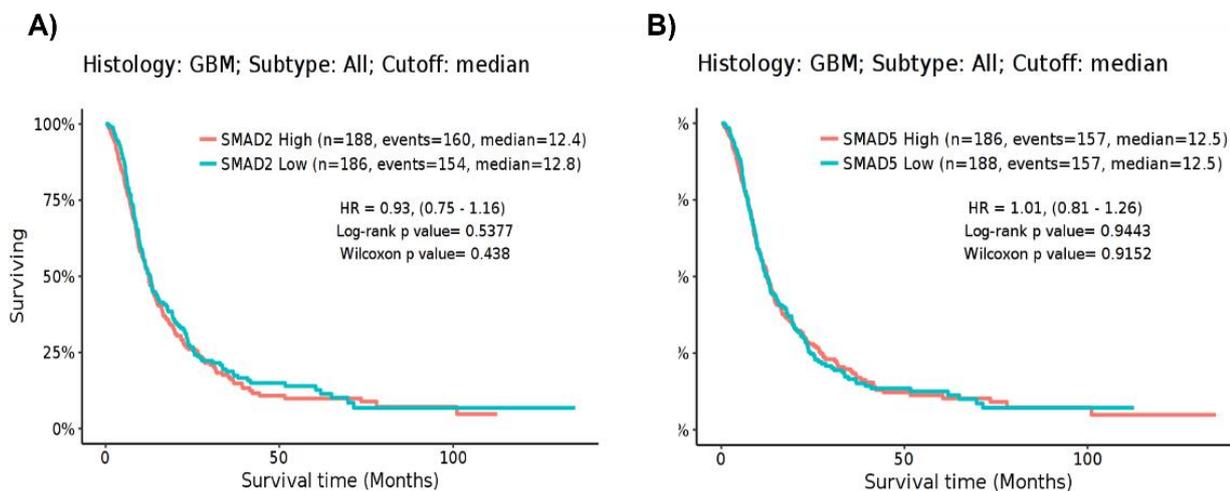


Figura 32: Análisis de supervivencia Kaplan-Meier: A) Análisis de supervivencia de pacientes con muestras de GBM primarios, recurrentes y secundarios en función del nivel de expresión de SMAD2 **B)** Análisis de supervivencia de pacientes con muestras de GBM primarios, recurrentes y secundarios en función del nivel de expresión de SMAD 5.

Una vez estudiados los datos disponibles en bases de datos públicas llevamos a cabo un estudio similar en pacientes de nuestro centro. En este caso nos centramos en estudiar la expresión de LEFTY a nivel proteico. Para ello realizamos un estudio inmunohistoquímico de muestras de Glioblastoma de pacientes intervenidos en el año 2014 y 2015 por el Servicio de Neurocirugía en nuestro centro. Analizamos la expresión de LEFTY en 65 muestras y a cada muestra se le asignó un nivel que dividimos en negativo/bajo (-), intermedio (+/-) y alto (+). Los casos en cada grupo fueron 12, 40 y 10 respectivamente. Tres de las muestras presentaban daños por lo que no las incluimos en ninguno de los grupos. A continuación, pretendimos asociar la expresión de LEFTY a la supervivencia de los pacientes, que están incorporadas en la base de datos del Servicio de neurocirugía de manera coordinada con el comité de neuro-oncología. Observamos que, de las 66 muestras, había algunas que provenían del mismo paciente o no sé tenía información completa por lo que nos quedamos con un total de 40 individuos. Para reforzar la estadística y

buscar diferencias más claras, las agrupamos en 2 cohortes: LEFTY alto y LEFTY bajo. En este caso, la expresión de LEFTY está aumentada en el 52,5 % de los pacientes de nuestra muestra.

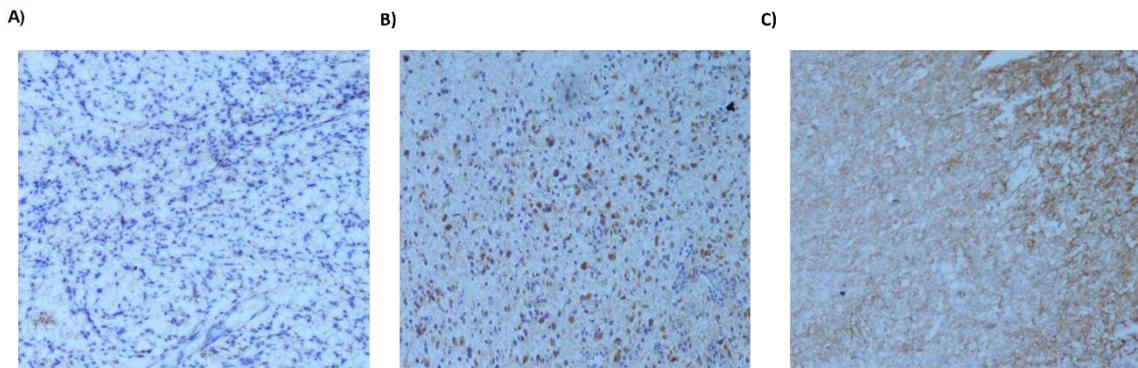


Figura 33: Estudio inmunohistoquímico de las muestras de 40 pacientes intervenidos de Glioblastoma en el año 2014 y 2015 por el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Donostia. Realizamos una división de las muestras en dos grupos, LEFTY bajo (A) Lefty intermedio (B) Y LEFTY alto (C).

Tras analizar la supervivencia de cada uno de estos 40 pacientes llevamos a cabo un Modelo de Regresión de Cox. Parece existir una asociación entre una mayor expresión de LEFTY y una menor supervivencia de los pacientes de nuestra muestra, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas.

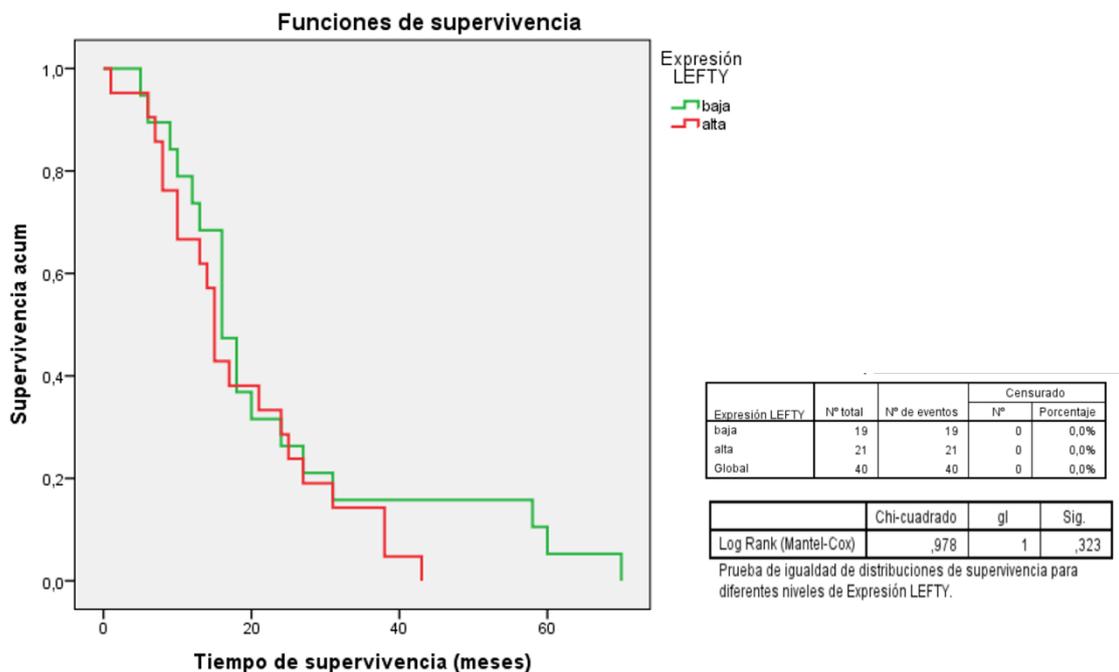


Figura 34: Análisis de supervivencia Kaplan-Meier. Analizamos la supervivencia en función del grado de expresión de LEFTY. Los resultados muestran que parece existir cierta asociación entre niveles de expresión más altos y una menor supervivencia.

8.3 LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LEFTY ESTÁN AUMENTADOS EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOBLASTOMA Y EN LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE DE GLIOMA

Analizamos la expresión de las proteínas de interés: LEFTY, SMAD2, SMAD 5, p-SMAD2 y p-SMAD5 en diferentes líneas celulares de Glioblastoma, compradas en la ATCC, y la comparamos frente a una línea de astrocitos primarios derivada de individuos sanos (NHA). Los resultados del Western Blot reflejaron que LEFTY se expresa en todas las líneas celulares estudiadas y que sus niveles son mayores en comparación con los astrocitos sanos (Fig. 35). Las líneas de glioma que más expresión mostraban son la línea U87 y T98 en este orden (Fig. 35). En cuanto a las SMAD, observamos una disminución de la expresión de SMAD2 total en células de glioma respecto a la NHA, sobre todo en las líneas U87 y T98, consistente con los niveles de LEFTY) mientras que los niveles de SMAD5 total parecen no estar disminuidos.

Realizamos también la medición de la expresión de las proteínas de interés en dos líneas de células madre de Glioma (GSC) derivadas de pacientes denominadas GNS166 y GNS179 (Ref Pollard SM 2009 Cell Stem Cell). En este caso, los resultados mostraron que la expresión de LEFTY era muy alta en estas células. Marcadamente mayor que los astrocitos sanos NHA y similares a las líneas de glioma U87 y T98, que presentaban los niveles más altos. En cuanto a los niveles de SMAD total, la expresión de SMAD 2 y SMAD 5 era similar a los astrocitos o estaba ligeramente aumentada (Fig. 35).

A continuación, completamos el análisis de expresión de los genes de interés en las líneas celulares convencionales analizando sus niveles de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa. Todas las líneas celulares fueron comparadas con la línea U87 la cual fue la que mostraba una expresión más elevada de LEFTY a nivel proteico. En este caso, los resultados muestran una expresión heterogénea tanto en *LEFTY* como *SMAD*, que no se ajusta de manera precisa con lo observado en los Western Blot.

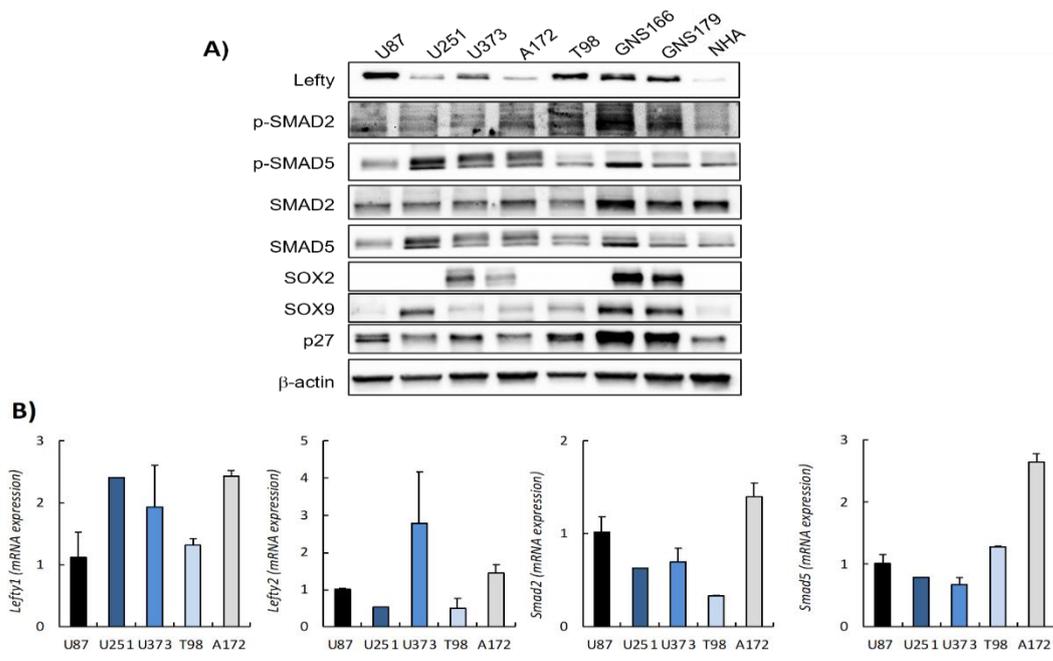


Figura 35: Expresión de los genes de interés en líneas celulares de glioma. A) Análisis de expresión de proteína, mediante western blot de *LEFTY1*, *SMAD2* y *SMAD5* en distintas líneas tumorales convencionales de glioma y en GSCs (dos líneas denominadas GNS166 y GNS179). NHA es línea humana primaria de astrocitos usada como control. **B)** Análisis de expresión de mRNA de indicados genes en las líneas tumorales indicadas.

8.4 LA EXPRESIÓN DE LEFTY Y SMAD CAMBIA EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Los resultados del apartado anterior sugieren que los niveles de LEFTY están enriquecidos en la población de células madre de glioma derivadas de pacientes. Para completar el estudio de la expresión de LEFTY, y las SMAD, en las células madre de glioma, analizamos su expresión mediante Western Blot y RT-PCR cuantitativa en las diferentes líneas celulares de Glioblastoma crecidas en medio estándar y tras cultivarlas en un medio selectivo para células madre, de forma que estas creciesen como oncosferas (2ry CSC) y adquiriesen características de célula madre-indiferenciadas (**Ref Garros-Regulez 2016**). En primer lugar, analizamos los niveles de mRNA y observamos que tanto LEFTY (1 y 2) como las SMAD presentan una mayor expresión a nivel transcripcional en las oncosferas (Figura 36) A nivel proteico, los niveles de LEFTY están enriquecidos en las oncosferas, sobre todo en U251 y A172 y excepto U373, mientras que los niveles totales de SMAD 2 y 5 parecen mantenerse constantes.

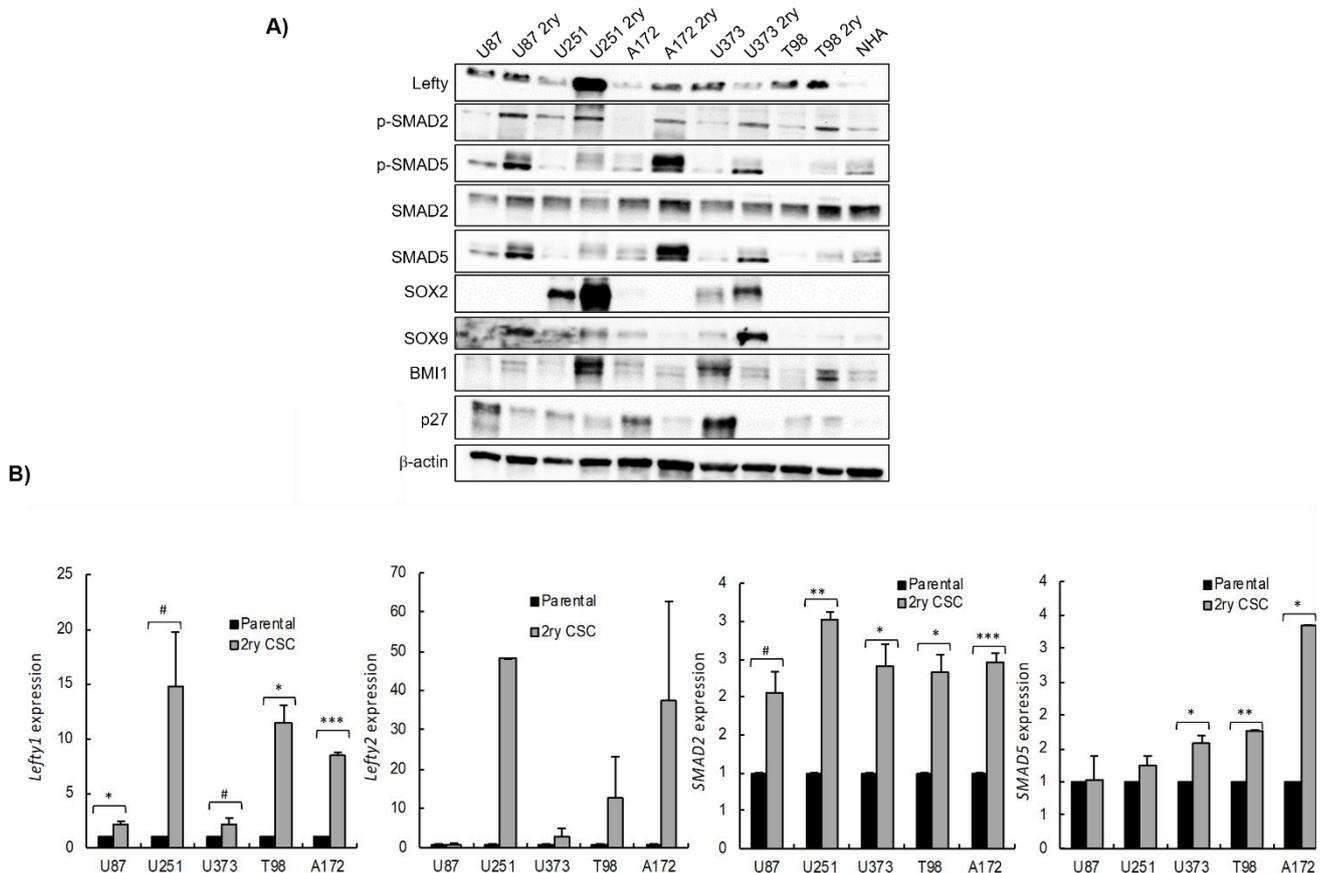


Figura 36: Análisis de expresión de LEFTY1, LEFTY2, SMAD2 y SMAD5 en distintas líneas tumorales convencionales de glioma antes y después de ser cultivadas en condiciones de célula madre como oncosferas. A) Análisis de la expresión de proteína de los genes de interés en las líneas celulares de Glioblastoma. **B)** Análisis de la expresión de los genes mediante la cuantificación de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa.

A continuación, realizamos un ensayo inverso al anteriormente comentado. Lo que hicimos fue cultivar las células madre de Glioma derivadas de pacientes GNS166 y GNS179 en su medio estándar (selectivo para células madre) y siguiendo un protocolo de diferenciación que consiste en cultivarlas en presencia de suero fetal bovino (FBS) y en ausencia de factores de crecimiento Fibroblástico y Epidérmico (FGF y EGFR). De esta manera comparamos la expresión de LEFTY, SMAD 2 y SMAD 5 en las líneas GNS166 y GNS179 en su forma indiferenciada y diferenciada. Los resultados mostraron una clara disminución en los niveles proteicos de LEFTY, y un aumento de SMAD 5 total (Fig 37).

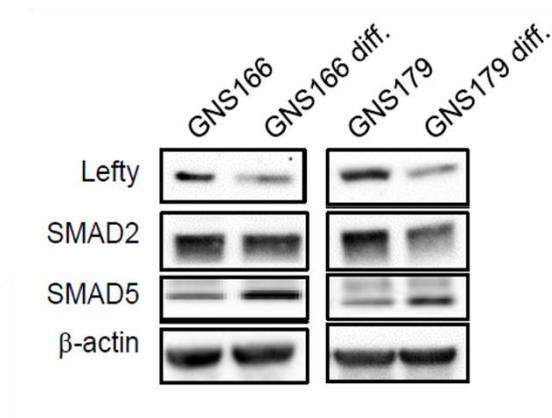


Figura 37: Análisis de expresión de proteína de indicados genes en las líneas de GSCs GNS166 y GNS179 cultivadas en condiciones de célula madre y tras 10 días en medio de diferenciación.

8.5 LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LEFTY DISMINUYE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE DE GLIOMA Y DE LAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Dado que los resultados moleculares indican que las células tumorales de glioma presentan una expresión elevada de LEFTY, destacando la de las células madre de glioma, decidimos ver los efectos de la inhibición farmacológica de LEFTY mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-LEFTY, cedido por la empresa Onena Medicines.

En primer lugar realizamos ensayos de Viabilidad celular MTT empleando las líneas celulares de Glioblastoma (U87, U251, A172) y las líneas de célula madre de Glioma (GNS166, GNS179). Se trataron las células con distintas concentraciones, todas ellas bajas (desde 0 hasta 2ug/mL) durante 48 horas. Los primeros estudios demostraron que el compuesto Anti-LEFTY no presenta un efecto citotóxico *per se* ya que concentraciones bajas (0,1- 1 ug/mL) de Anti-LEFTY apenas presentan un efecto significativo en la viabilidad celular, en cambio, concentraciones de 2 ug/mL promueven una reducción de la viabilidad celular del 20% en todos los tipos celulares

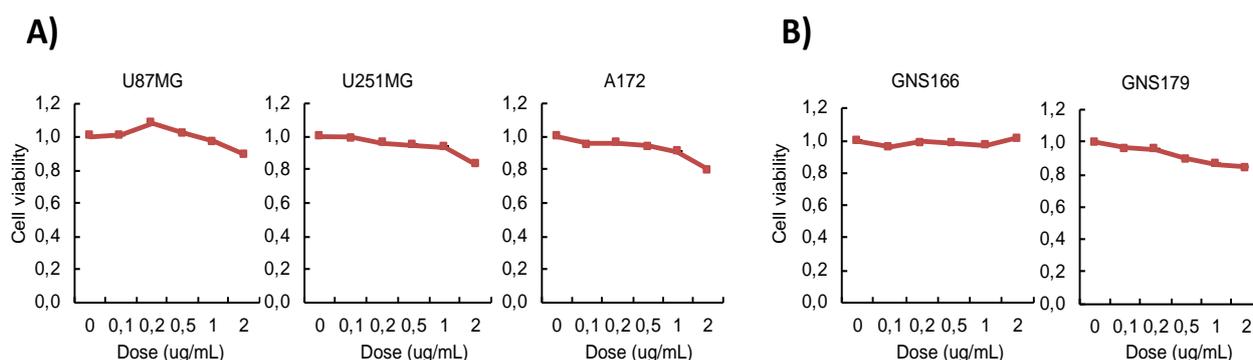


Figura 38: Inhibición de LEFTY reduce la viabilidad celular de células de glioma. A-B) Curva de crecimiento en las células de glioma indicadas en la figura, representando la viabilidad con concentraciones crecientes del anticuerpo frente LEFTY. El tratamiento fue de 72 horas.

Una vez obtenida la concentración a la que las células empezaban a reducir su viabilidad decidimos llevar a cabo un nuevo ensayo de viabilidad con concentraciones de 10 ug/mL en las mismas tres líneas de células de Glioblastoma y en las dos líneas de células madre de Glioma. Detectamos una disminución de la viabilidad de al menos un 40% en todas las líneas estudiadas, siendo las líneas en la que mayor efecto tuvo el compuesto la U87, U251 y las GNS 179 con cerca del 60% (Fig 38). Pretendimos completar este análisis funcional con uno molecular, para valorar el impacto de anticuerpo en su diana. Para ello, realizamos Western blot de las distintas células de glioma tratadas y sin tratar. El estudio de la expresión de la proteína LEFTY demostró que el tratamiento con el Anticuerpo frente a LEFTY disminuye de manera muy drástica su expresión quedando casi ausente en las células tratadas frente a las no tratadas (Fig 39).

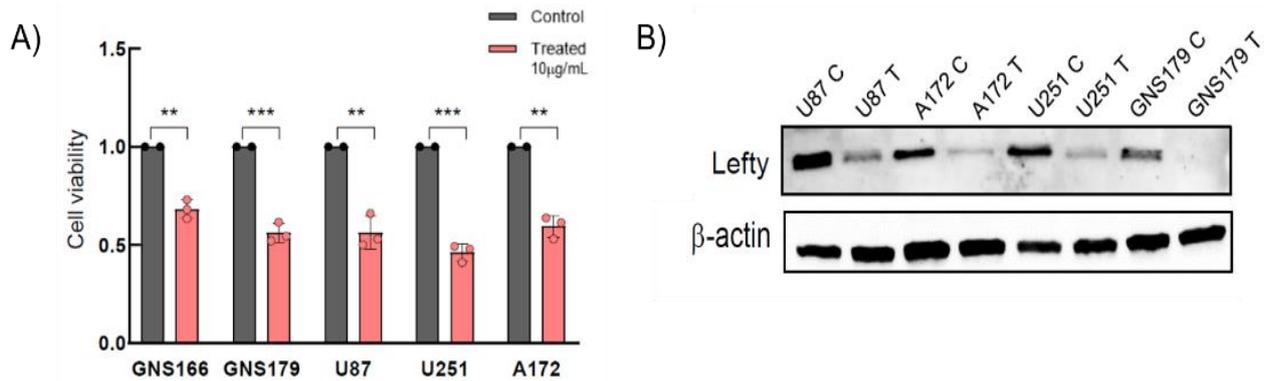


Figura 39: A) Concentraciones de 10 µg/mL de Anti-LEFTY reducen la viabilidad celular al 60%. **B)** La expresión de LEFTY disminuye tras la exposición del anticuerpo a las células.

8.6 LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LEFTY REDUCE LAS CARACTERÍSTICAS TUMOROGÉNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE DE GLIOMA Y DE LAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Tras los resultados obtenidos en viabilidad celular decidimos ampliar la caracterización biológica de la inhibición de LEFTY y estudiar procesos clave como la capacidad proliferativa, apoptótica y de senescencia tanto de las células de glioblastoma como de las células madre de glioma derivadas de pacientes tras la inhibición farmacológica de LEFTY.

Para ello constituimos un grupo de tratamiento celular al que aplicamos el anticuerpo anti-LEFTY a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 72 horas a las células GNS166 y GNS179, además de U87, U251 y A172 y lo comparamos frente a un grupo control que no fue tratado. En primer lugar, caracterizamos la capacidad proliferativa celular, para lo cual medimos mediante Inmunofluorescencia los marcadores de proliferación Fosfo histona 3 (p-H3) y ethynyldeoxyuridine (EdU). Hemos observado que todas las células de glioma tratadas con el anticuerpo bloqueante durante 72 horas presentan una actividad proliferativa significativamente reducida ya que presentan una reducción superior al 60% en todos los casos en la cuantificación del número de células positivas para p-H3 y EdU (Fig. 40 A, B).

A continuación, estudiamos la inducción de apoptosis y senescencia promovida por la inhibición farmacológica de LEFTY mediante la medición del marcador de apoptosis Caspasa 3 y el marcador de senescencia B Galactosidasa (SA- β -Gal). Los resultados de inmunofluorescencia obtenidos confirman que el efecto antiproliferativo está acompañado con un aumento significativo en el número de células apoptóticas (Fig 40 C), además de senescentes (Fig 40 D) de más de 5 veces.

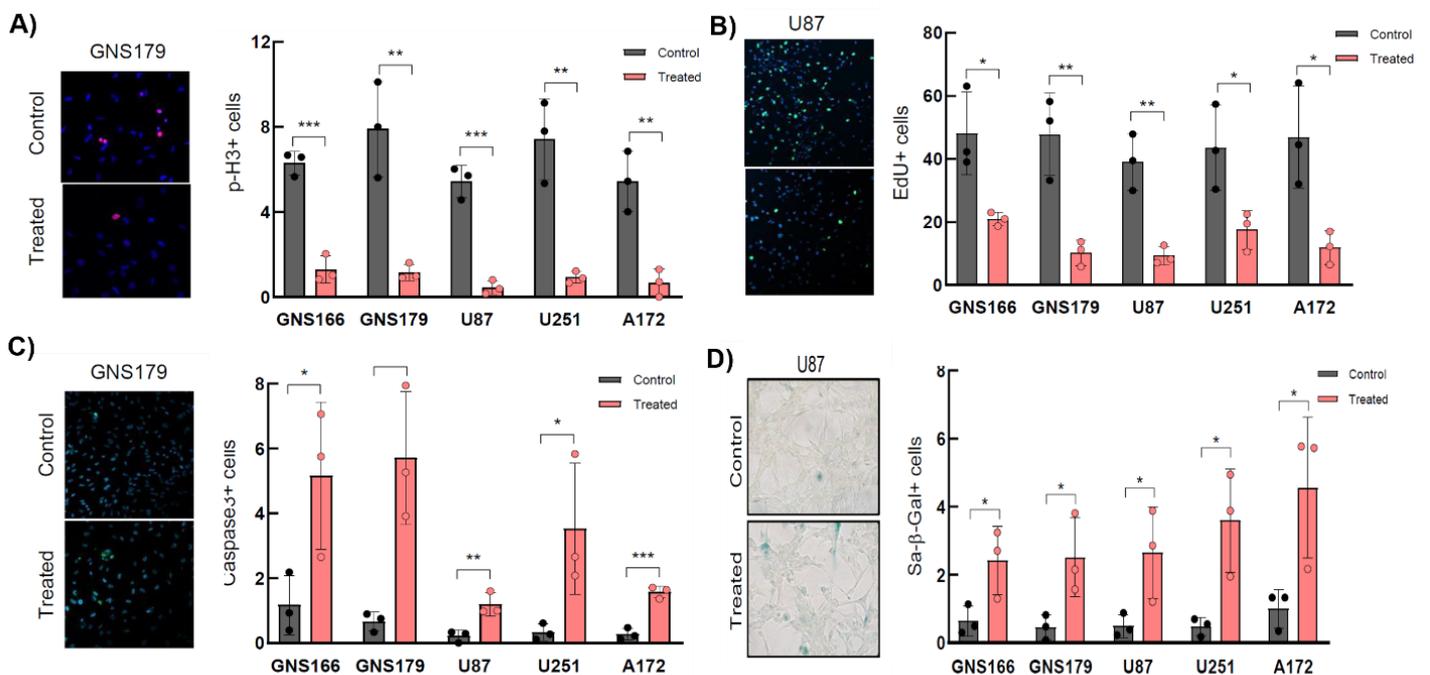


Figura 40: Disminución de la actividad celular tras la modulación de la vía SMAD: A) y B) Reducción en la capacidad proliferativa. C) Aumento de la muerte celular programada. D) Aumento del estado senescencia celular.

8.7 LA MODULACIÓN DE LA VÍA SMAD AFECTA A LA CAPACIDAD DE AUTORRENOVACIÓN TUMORAL.

Los resultados obtenidos sugieren que el anticuerpo anti-LEFTY ejerce un efecto inhibitor importante en la actividad biológica de la población de células madre de glioma. Para confirmar este análisis y resultado, se realizó un ensayo de crecimiento de la línea convencional U87 en medio selectivo para el crecimiento de células madre permitiendo la formación de oncosferas. Mientras que las células control fueron capaces de formar gran número de oncosferas a los 10 días (más de 200 de media), las células tratadas formaron un número de oncosferas mucho menor (cerca a 40, lo que significaban un 75 % menos que las células no tratadas) (Fig. 41 A). Para ver si el tratamiento del anticuerpo también afecta la habilidad de auto-renovación, se disgregaron las oncosferas formadas y se volvieron a poner en medio selectivo para células madre por otros 10 días. Mientras que las células control fueron capaces de formar gran número de oncosferas secundarias (más de 150 de media), las células tratadas formaron un número de oncosferas secundarias mucho menor (cerca a 40, lo que significaban un 60% menos que las células no tratadas) (Fig. 41 B). Estos datos en su conjunto sugieren que la vía de SMAD-LEFTY es un factor necesario para el mantenimiento de las células madre de glioma.

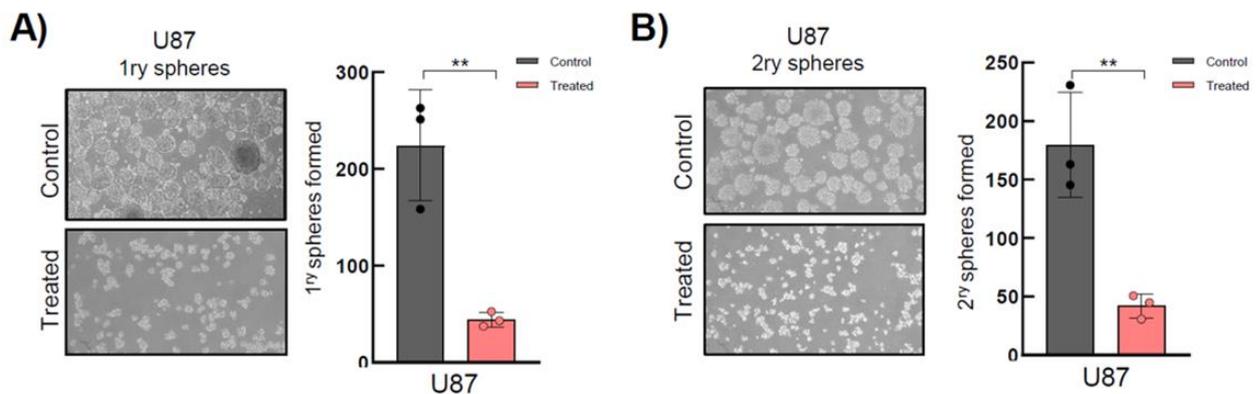


Figura 41: Disminución de la capacidad de autorrenovación tras la modulación de la vía SMAD: A) Reducción en la capacidad de formación de esferas primarias B) Reducción en la capacidad de formación de esferas secundarias.

8.8 LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LEFTY REDUCE EL CRECIMIENTO TUMORAL EN MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Tras los prometedores resultados obtenidos *in vitro* decidimos llevar a cabo dos ensayos para ver el impacto del anticuerpo anti-LEFTY en la formación y progresión de tumores generados en modelos *in vivo*. Para ello decidimos trabajar con la línea de Glioblastoma U87 ya que fue una de las que más LEFTY expresaba.

En el primer experimento, inoculamos las células U87 en el tejido subcutáneo de ratones inmunodeprimidos *FOX1^{nu}/Fox1^{nu}*, y cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral de aproximadamente 50-100mm³ (aproximadamente a los 23 días desde pinchazo), tratamos con el anticuerpo Anti-LEFTY dos veces a la semana al 50 % de los animales. La mitad restante fue tratada con Placebo. Realizamos un seguimiento estrecho de los tumores y mediciones volumétricas cada 3 días. El experimento se dio por finalizado a los 20 días desde el inicio del tratamiento de cada tumor.

Comparamos la progresión del tumor desde la fecha en la que se comienza a administrar el anticuerpo intratumoralmente y se observa que al día 7 de tratamiento (día 30 de la Fig 42 A), la media del volumen tratado es la mitad de los del grupo control. Esta diferencia va aumentando progresivamente y se hace máxima al día 25 de tratamiento momento en el que el volumen (media) del grupo tratado es tres veces menor que el volumen del grupo control. Así, el volumen de los tumores tratados tiene una media de 1200 mm³ comparado con 1800 mm³ de los tratados con placebo (Fig 42 A). Los resultados muestran una ralentización en el crecimiento tumoral del grupo tratado en comparación al grupo control.

Al finalizar el experimento y sacrificar los animales, extrajimos los tumores y medimos los pesos comparando los pesos de los tumores tratados frente a los controles. La mayoría de los tumores tratados pesaban menos que los tratados, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos (Fig 42 B).

A continuación, quisimos corroborar el efecto antitumoral ejercido por el anticuerpo anti-LEFTY si éste se ejercía al inhibir LEFTY y modular la vía SMAD. Para ello, realizamos un estudio inmunohistoquímico de los tumores tratados y de los controles. Contactamos a la plataforma de histología del Instituto Biodonostia y solicitamos un análisis histológico mediante tinción de Hematoxilina Eosina (HE) y un análisis inmunopatológico estudiando la expresión de Ki67 (marcador de proliferación), Caspasa 3 (apoptosis) y SOX2 (marcador de células madre), por un lado y la expresión de LEFTY y P-SMAD2 y 5 por otro. Las inmunohistoquímicas muestran que el número de células positivas para Ki67 disminuye drásticamente en los tumores tratados (Fig 42 C), mientras que las células Caspasa 3 positiva disminuyen (Fig 42 C). Los niveles de SOX2 están bajos en ambas condiciones, resultado que es coherente con estudios previos donde se observa que los niveles de SOX2 en la línea U87 son muy bajos (**Garros-Regulez et al., 2016**). En paralelo, observamos que los niveles de LEFTY están significativamente reducidos en los tumores tratados con el anticuerpo bloqueante (Fig 42 C), así como los niveles de p-SMAD2 y 5. Estos datos, en resumen, refuerzan los valores de progresión tumoral y confirman que el anticuerpo anti-LEFTY ejerce actividad anti-tumoral *in vivo* a través de la inhibición de su expresión.

Realizamos un segundo experimento *in vivo* el cual se volvieron a pinchar 500.000 células U87 en los flancos de animales inmunodeprimidos, que alcanzaron un tamaño de entre 25 y 50 mm³

a los 24 días de experimento, fecha en la que se pusieron en marcha el tratamiento (Ver imagen Fig 43). Esta aproximación metodológica provocó que los resultados fueron más significativos que en el experimento anterior. A los 8 días desde comienzo de tratamiento (día 32), el volumen tumoral medio de los tratados era de 100 mm³ comparado con 200 mm³ de los controles. Al finalizar el tratamiento, el día 37 el volumen tumoral de los controles era casi 3 veces mayor que los tratados. De hecho, los controles tenían un volumen medio de 500 mm³ respecto a los tratados que era de 200 mm³ (Fig. 43).

Se dejó la mitad de los animales con vida para el experimento de wash out, cuya evolución fue satisfactoria. Los tumores de animales no tratados presentaron un incremento exponencial pasando de 500 mm³ a día 37 a 1500 mm³ a día 42 cuando fueron sacrificados. En cambio, los tratados tuvieron un incremento lineal pasando de 200 mm³ a día 37 a 250 mm³ a día 42 (Fig. 43). De forma que el día 5 de haber finalizado el tratamiento el volumen de los controles era casi 6 veces mayor que los que habían sido tratados. Además, la progresión de los tumores tratados se mantuvo lineal alcanzando un tamaño de 600 mm³ a los 65 días de experimento, casi 30 días después de haber acabado el tratamiento (Fig 43)

Al finalizar el experimento a los 37 días extrajimos los tumores y comparamos los pesos de los tumores tratados frente a los controles. En este caso, confirmamos que los tumores tratados pesaban menos que los tratados, siendo estos resultados estadísticamente significativos (Fig 44 B).

Estos experimentos confirman que el tratamiento con anticuerpo anti-Lefty ejerce una potente acción anti-tumoral in vivo

Tras la extracción tumoral llevamos a cabo la disgregación de tumores tratados y no tratados obteniendo células que sembramos en medio selectivo de célula madre. Mientras que las células control fueron capaces de formar gran número de oncosferas a los 10 días, las células tratadas formaron un 50% menos de oncosferas primarias (Fig 45).

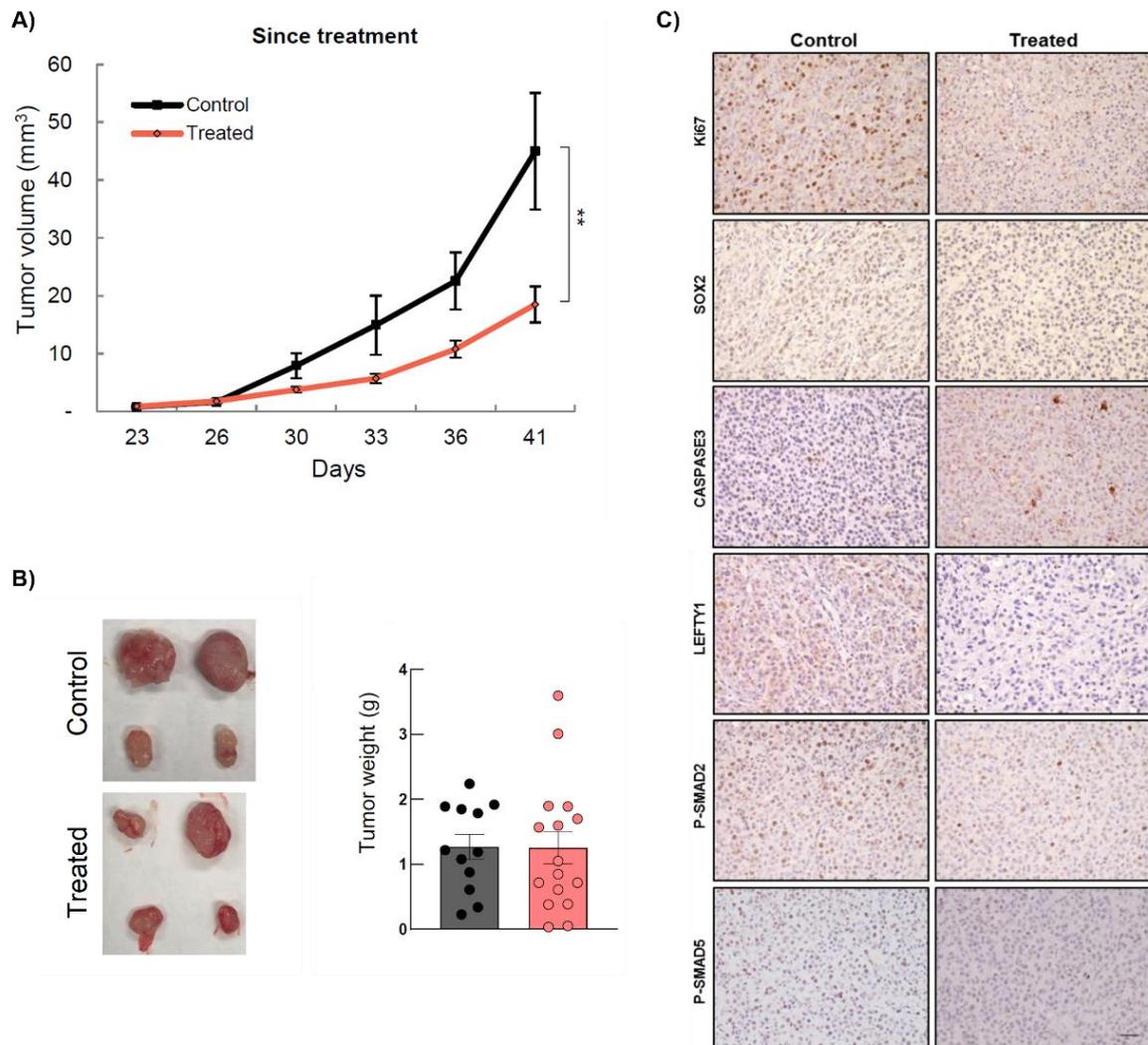


Figura 42: La inhibición Farmacológica de LEFTY reduce el crecimiento tumoral en modelos de experimentación animal. Se establecieron dos brazos de tratamiento compuestos por 3 animales con 4 tumores cada uno en el grupo control, y 4 animales con 4 tumores cada uno en el grupo tratado. Se inocularon 10 uL de anti-LEFTY de forma intratumoral dos veces por semana durante 3 semanas. A) y B) Ralentización del crecimiento tumoral en el grupo tratado respecto al grupo control. C) Caracterización inmunohistológica de los tumores generados en modelos IN VIVO.

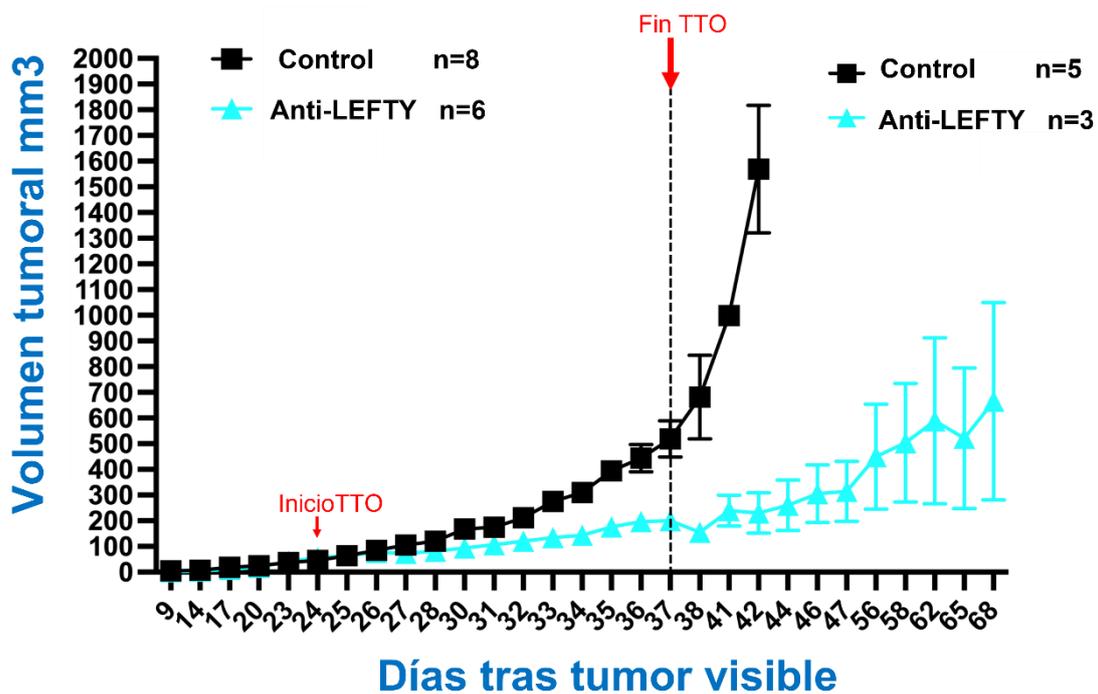


Figura 43: La inhibición Farmacológica de LEFTY reduce el crecimiento tumoral en modelos de experimentación animal. Se establecieron dos grupos, uno control con 8 animales con un tumor por animal y otro de tratamiento con 6 animales y un tumor por animal. El fármaco anti-LEFTY se inoculó intratumoralmente, 5 días a la semana durante 2 semanas, a una concentración de 1 ug/uL: Ralentización del crecimiento tumoral en el grupo tratado respecto al grupo control. Durante el período de Wash Out los efectos del anticuerpo se mantienen y el crecimiento tumoral continúa siendo lineal.

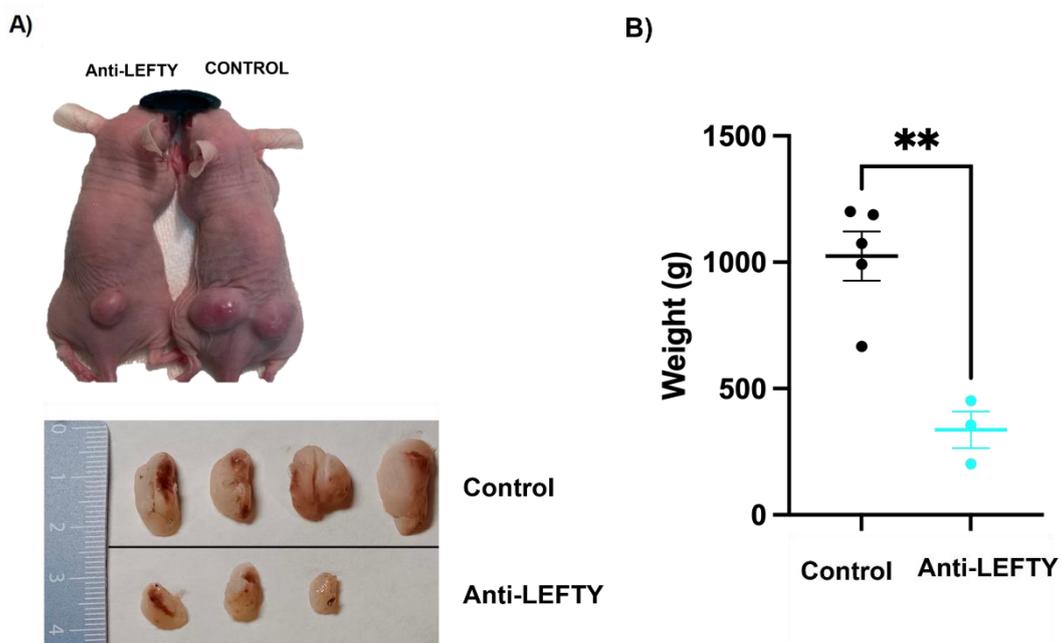


Figura 44: La inhibición Farmacológica de LEFTY reduce el crecimiento tumoral en modelos de experimentación animal. Fotografía de comparación entre el grupo tratado con anticuerpo Anti-LEFTY y el grupo control.

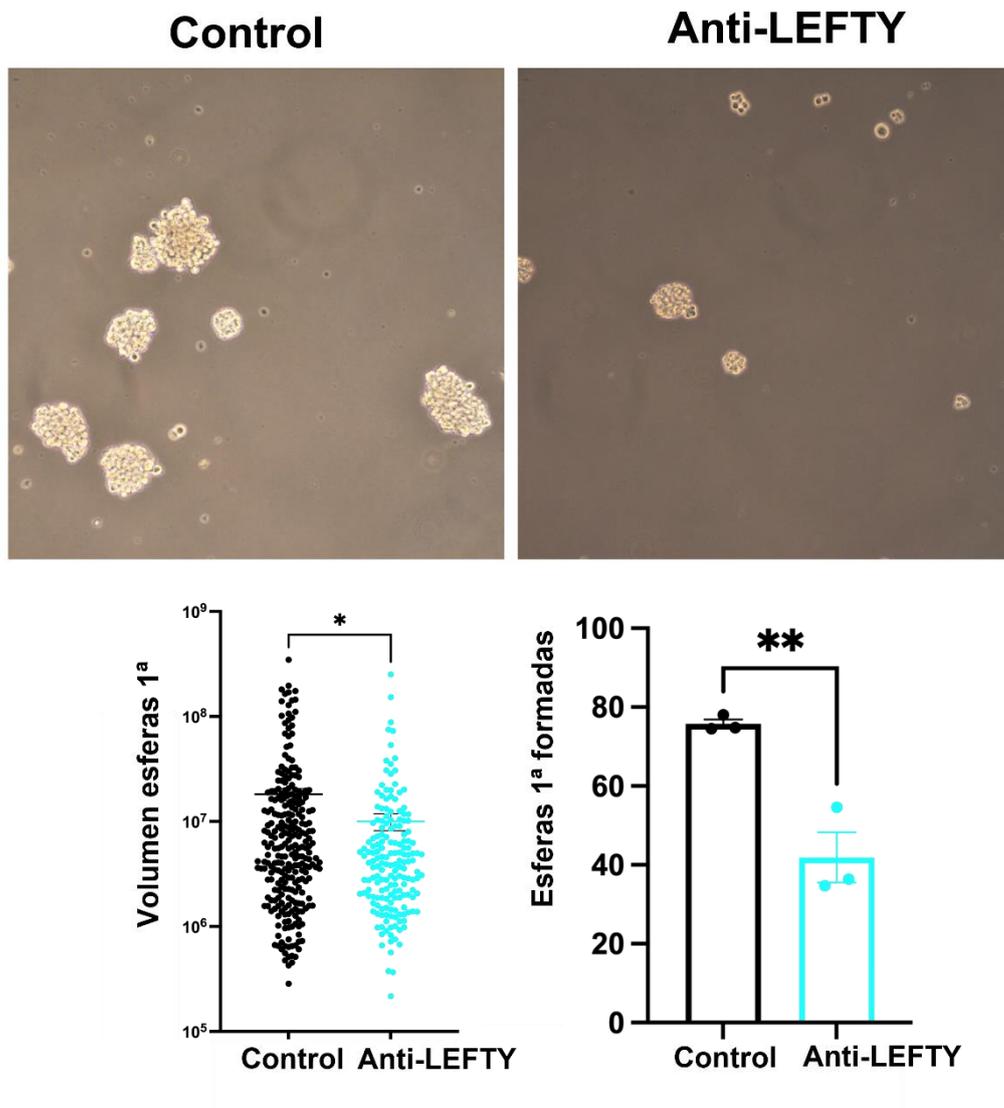


Figura 45: La formación de oncosferas primarias se ve disminuida en las células obtenidas de tumores tratados con anticuerpo Anti-LEFTY.

8.9 EL ANTICUERPO ANTI-LEFTY ACTÚA DE FORMA SINÉRGICA CON LA TEMOZOLOMIDA REDUCIENDO EL VOLUMEN TUMORAL EN MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

A continuación, decidimos llevar a cabo un nuevo ensayo en el cual valoramos cual es el efecto sobre el crecimiento tumoral del inhibidor de LEFTY cuando este se usa de forma combinada con el fármaco Gold standard en el tratamiento del glioblastoma, el agente quimioterápico Temozolomida.

Para ello inoculamos 500.000 células U87 en el tejido subcutáneo de ratones inmunodeprimidos, dejamos crecer los tumores, y cuando estos alcanzaron un volumen entre 25-50 mm³ establecimos 3 grupos; Un grupo control en el que se inyectaría placebo (DMSO), un grupo de tratamiento con Temozolomida que se inyectaría durante 5 días seguidos, y un tercer grupo de ratones que se tratarían con 5 días de Temozolomida seguido de 3 semanas de anticuerpo anti-LEFTY que sería inyectado cada 3 días. Ambos fármacos fueron administrados de forma intratumoral. Realizamos mediciones del volumen tumoral de forma seriada mientras duró el ensayo.

En primer lugar, observamos que los tumores alcanzaron 25-50 mm³ en el día 29 post inyección, momento en el que se pincharon los animales con placebo o con Temozolomida. El seguimiento del tratamiento mostró una clara ralentización del crecimiento tumoral en el grupo tratado con Temozolomida (Fig 46 A). De hecho, a los 2-3 días de acabar el experimento (día 53 del experimento) los controles crecieron de manera continua y significativa hasta alcanzar un volumen medio de 1600³ a los 43 días de experimento, mientras que los tratados con TMZ no superaron los 250 mm³ y los seleccionados para ser tratados también con anticuerpo estaban en 50 mm³. Esta diferencia se mantuvo hasta el final del experimento ya que los controles siguieron creciendo hasta alcanzar un volumen medio de 1500mm³ a los 54 días de experimento, los tratados con TMZ no superaron los 200mm³ (Fig .46 A).

A continuación, se realizó el tratamiento con el anticuerpo anti-LEFTY con 9 inyecciones entre los días 29 y 50 del experimento. En este caso, se comparó la progresión del grupo tratado con Temozolomida frente al tratado con Temozolomida y Anticuerpo Anti-LEFTY. De manera notoria, este último grupo no solo mostró un detenimiento del crecimiento tumoral si no la disminución de tamaño de algunos tumores. De hecho, el tratamiento con LEFTY provocó que el volumen de los tumores pasara de 60 mm³ en el día 4 a 50 mm³ al acabar el experimento el día 54 (Fig. 46 A-B). Por el contrario, los tratados sólo con Temozolomida pasaron de 70 mm³ a 270 mm³.

El peso de los tumores tras el sacrificio confirmó las diferencias entre los 3 grupos. Mientras que los controles tenían un peso medio de 1,25 gramos, los tratados con Temozolomida alcanzaron un peso de 0,2 gramos y los de doble tratamiento 0,09 gramos (Fig. 46C-D)

La tinción inmunohistoquímica mostró una significativa reducción de la expresión de LEFTY 1 en los tumores tratados frente a los controles siendo esta mayor en el grupo de los tratados con TMZ y anti-LEFTY (Fig 46 E)

Estos resultados confirman el potencial anti-tumoral tanto de la Temozolomida como del anticuerpo anti-LEFTY y sugieren que ambos fármacos podrían actuar de forma sinérgica.

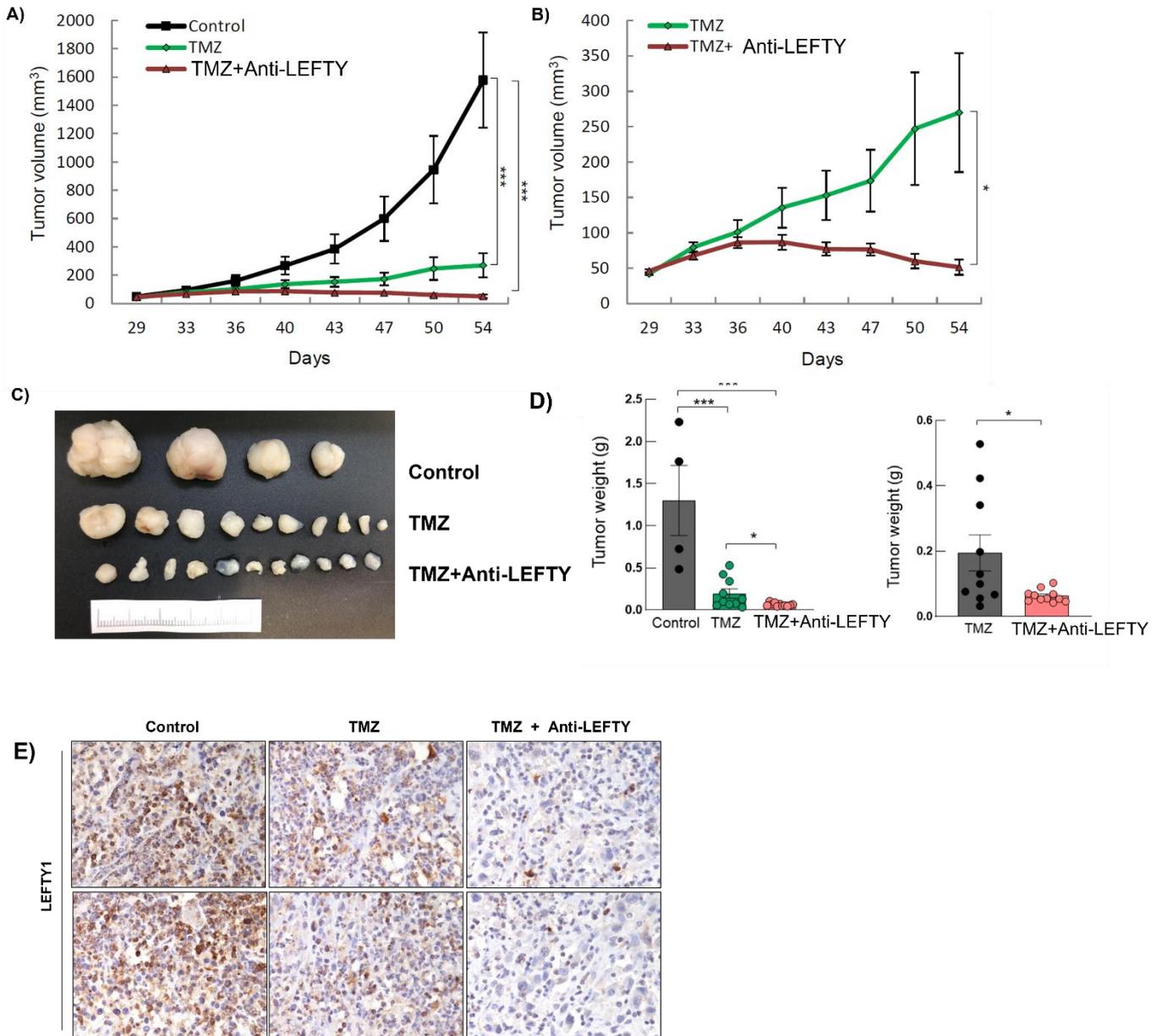


Figura 46: Efecto la modulación de la vía SMAD junto con el efecto alquilante de la TMZ producen una disminución del volumen tumoral in vivo. Se establecieron 3 grupos, un grupo control con 5 animales, otro tratado con TMZ con 15 animales y un tercer grupo tratado con TMZ y anti-LEFTY con 15 animales. Se generó un tumor por animal esta vez. Finalmente obtuvimos 4 tumores en el grupo control, 10 en grupo TMZ y 11 en el grupo TMZ+ anti-LEFTYA. Se realizaron 5 inyecciones diarias de TMZ intraperitoneal a una concentración de 5mg /Kg y 3 inyecciones de anti-LEFTY intratumoral , 3 veces por semana durante 3 semanas: **A)** y **B)** Disminución del volumen tumoral in vivo. **C)** y **D)** Los tumores tratados muestran un peso significativamente menor que los controles **E)** Disminución de la expresión de LEFTY en los tumores tratados.

9 DISCUSIÓN

El Glioblastoma es el tumor cerebral primario más frecuente y más agresivo del SNC (**Thakkar et al., 2014**) Los costes directos e indirectos de este tumor suman unos 200.000 euros por paciente tratado (**Raizer et al., 2015; Undabeitia et al., 2018**). Cada año son diagnosticadas unas 1500 personas en nuestro país, lo que supone un gran coste para nuestra sociedad. A diferencia de los que ha ocurrido con otros tipos de tumores (**Ades et al., 2017; McQuade et al., 2017; S. Yu et al., 2020**), los avances en tratamiento del Glioblastoma son prácticamente inexistentes. Desde la implantación del protocolo STUPP en 2005 y a pesar de las numerosas líneas de investigación abiertas en la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos, ninguno ha mejorado la escasa mediana de supervivencia que logra la Temozolomida (5 % a los 5 años) cuando se combina con la máxima resección quirúrgica y la radioterapia (E. K. Liu et al., 2020; Stupp et al., 2005)

Como hemos comentado previamente, de las docenas de terapias investigadas desde la aparición del protocolo STUPP solamente dos de ellas han sido aprobadas por la FDA e introducidas en las guías terapéuticas para el manejo del Glioblastoma (**Nabors et al., 2020**), pero ninguna de ellas ha conseguido grandes mejoras en la Supervivencia Global de los pacientes con esta terrible enfermedad. (**Gilbert et al., 2014; Stupp et al., 2017**)

Por todo lo relatado anteriormente creemos que la inversión de recursos en la investigación y estudio de nuevas vías de señalización celular involucradas en el proceso biológico del Glioblastoma que permitan desarrollar nuevas moléculas efectivas en su tratamiento está ampliamente justificada. Siguiendo esta línea, hace años que nuestro Centro presenta un proyecto de Medicina Traslacional en el que clínicos y básicos trabajan en equipo construyendo un flujo bidireccional que va de la cabecera del paciente al laboratorio y viceversa. Dentro de este proyecto, comenzamos hace pocos años con la caracterización de una vía de señalización que parece estar desregulada en el Glioblastoma multiforme y la búsqueda de su silenciamiento farmacológico. Dicha vía es la de LEFTY-SMAD. La cual forma parte de una de las más complejas, constantes y pleiotrópicas de todas las vías de señalización celular, la vía de la superfamilia del TGF β . (**Ulloa & Tabibzadeh, 2001**)

Lefty (left-right determination factor) es una proteína sintetizada como precursor de 42kDa que es escindida en dos de 34 y 28 kDa. (**Ulloa et al., 2001**) Estas proteínas se conocen como Lefty 1 (Lefty A) y Lefty 2 (Lefty B) y tienen un papel fundamental en la regulación de la vía de la Superfamilia TGF β , en concreto de la regulación de las vías Nodal y BMP. LEFTY es un inhibidor de la vía TGF β ya que impide la fosforilación de SMAD 2 y SMAD 5 (**Ulloa & Tabibzadeh, 2001; Zabala et al., 2020**), bloquea la unión de NODAL con su receptor transmembrana e inactiva el cofactor Cripto el cual es necesario para el correcto acoplamiento de NODAL al receptor transmembrana (**Ulloa & Tabibzadeh, 2001**) La función principal y más estudiada de LEFTY y SMAD consiste en su papel regulador de diferentes procesos embrionarios (**Shiratori & Hamada, 2014**) Sin embargo, recientes publicaciones relacionan el papel de la señalización SMAD con la carcinogénesis, si bien, no está definido su papel, apareciendo esta vía como promotora del desarrollo tumoral (W. Chen et al., 2019; Guo et al., 2015; X. Xu et al., 2019; Zhu et al., 2021) y como supresora de tumores (**Miura et al., 2019; Zabala et al., 2020**) En el caso concreto de LEFTY, el último trabajo de Zabala et al., establece de manera robusta que su silenciamiento

reduce de manera muy severa la actividad de las células madre tumorales postulándolo como una novedosa y atractiva diana terapéutica.

En concreto, 2 estudios han dado alguna pincelada sobre la expresión y función de LEFTY en glioblastoma. Matsumoto et al analizó la expresión de LEFTY en 95 muestras de regiones perinecroticas de glioblastoma y observó que estaba elevado (**Matsumoto et al., 2020**). En cambio Sun et al observaron que la expresión proteica de LEFTY medido mediante Western Blot en células de Glioma (GBM8401 y células de GBM del China Center for Type Culture Collection) era prácticamente inexistente (**Sun et al., 2014**). En línea con estos resultados observamos que la expresión de LEFTY es heterogenea pero que se encuentra elevada en la mayoría de biopsias humanas establecida en la cohorte de pacientes del Hospital Donostia. Además, completamos el análisis transcripcional de LEFTY-1, LEFTY 2, SMAD 2 y SMAD 5 en diferentes muestras de Glioblastoma del portal Gliovis comparándolas con muestras de tejido no tumoral para ver si se confirmaba un patrón de expresión robusto entre las proteínas citadas anteriormente. Los datos resultantes fueron heterogéneos para los 4 genes consultados. Observamos que los niveles de Expresión de LEFTY 2 estaban elevados, mientras que los de LEFTY 1 se encontraban disminuidos. LEFTY 1 y LEFTY 2 tienen una homología de más del 95% y hay que estudiar en detalle las sondas usadas para poder dar respuesta a la expresión diferencial entre ellas y con lo observado a nivel de proteína. Los niveles de *SMAD2* no parecen estar alterados en 2 de las cohortes mientras que en la tercera están elevados. Por último, la expresión de *SMAD5* está elevado en las muestras de glioblastoma de la TCGA al ser comparados con el tejido cerebral control. Es importante destacar que la activación de SMAD se produce por fosforilación, dato no recogido en estos análisis por lo que debemos ser prudentes con la interpretación de estos resultados. Estos datos heterogéneos son congruentes con los estudios a cerca de la expresión de SMAD que se han realizado en Glioblastoma. Zhang *et al* observaron que la expresión de SMAD 2 estaba disminuida Glioblastoma (**L. Zhang et al., 2006**). Por el contrario Horst *et al* encontraron que la expresión del ARNm de SMAD 2 aumentaba según se incrementaba el grado de malignidad de los gliomas analizados (**Horst et al., 1992**)

A continuación, quisimos obtener información clínica. En concreto, saber si existía alguna asociación entre niveles de expresión de LEFTY y SMAD y la supervivencia de los pacientes con Glioblastoma. A pesar de la existencia de los estudios mirando expresión de LEFTY o SMAD en glioblastoma, no hemos encontrado ninguna publicación que trate sobre este punto. Empleamos las muestras del Portal Gliovis (**Bowman et al., 2017**) y analizamos dos cohortes, una en la que se incluía una mezcla de muestras de Glioblastomas Primarios, Secundarios y Recurrentes, y otra en la que solamente se incluían los recurrentes. Las curvas de Supervivencia de Kaplan Meier muestran que existe una asociación significativa entre niveles de expresión elevados, tanto de LEFTY 1 como de LEFTY 2, y una menor supervivencia de los pacientes, sobre todo en aquellos que eran recurrentes, en los que la mediana de supervivencia era de 2,4 meses menor en aquellas muestras en los que la expresión de LEFTY estaba aumentado. En cuanto SMAD no se aprecia que haya ninguna asociación entre niveles de expresión y supervivencia. Sin embargo, estos datos hacen pensar que probablemente LEFTY pueda tener un papel en la patogénesis del Glioblastoma.

En el año 2005 Wei et al compararon los genes más expresados en líneas de células Stem de ratones y humanos y observaron que LEFTY, entre otros marcadores como SOX 2 , Oct 4 y NODAL, estaba muy expresado en células Stem de ambas especies, este resultado les hizo hipotetizar que LEFTY debe tener un papel importante en el proceso de autorrenovación celular en ambas especies **(Wei et al., 2005)**. Ante la ausencia de información contundente acerca de la expresión y función de LEFTY y SMAD en el Glioblastoma, decidimos ampliar nuestro análisis y llevar a cabo la caracterización de la expresión de ARN-m y proteico en diferentes líneas convencionales de Glioblastoma y en varias líneas celulares de GSCs. Realizamos también ensayos de diferenciación y desdiferenciación celular con las líneas anteriormente comentadas. Empleamos como control de los ensayos una línea de astrocitos sanos. Nuestros resultados muestran que LEFTY está expresado en todas las líneas celulares siendo sus niveles más altos en altos en la población de células madre de glioma derivadas de pacientes. Además, parece que la expresión de LEFTY se modifica en función del estado de diferenciación celular, aumentado cuanto más indiferenciada está la célula y disminuyendo cuando esta se diferencia. Estos datos están en línea con el trabajo de Wei, lo publicado por Zabala et al, 2020 que identifica a LEFTY como un gene relevante para la regulación de las células madre tumorales de mama **(Ulloa et al., 2001; Zabala et al., 2020)**, y por el trabajo de Matsumoto que muestra que niveles elevados de LEFTY promueven la actividad tumoral y la adquisición de características de células madre en Glioblastoma **(Matsumoto et al., 2020)**. Ulloa et al y Zabala teorizan que LEFTY inhibe no solo al complejo SMAD2/SMAD3/SMAD4 sino también a SMAD5 **(Ulloa et al., 2001; Zabala et al., 2020)** lo que es compatible con nuestros resultados que muestran que la expresión de SMAD 2 parece estar disminuida en las líneas tumorales en comparación con las líneas sanas. La expresión de SMAD 5 parece estar aumentada cuando las células se encuentran en una fase más diferenciada. Según los datos anteriores queda claro que las células de Glioblastoma presentan una expresión elevada de LEFTY y parece que es tanto más elevada cuando más indiferenciada sea la población celular.

En el año 2014, Sun et al observaron que la sobreexpresión de LEFTY en células de glioblastoma originaba una reducción de la proliferación y de la invasión y un aumento de la apoptosis de dichas células tumorales **(Sun et al., 2014)**. Sin embargo, seis años más tarde, Matsumoto et al estudiaron LEFTY, también en Glioblastoma y observaron que la hipoxia tisular favorecía la sobreexpresión de dicha proteína y que su sobre-expresión ejercía un efecto promoviendo la supervivencia celular al influir sobre la apoptosis, proliferación y características EMT/CSC, **(Matsumoto et al., 2020)**

En el año 2015 Dong et al realizaron ensayos de silenciamiento de SMAD 2 y SMAD 3 mediante transfección lentiviral de ARN de horquilla corta (Sh ARN) en células U251 de Glioblastoma. Después realizaron ensayos de proliferación y comprobaron que el silenciamiento del complejo SMAD producía un aumento de la proliferación celular en células de Glioblastoma. **(Dong et al., 2015)** Ese mismo año, Yu et al publicaron un artículo en el que mostraba resultados similares a los de Dong al. En primer lugar, analizaron la expresión proteica de SMAD 2 y 3 de muestras de pacientes intervenidos de Glioblastoma y comprobó que la expresión estaba elevada. A continuación, silenciaron SMAD 2 y SMAD 3 en células de Glioblastoma A172 y U87 mediante transfección lentiviral de ARN de horquilla corta (Sh ARN) y realizaron estudios de viabilidad celular comprobando un aumento de la proliferación de las células de Glioblastoma. Esta acción parece estar mediada por p27 **(Y. Yu & Ran, 2015)**. P 27 tiene como función detener el ciclo

celular impidiendo que la célula entre en división. En condiciones normales, TGF β /SMAD aumenta los niveles de P27, esta a su vez inhibe a CDK/CICLINA lo que impide que RB (proteína del retinoblastoma) active a E2F (factores de transcripción de genes necesarios para el paso de célula en Fase G0 a G1/S) **(Donovan & Slingerland, 2000)** Este es un mecanismo mediante el cual la regulación de la vía SMAD puede afectar a la proliferación de las células de Glioblastoma.

Basándonos en lo expuesto anteriormente decidimos llevar a cabo una serie de ensayos en los cuales inhibimos la proteína LEFTY, mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-LEFTY, con el cual tratábamos las células tumorales durante 72h, para así regular la señalización SMAD en tres líneas convencionales de Glioblastoma (U87, U251, A172) y dos líneas de célula madre de Glioma (GNS166, GNS179). La viabilidad celular se vio significativamente disminuida (un 40 % menos) tras la exposición celular durante 72 horas al anticuerpo monoclonal anti-LEFTY. Para conocer qué proceso biológico influía en esta disminución de la viabilidad celular, decidimos cuantificar mediante estudio inmunohistoquímico marcadores de Proliferación (Edu y Fosfohistona 3), Apoptosis (Caspasa 3) y Senescencia (B-Galactosidasa), en células tratadas y en células no tratadas. Observamos que el bloqueo de LEFTY genera un aumento mayor al 50 % en la cuantificación de células positivas para marcadores de Senescencia y Apoptosis y una disminución similar en los marcadores de proliferación.

Como vimos anteriormente, nuestros resultados y los de otros autores indican que LEFTY debe tener un papel importante en el proceso de autorrenovación de ciertas células tumorales. Decidimos comprobar este supuesto testando dicha capacidad de autorrenovación de células de Glioblastoma U87 tras inhibir LEFTY mediante la acción de un anticuerpo anti-LEFTY. Para ello realizamos ensayos de formación de oncoesferas, las cuales disgregábamos, para después medir la capacidad que tenían de volver a formar nuevas esferas (2ry spheres) Los resultados mostraron que las células a las que se les había inhibido LEFTY formaban un 60 % menos de esferas que aquellas a las que no se lo había inhibido. Nuestros resultados parecen indicar que LEFTY tiene un papel relevante en la caracterización Stem de la célula de Glioblastoma y en su capacidad de autorrenovación. En línea con nuestros resultados, Matsumoto et al publicaron un estudio en 2018 en el que observaron que la sobreexpresión de LEFTY en cáncer de Ovario originaba que las células adquiriesen marcadores mesenquimales (Vimentina, N-Cadherina) y de CSC (SOX 2, ALDH y CD 44) y su inhibición mediante Sh ARN hacía que estos disminuyesen, teorizando que LEFTY está relacionado con las características EMT-CSC de estas células tumorales. **(Matsumoto et al., 2018)** El mecanismo mediante el cual LEFTY genera este efecto no lo hemos estudiado a nivel molecular, sin embargo, varios estudios en Glioblastoma indican que la potenciación de la vía BMP inhibe las principales características de las GSC. **(J. Lee et al., 2008; Piccirillo et al., 2006)** Chirasani et al estudiaron el papel de la vía BMP en Glioblastoma y afirman que la exposición de Glioma Stem Cell humanas y a la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) induce la diferenciación de las células madre tumorales, atenúa la expresión de marcadores de tipo madre y reduce la autorrenovación y la capacidad de iniciación tumoral mediante la activación del eje SMAD 1/5/8 y la consecuente regulación negativa del factor de transcripción Olig2. **(Chirasani et al., 2010)**

Hemos de destacar que los estudios que hemos analizado hasta ahora llevaron a cabo silenciamiento genético de LEFTY mediante transfección lentiviral de Sh ARN. Nuestro grupo fue un paso más allá al emplear un anticuerpo monoclonal anti-LEFTY como estrategia farmacológica.

Finalmente decidimos valorar cómo afectaría la inhibición de LEFTY al crecimiento tumoral de Glioblastomas subcutáneos generados en modelos experimentales inmunosuprimidos. Para ello

realizamos dos experimentos. En el primero comparamos el crecimiento tumoral entre un grupo tratado con anticuerpo anti-LEFTY (tratamiento durante diez días mediante inyección subcutánea intratumoral de 10 μ L) y un grupo control. En el segundo comparamos el crecimiento tumoral en un grupo tratado exclusivamente con TMZ durante 5 días, un grupo tratado con TMZ durante 5 días + Anti-LEFTY 3 semanas y un grupo control. Los resultados del primer ensayo mostraron que los tumores en los que LEFTY había sido inhibido, mostraron un crecimiento ralentizado respecto a los controles, de forma que a los 25 días de tratamiento. Al igual que en el estudio in vitro, para esclarecer qué proceso biológico estaba tras esta realentización del crecimiento tumoral, analizamos los marcadores de apoptosis y proliferación mediante técnicas de inmunohistoquímica, en cortes de tumores tratados y no tratados. La expresión del marcador de apoptosis (caspasa 3) fue significativamente más baja en el grupo tratado y el marcador de proliferación Ki 67 significativamente más elevado en el grupo control. El segundo ensayo mostró que el tratamiento conjunto entre TMZ y Anti-LEFTY produce una ralentización del crecimiento tumoral significativamente mayor que en el grupo tratado exclusivamente con TMZ y que, además, este tratamiento conjunto no solo ralentiza si no que disminuye el volumen en algunos tumores sugiriendo que pueda existir un efecto sinérgico entre ambos fármacos.

Según nuestros resultados podemos decir que la inhibición de LEFTY produce una disminución de la capacidad tumorigénica de las células de Glioblastoma in vitro e in vivo debido a un aumento de la Apoptosis y de la Senescencia y una disminución de la Proliferación y de la capacidad de autorrenovación. En nuestro estudio no hemos analizado los mecanismos moleculares mediante los cuales estos procesos se llevan a cabo, sin embargo, estos podrían deberse a la pérdida de influjo inhibitorio de LEFTY sobre vías de la superfamilia TGF β como son BMP y NODAL. En células sanas y durante las primeras etapas del desarrollo neoplásico, la vía TGF β favorece la supresión tumoral (Ikushima & Miyazono, 2010; Yeh et al., 2019) mediante diferentes mecanismos como son: el control de la proliferación celular mediante la activación de proteínas como p15/INK4b, p27Kip1, p21Cip1, con la consecuente detención del ciclo celular (Chu et al., 2008; C.-Y. Li et al., 1995); la activación de la apoptosis al interactuar con proteínas como DAPK (death associated protein kinase), FAS y su efector BIM, SHIP que inhibe la vía de supervivencia celular PI3K-Akt, DAXX (Death Associated protein six) etc (Schuster & Kriegelstein, 2002); y mediante la inactivación de Células Madre de Cáncer a través de la activación de PTEN con la consecuente inactivación de PI3K/AKT (Lombardo et al., 2011) o mediante la downregulación del factor de transcripción Olig 2 (Chirasani et al., 2010). Sin embargo, etapas más avanzadas del cáncer, mutaciones en diferentes niveles de esta vía le aportan un papel protumoral. La sobreexpresión de LEFTY, molécula inhibidora de la vía TGF β , puede ser una de estas alteraciones que promueva ese efecto protumoral. La pleiotropía de la vía hace difícil elucidar qué alteraciones moleculares originan cada uno de los efectos observados en nuestra investigación por lo que futuros estudios más concretos son necesarios para desentrañar los complejos flujos de señales moleculares de esta vía, que participan en la tumorigenicidad del Glioblastoma.

En resumen y para concluir debemos saber que la proteína LEFTY inhibe las proteínas SMAD, las cuales canalizan la señalización de multitud de ligandos de la superfamilia TGF β y ejercen múltiples acciones en la homeostasis celular que tienen un papel protagonista en el desarrollo del cáncer. Según nuestros estudios la expresión de LEFTY está alterada en el Glioblastoma y su regulación mediante la inhibición de LEFTY disminuye las características oncogénicas in vitro e in vivo postulándose como una estrategia terapéutica en el manejo del Glioblastoma.

10 CONCLUSIONES

1. La vía de señalización TGF β es una vía pleiotrópica, implicada en mecanismos homeostáticos celulares como son la proliferación, senescencia, diferenciación y apoptosis celular, que presenta un papel fundamental tanto en la supresión tumoral en etapas iniciales de la enfermedad como en desarrollo tumoral en etapas avanzadas del cáncer.
2. Las proteínas SMAD actúan como moléculas efectoras sobre las cuales convergen las acciones de los diferentes ligandos de la superfamilia TGF B
3. LEFTY es una proteína cuya función es la de inhibir la vía TGF β mediante el bloqueo de las proteínas SMAD
4. LEFTY se encuentra sobre expresado en las células tumorales de Glioblastoma y en las Glioma Stem Cells y podría estar relacionado con una disminución de la supervivencia en pacientes afectados de Glioblastoma.
5. La inhibición del LEFTY produce una disminución de las características oncogénicas de las células de Glioblastoma al disminuir su proliferación y capacidad de autorrenovación y aumentar la senescencia y apoptosis
6. Más estudios son necesarios para entender el mecanismo molecular mediante el cual la inhibición de LEFTY ejerce los efectos observados en las células de Glioblastoma
7. La regulación de la vía LEFTY/SMAD podría convertirse en una estrategia terapéutica prometedora en el manejo del Glioblastoma.

11 BIBLIOGRAFÍA

A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal: J. B. Lippincott Company. 21s. net. (1927). *British Journal of Surgery*, 14(55), 554-555. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800145540>

Abdullah, K. G., Lubelski, D., Nucifora, P. G. P., & Brem, S. (2013). Use of diffusion tensor imaging in glioma resection. *Neurosurgical Focus*, 34(4), E1. <https://doi.org/10.3171/2013.1.FOCUS12412>

Ades, F., Tryfonidis, K., & Zardavas, D. (2017). The past and future of breast cancer treatment—From the papyrus to individualised treatment approaches. *ecancermedicalscience*, 11. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.746>

Aftab, Q., Sin, W.-C., & Naus, C. C. (2015). Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget*, 6(13), 11447-11464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3407>

Ahmed, A. U., Auffinger, B., & Lesniak, M. S. (2013). Understanding glioma stem cells: Rationale, clinical relevance and therapeutic strategies. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 13(5), 545-555. <https://doi.org/10.1586/ern.13.42>

Akhurst, R. J., & Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer—A double-edged sword. *Trends in Cell Biology*, 11(11), S44-51. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02130-4](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02130-4)

Aldaz, P., Otaegi-Ugartemendia, M., Saenz-Antoñanzas, A., Garcia-Puga, M., Moreno-Valladares, M., Flores, J. M., Gerovska, D., Arauzo-Bravo, M. J., Samprón, N., Matheu, A., & Carrasco-Garcia, E. (2020). SOX9 promotes tumor progression through the axis BMI1-p21CIP. *Scientific Reports*, 10(1), 357. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57047-w>

Ali Kahn, A., O'Brien, D. F., Kelly, P., Phillips, J. P., Rawluk, D., Bolger, C., & Pidgeon, C. N. (2003). The anatomical distribution of cerebral gliomas in mobile phone users. *Irish Medical Journal*, 96(8), 240-242.

Alnahhas, I., Alsawas, M., Rayi, A., Palmer, J. D., Raval, R., Ong, S., Giglio, P., Murad, H. M., & Puduvalli, V. (2020). Characterizing benefit from temozolomide in MGMT promoter unmethylated and methylated glioblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncology Advances*, 2(1), vdaa082. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa082>

Álvarez-García, V., Tawil, Y., Wise, H. M., & Leslie, N. R. (2019). Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Seminars in Cancer Biology*, 59, 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.001>

An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q.-W., & Weiss, W. A. (2018). Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37(12), 1561-1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>

Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A. U., & Lesniak, M. S. (2015). The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *15*(7), 741-752. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1051968>

Badur, M. G., Muthusamy, T., Parker, S. J., Ma, S., McBrayer, S. K., Cordes, T., Magana, J. H., Guan, K.-L., & Metallo, C. M. (2018). Oncogenic R132 IDH1 Mutations Limit NADPH for De Novo Lipogenesis through (D)2-Hydroxyglutarate Production in Fibrosarcoma Cells. *Cell Reports*, *25*(4), 1018-1026.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.074>

Bakhshayesh, M., Zaker, F., Hashemi, M., Katebi, M., & Solaimani, M. (2012). TGF- β 1-mediated Apoptosis Associated With SMAD-dependent Mitochondrial Bcl-2 Expression. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, *12*(2), 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2011.12.001>

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>

Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., Shi, Q., McLendon, R. E., Bigner, D. D., & Rich, J. N. (2006). Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Research*, *66*(16), 7843-7848. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1010>

Bianco, C., Adkins, H. B., Wechselberger, C., Seno, M., Normanno, N., De Luca, A., Sun, Y., Khan, N., Kenney, N., Ebert, A., Williams, K. P., Sanicola, M., & Salomon, D. S. (2002). Cripto-1 Activates Nodal- and ALK4-Dependent and -Independent Signaling Pathways in Mammary Epithelial Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(8), 2586-2597. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2586-2597.2002>

Biernat, W., Tohma, Y., Yonekawa, Y., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1997). Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica*, *94*(4), 303-309. <https://doi.org/10.1007/s004010050711>

Blahovcova, E., Richterova, R., Kolarovszki, B., Dobrota, D., Racay, P., & Hatok, J. (2015). Apoptosis-related gene expression in tumor tissue samples obtained from patients diagnosed with glioblastoma multiforme. *International Journal of Molecular Medicine*, *36*(6), 1677-1684. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2369>

Bömers, J. P., Danielsen, M. E., Schulz, M. K., Halle, B., Kristensen, B. W., Sørensen, M. D., Poulsen, F. R., & Pedersen, C. B. (2020). Sodium fluorescein shows high surgeon-reported usability in glioblastoma surgery. *The Surgeon*, *18*(6), 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2020.01.003>

Bowman, R. L., Wang, Q., Carro, A., Verhaak, R. G. W., & Squatrito, M. (2017). GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro-Oncology*, *19*(1), 139-141. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now247>

Boxerman, J. L., Shiroishi, M. S., Ellingson, B. M., & Pope, W. B. (2016). Dynamic Susceptibility Contrast MR Imaging in Glioma. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, *24*(4), 649-670. <https://doi.org/10.1016/j.mric.2016.06.005>

Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J.,

- Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., ... McLendon, R. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, *155*(2), 462-477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., ... TCGA Research Network. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, *155*(2), 462-477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Brennan, J., Lu, C. C., Norris, D. P., Rodriguez, T. A., Beddington, R. S. P., & Robertson, E. J. (2001). Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature*, *411*(6840), 965-969. <https://doi.org/10.1038/35082103>
- Bryant, M. (1984). The heart and circulatory system—A review. *Journal of Nephrology Nursing*, *1*(3), 130, 159.
- Buijs, J. T., Rentsch, C. A., van der Horst, G., van Overveld, P. G. M., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Henriquez, N. V., ten Dijke, P., Borovecki, F., Markwalder, R., Thalmann, G. N., Papapoulos, S. E., Pelger, R. C. M., Vukicevic, S., Cecchini, M. G., Löwik, C. W. G. M., & van der Pluijm, G. (2007). BMP7, a Putative Regulator of Epithelial Homeostasis in the Human Prostate, Is a Potent Inhibitor of Prostate Cancer Bone Metastasis in Vivo. *The American Journal of Pathology*, *171*(3), 1047-1057. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070168>
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., & Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, *45*(10), 1113-1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Carson, K. A., Grossman, S. A., Fisher, J. D., & Shaw, E. G. (2007). Prognostic Factors for Survival in Adult Patients With Recurrent Glioma Enrolled Onto the New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium Phase I and II Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(18), 2601-2606. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.1661>
- Cenciarini, M., Valentino, M., Belia, S., Sforza, L., Rosa, P., Ronchetti, S., D'Adamo, M. C., & Pessia, M. (2019). Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 65. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00065>
- Certo, F., Stummer, W., Farah, J. O., Freyschlag, C., Visocchi, M., Morrone, A., Altieri, R., Toccaceli, G., Peschillo, S., Thomè, C., Jenkinson, M., & Barbagallo, G. (2020). Supramarginal resection of glioblastoma: 5-ALA fluorescence, combined intraoperative strategies and correlation with survival. *Journal of Neurosurgical Sciences*, *63*(6). <https://doi.org/10.23736/S0390-5616.19.04787-8>
- Chapman, C. H., Hara, J. H., Molinaro, A. M., Clarke, J. L., Oberheim Bush, N. A., Taylor, J. W., Butowski, N. A., Chang, S. M., Fogh, S. E., Sneed, P. K., Nakamura, J. L., Raleigh, D. R., & Braunstein, S. E. (2019). Reirradiation of recurrent high-grade glioma and development of prognostic scores for progression and survival. *Neuro-Oncology Practice*, *6*(5), 364-374. <https://doi.org/10.1093/nop/npz017>
- Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., & Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, *59*(8), 1169-1180. <https://doi.org/10.1002/glia.21136>

- Chen, B., Chen, C., Zhang, Y., & Xu, J. (2021). Recent incidence trend of elderly patients with glioblastoma in the United States, 2000-2017. *BMC Cancer*, *21*(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07778-1>
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*, *22*(4), 233-241. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>
- Chen, J.-R., Yao, Y., Xu, H.-Z., & Qin, Z.-Y. (2016). Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. *Medicine*, *95*(9), e2583. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002583>
- Chen, W., Jiang, T., Mao, H., Gao, R., Gao, X., He, Y., Zhang, H., & Chen, Q. (2019). Nodal Promotes the Migration and Invasion of Bladder Cancer Cells via Regulation of Snail. *Journal of Cancer*, *10*(6), 1511-1519. <https://doi.org/10.7150/jca.29205>
- Chirasani, S. R., Sternjak, A., Wend, P., Momma, S., Campos, B., Herrmann, I. M., Graf, D., Mitsiadis, T., Herold-Mende, C., Besser, D., Synowitz, M., Kettenmann, H., & Glass, R. (2010). Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumourigenicity of stem-like glioblastoma cells. *Brain*, *133*(7), 1961-1972. <https://doi.org/10.1093/brain/awq128>
- Chow, K. K., & Gottschalk, S. (2011). Cellular immunotherapy for high-grade glioma. *Immunotherapy*, *3*(3), 423-434. <https://doi.org/10.2217/imt.10.110>
- Chu, I. M., Hengst, L., & Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: Prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *8*(4), 253-267. <https://doi.org/10.1038/nrc2347>
- Chvátal, A., & Verkhratsky, A. (2018). An Early History of Neuroglial Research: Personalities. *Neuroglia*, *1*(1), 245-281. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010016>
- Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P., & Pazdur, R. (2009). FDA drug approval summary: Bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The Oncologist*, *14*(11), 1131-1138. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0121>
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, *130*(2), 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>
- Crespo, I., Vital, A. L., Gonzalez-Tablas, M., Patino, M. del C., Otero, A., Lopes, M. C., de Oliveira, C., Domingues, P., Orfao, A., & Taberner, M. D. (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *The American Journal of Pathology*, *185*(7), 1820-1833. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.023>
- D'Alessio, A., Proietti, G., Sica, G., & Scicchitano, B. M. (2019). Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. *Cancers*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/cancers11040469>
- Das, K. K., & Kumar, R. (2017). Pediatric Glioblastoma. In S. De Vleeschouwer (Ed.), *Glioblastoma*. Codon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469983/>
- Das, S., & Marsden, P. A. (2013). Angiogenesis in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *369*(16), 1561-1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1309402>

De La Fuente, R., Baumann, C., & Viveiros, M. M. (2011). Role of ATRX in chromatin structure and function: Implications for chromosome instability and human disease. *REPRODUCTION*, *142*(2), 221-234. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0380>

Delgado-López, P. D., Riñones-Mena, E., & Corrales-García, E. M. (2018). Treatment-related changes in glioblastoma: A review on the controversies in response assessment criteria and the concepts of true progression, pseudoprogression, pseudoresponse and radionecrosis. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *20*(8), 939-953. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1816-x>

Della Puppa, A., Munari, M., Gardiman, M. P., & Volpin, F. (2019). Combined Fluorescence Using 5-Aminolevulinic Acid and Fluorescein Sodium at Glioblastoma Border: Intraoperative Findings and Histopathologic Data About 3 Newly Diagnosed Consecutive Cases. *World Neurosurgery*, *122*, e856-e863. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.10.163>

Dong, C., Mi, R., Jin, G., Zhou, Y., Zhang, J., & Liu, F. (2015). Identification of the proliferative effect of Smad2 and 3 in the TGF β 2/Smad signaling pathway using RNA interference in a glioma cell line. *Molecular Medicine Reports*, *12*(2), 1824-1828. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3614>

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(2), 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>

Donovan, J., & Slingerland, J. (2000). Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, *2*(2), 116-124. <https://doi.org/10.1186/bcr43>

Dumont, N., Wilson, M. B., Crawford, Y. G., Reynolds, P. A., Sigaroudinia, M., & Tlsty, T. D. (2008). Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(39), 14867-14872. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807146105>

Dunne-Daly, C. F. (1999). Principles of radiotherapy and radiobiology. *Seminars in Oncology Nursing*, *15*(4), 250-259. [https://doi.org/10.1016/S0749-2081\(99\)80054-0](https://doi.org/10.1016/S0749-2081(99)80054-0)

Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M. L., Smirnov, I. V., Sarkar, G., Caron, A. A., Kollmeyer, T. M., Praska, C. E., Chada, A. R., Halder, C., Hansen, H. M., McCoy, L. S., Bracci, P. M., ... Jenkins, R. B. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, *IDH*, and *TERT* Promoter Mutations in Tumors. *New England Journal of Medicine*, *372*(26), 2499-2508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407279>

Egaña, L., Auzmendi-Iriarte, J., Andermatten, J., Villanua, J., Ruiz, I., Elua-Pinin, A., Aldaz, P., Querejeta, A., Sarasqueta, C., Zubia, F., Matheu, A., & Samprón, N. (2020). Methylation of MGMT promoter does not predict response to temozolomide in patients with glioblastoma in Donostia Hospital. *Scientific Reports*, *10*(1), 18445. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75477-9>

Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter

hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research*, 59(4), 793-797.

Ewan, K. B., Henshall-Powell, R. L., Ravani, S. A., Pajares, M. J., Arteaga, C., Wartens, R., Akhurst, R. J., & Barcellos-Hoff, M. H. (2002). Transforming growth factor-beta1 mediates cellular response to DNA damage in situ. *Cancer Research*, 62(20), 5627-5631.

Fåhræus, R., Paramio, J. M., Ball, K. L., Laín, S., & Lane, D. P. (1996). Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide from p16CDKN2/INK4A. *Current Biology*, 6(1), 84-91. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00425-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00425-6)

Fan, H.-C., Chen, C.-M., Chi, C.-S., Tsai, J.-D., Chiang, K.-L., Chang, Y.-K., Lin, S.-Z., & Harn, H.-J. (2019). Targeting Telomerase and ATRX/DAXX Inducing Tumor Senescence and Apoptosis in the Malignant Glioma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010200>

Feng, E., Sui, C., Wang, T., & Sun, G. (2017). Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *European Neurology*, 77(3-4), 201-210. <https://doi.org/10.1159/000455842>

Ferreira, C., Sterling, D., Reynolds, M., Dusenbery, K., Chen, C., & Alaei, P. (2021). First clinical implementation of GammaTile permanent brain implants after FDA clearance. *Brachytherapy*, 20(3), 673-685. <https://doi.org/10.1016/j.brachy.2020.12.005>

Figarella-Branger, D., Appay, R., Metais, A., Tauziède-Espariat, A., Colin, C., Rousseau, A., & Varlet, P. (2021). La classification de l’OMS 2021 des tumeurs du système nerveux central. *Annales de Pathologie*, S0242649821002571. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2021.11.005>

Fisher, J. P., & Adamson, D. C. (2021). Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines*, 9(3), 324. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030324>

Fu, G., & Peng, C. (2011). Nodal enhances the activity of FoxO3a and its synergistic interaction with Smads to regulate cyclin G2 transcription in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 30(37), 3953-3966. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.127>

Fusco, M. J., West, H. (Jack), & Walko, C. M. (2021). Tumor Mutation Burden and Cancer Treatment. *JAMA Oncology*, 7(2), 316. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.6371>

Garrett, M. D., Yanagihara, T. K., Yeh, R., McKhann, G. M., Sisti, M. B., Bruce, J. N., Sheth, S. A., Sonabend, A. M., & Wang, T. J. C. (2017). Monitoring Radiation Treatment Effects in Glioblastoma: FLAIR Volume as Significant Predictor of Survival. *Tomography*, 3(3), 131-137. <https://doi.org/10.18383/j.tom.2017.00009>

Garros-Regulez, L., Garcia, I., Carrasco-Garcia, E., Lantero, A., Aldaz, P., Moreno-Cugnon, L., Arrizabalaga, O., Undabeitia, J., Torres-Bayona, S., Villanua, J., Ruiz, I., Egaña, L., Sampron, N., & Matheu, A. (2016). Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00222>

Gerard, I. J., Kersten-Oertel, M., Petrecca, K., Sirhan, D., Hall, J. A., & Collins, D. L. (2017). Brain shift in neuronavigation of brain tumors: A review. *Medical Image Analysis*, 35, 403-420. <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.08.007>

Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P. D., Jaeckle, K. A., Schiff, D.,

- Stieber, V. W., Brachman, D. G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I. W., Sulman, E. P., ... Mehta, M. P. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 370(8), 699-708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308573>
- Gimple, R. C., Bhargava, S., Dixit, D., & Rich, J. N. (2019). Glioblastoma stem cells: Lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & Development*, 33(11-12), 591-609. <https://doi.org/10.1101/gad.324301.119>
- Giroux Leprieur, E., Dumenil, C., Julie, C., Giraud, V., Dumoulin, J., Labrune, S., & Chinet, T. (2017). Immunotherapy revolutionises non-small-cell lung cancer therapy: Results, perspectives and new challenges. *European Journal of Cancer*, 78, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.12.041>
- Glantz, M. J., Cole, B. F., Forsyth, P. A., Recht, L. D., Wen, P. Y., Chamberlain, M. C., Grossman, S. A., & Cairncross, J. G. (2000). Practice parameter: Anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors [RETIRED]: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 54(10), 1886-1893. <https://doi.org/10.1212/WNL.54.10.1886>
- Glick, A. B., Weinberg, W. C., Wu, I. H., Quan, W., & Yuspa, S. H. (1996). Transforming growth factor beta 1 suppresses genomic instability independent of a G1 arrest, p53, and Rb. *Cancer Research*, 56(16), 3645-3650.
- Goff, S. L., Morgan, R. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Robbins, P. F., Restifo, N. P., Feldman, S. A., Lu, Y.-C., Lu, L., Zheng, Z., Xi, L., Epstein, M., McIntyre, L. S., Malekzadeh, P., Raffeld, M., Fine, H. A., & Rosenberg, S. A. (2019). Pilot Trial of Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor–transduced T Cells Targeting EGFRvIII in Patients With Glioblastoma. *Journal of Immunotherapy*, 42(4), 126-135. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000260>
- Grossman, R., Shimony, N., Shir, D., Gonen, T., Sitt, R., Kimchi, T. J., Harosh, C. B., & Ram, Z. (2017). Dynamics of FLAIR Volume Changes in Glioblastoma and Prediction of Survival. *Annals of Surgical Oncology*, 24(3), 794-800. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5635-z>
- Guerrero, P. A., & McCarty, J. H. (2017). TGF- β Activation and Signaling in Angiogenesis. En D. Simionescu & A. Simionescu (Eds.), *Physiologic and Pathologic Angiogenesis—Signaling Mechanisms and Targeted Therapy*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66405>
- Guo, Q., Ning, F., Fang, R., Wang, H.-S., Zhang, G., Quan, M.-Y., Cai, S.-H., & Du, J. (2015). Endogenous Nodal promotes melanoma undergoing epithelial-mesenchymal transition via Snail and Slug in vitro and in vivo. *American Journal of Cancer Research*, 5(6), 2098-2112.
- Haase, S., Garcia-Fabiani, M. B., Carney, S., Altshuler, D., Núñez, F. J., Méndez, F. M., Núñez, F., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2018). Mutant ATRX: Uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(7), 599-613. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1487953>
- Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H., & Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience*, 19(1), 20-27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>
- Han, S. J., Yang, I., Tihan, T., Prados, M. D., & Parsa, A. T. (2010). Primary gliosarcoma: Key clinical and pathologic distinctions from glioblastoma with implications as a unique oncologic entity. *Journal of Neuro-Oncology*, 96(3), 313-320. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9973-6>

- Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., Larion, M., Gilbert, M. R., & Yang, C. (2020). IDH mutation in glioma: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British Journal of Cancer*, *122*(11), 1580-1589. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0814-x>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. (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>
- Hassn Mesrati, M., Behrooz, A. B., Y. Abuhamad, A., & Syahir, A. (2020). Understanding Glioblastoma Biomarkers: Knocking a Mountain with a Hammer. *Cells*, *9*(5), 1236. <https://doi.org/10.3390/cells9051236>
- He, X., & Xu, C. (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, *30*(8), 660-669. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>
- Hegarty, S. V., O’Keeffe, G. W., & Sullivan, A. M. (2013). BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system. *Progress in Neurobiology*, *109*, 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.07.002>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *352*(10), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hewer, E., Prebil, N., Berezowska, S., Gutt-Will, M., Schucht, P., Dettmer, M. S., & Vassella, E. (2017). Diagnostic implications of TERT promoter mutation status in diffuse gliomas in a routine clinical setting. *Virchows Archiv*, *471*(5), 641-649. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2216-x>
- Holmen, S. L., & Williams, B. O. (2005). Essential Role for Ras Signaling in Glioblastoma Maintenance. *Cancer Research*, *65*(18), 8250-8255. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1173>
- Horst, H.-A., Scheithauer, B. W., Kelly, P. J., & Kovach, J. S. (1992). Distribution of transforming growth factor- β 1 in human astrocytomas. *Human Pathology*, *23*(11), 1284-1288. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90297-G](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90297-G)
- Hug, N., & Lingner, J. (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma*, *115*(6), 413-425. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0067-3>
- Hur, H., Jung, S., Jung, T.-Y., & Kim, I.-Y. (2008). Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, *43*(4), 194-197. <https://doi.org/10.3340/jkns.2008.43.4.194>
- Ikushima, H., & Miyazono, K. (2010). TGF β signalling: A complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, *10*(6), 415-424. <https://doi.org/10.1038/nrc2853>

- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., & Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF- β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. *Cell Stem Cell*, 5(5), 504-514. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.08.018>
- Irfan Maqsood, M., Matin, M. M., Bahrami, A. R., & Ghasroldasht, M. M. (2013). Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment: Immortality of cell lines. *Cell Biology International*, 37(10), 1038-1045. <https://doi.org/10.1002/cbin.10137>
- Iwadate, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology Letters*, 11(3), 1615-1620. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>
- Izsak, J., Vizlin-Hodzic, D., Iljin, M., Strandberg, J., Jadasz, J., Olsson Bontell, T., Theiss, S., Hanse, E., Ågren, H., Funari, K., & Illes, S. (2020). TGF- β 1 Suppresses Proliferation and Induces Differentiation in Human iPSC Neural in vitro Models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 571332. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.571332>
- Jang, C.-W., Chen, C.-H., Chen, C.-C., Chen, J., Su, Y.-H., & Chen, R.-H. (2002). TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nature Cell Biology*, 4(1), 51-58. <https://doi.org/10.1038/ncb731>
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1861-1867. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Karsy, M., Gelbman, M., Shah, P., Balumbu, O., Moy, F., & Arslan, E. (2012). Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: Review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathologica*, 4, 301-321. <https://doi.org/10.5114/fn.2012.32361>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2010). Bevacizumab. *The Oncologist*, 15(8), 819-825. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0317>
- Knecht, A. K., & Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: A multigene process. *Nature Reviews. Genetics*, 3(6), 453-461. <https://doi.org/10.1038/nrg819>
- Knobbe, C. B., Merlo, A., & Reifenberger, G. (2002). Pten signaling in gliomas. *Neuro-Oncology*, 4(3), 196-211.
- Kostaras, X., Cusano, F., Kline, G. A., Roa, W., Easaw, J., & CNS Tumour Team the Alberta Provincial. (2014). Use of Dexamethasone in Patients with High-Grade Glioma: A Clinical Practice Guideline. *Current Oncology*, 21(3), 493-503. <https://doi.org/10.3747/co.21.1769>
- Kozak, K. R., & Moody, J. S. (2009). Giant cell glioblastoma: A glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro-Oncology*, 11(6), 833-841. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-123>
- La-Beck, N. M., Jean, G. W., Huynh, C., Alzghari, S. K., & Lowe, D. B. (2015). Immune Checkpoint Inhibitors: New Insights and Current Place in Cancer Therapy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 963-976. <https://doi.org/10.1002/phar.1643>

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645-648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Larjavaara, S., Mäntylä, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jääskeläinen, J., & Auvinen, A. (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncology*, *9*(3), 319-325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>
- Lassman, A. B., Rossi, M. R., Razier, J. R., Abrey, L. E., Lieberman, F. S., Grefe, C. N., Lamborn, K., Pao, W., Shih, A. H., Kuhn, J. G., Wilson, R., Nowak, N. J., Cowell, J. K., DeAngelis, L. M., Wen, P., Gilbert, M. R., Chang, S., Yung, W. A., Prados, M., & Holland, E. C. (2005). Molecular Study of Malignant Gliomas Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: Tissue Analysis from North American Brain Tumor Consortium Trials 01-03 and 00-01. *Clinical Cancer Research*, *11*(21), 7841-7850. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0421>
- Lawrie, T. A., McBain, C., Rogozińska, E., Kernohan, A., Robinson, T., Lawrie, I., & Jefferies, S. (2020). Treatment options for recurrent glioblastoma: A network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013579>
- Lee, C.-C., Jan, H.-J., Lai, J.-H., Ma, H.-I., Hueng, D.-Y., Gladys Lee, Y.-C., Cheng, Y.-Y., Liu, L.-W., Wei, H.-W., & Lee, H.-M. (2010). Nodal promotes growth and invasion in human gliomas. *Oncogene*, *29*(21), 3110-3123. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.55>
- Lee, J., Son, M. J., Woolard, K., Donin, N. M., Li, A., Cheng, C. H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., Kim, M., Totonchy, M., Cusack, T., Ene, C., Ma, H., Su, Q., Zenklusen, J. C., Zhang, W., Maric, D., & Fine, H. A. (2008). Epigenetic-Mediated Dysfunction of the Bone Morphogenetic Protein Pathway Inhibits Differentiation of Glioblastoma-Initiating Cells. *Cancer Cell*, *13*(1), 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.005>
- Lee, J. T., & Herlyn, M. (2006). Embryogenesis meets tumorigenesis. *Nature Medicine*, *12*(8), 882-884. <https://doi.org/10.1038/nm0806-882>
- Lee, S. H., Jo, S. H., Lee, S. M., Koh, H. J., Song, H., Park, J. W., Lee, W. H., & Huh, T. L. (2004). Role of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays. *International Journal of Radiation Biology*, *80*(9), 635-642. <https://doi.org/10.1080/09553000400007680>
- Lesueur, P., Lequesne, J., Grellard, J.-M., Dugué, A., Coquan, E., Brachet, P.-E., Geffrelot, 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>
- Li, C.-Y., Suardet, L., & Little, J. B. (1995). Potential Role of WAF1/Cip1/p21 as a Mediator of TGF- β Cytoinhibitory Effect. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(10), 4971-4974. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.4971>
- Li, Y. M., Suki, D., Hess, K., & Sawaya, R. (2016). The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *Journal of Neurosurgery*, *124*(4), 977-988. <https://doi.org/10.3171/2015.5.JNS142087>

- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Little, R. B., & Norris, D. P. (2021). Right, left and cilia: How asymmetry is established. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 110, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.06.003>
- Liu, E. K., Sulman, E. P., Wen, P. Y., & Kurz, S. C. (2020). Novel Therapies for Glioblastoma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 20(7), 19. <https://doi.org/10.1007/s11910-020-01042-6>
- Liu, S., Chen, S., & Zeng, J. (2017). TGF- β signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7970>
- Lombardo, Y., Scopelliti, A., Cammareri, P., Todaro, M., Iovino, F., Ricci-Vitiani, L., Gulotta, G., Dieli, F., de Maria, R., & Stassi, G. (2011). Bone Morphogenetic Protein 4 Induces Differentiation of Colorectal Cancer Stem Cells and Increases Their Response to Chemotherapy in Mice. *Gastroenterology*, 140(1), 297-309.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.005>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2012). Pushing the Limits of Glioma Resection Using Electrophysiologic Brain Mapping. *Journal of Clinical Oncology*, 30(20), 2437-2440. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.6959>
- Luedi, M. M., Singh, S. K., Mosley, J. C., Hassan, I. S. A., Hatami, M., Gumin, J., Andereggen, L., Sulman, E. P., Lang, F. F., Stueber, F., Fuller, G. N., Colen, R. R., & Zinn, P. O. (2018). Dexamethasone-mediated oncogenicity in vitro and in an animal model of glioblastoma. *Journal of Neurosurgery*, 129(6), 1446-1455. <https://doi.org/10.3171/2017.7.JNS17668>
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Ma, Q., Long, W., Xing, C., Chu, J., Luo, M., Wang, H. Y., Liu, Q., & Wang, R.-F. (2018). Cancer Stem Cells and Immunosuppressive Microenvironment in Glioma. *Frontiers in Immunology*, 9, 2924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02924>
- Macdonald, D. R., Cascino, T. L., Schold, S. C., & Cairncross, J. G. (1990). Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 8(7), 1277-1280. <https://doi.org/10.1200/JCO.1990.8.7.1277>
- Maire, C. L., & Ligon, K. L. (2014). Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro-Oncology*, 16 Suppl 8, viii1-6. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou294>

- Malik, M. T., Kazmi, S. J., & Turner, S. (2017). Diagnostic challenges in primary brain stem glioblastoma multiforme; a case report. *Interdisciplinary Neurosurgery*, *10*, 104-107. <https://doi.org/10.1016/j.inat.2017.07.010>
- Matsumoto, T., Chino, H., Akiya, M., Hashimura, M., Yokoi, A., Tochimoto, M., Nakagawa, M., Jiang, Z., & Saegusa, M. (2020). Requirements of LEFTY and Nodal overexpression for tumor cell survival under hypoxia in glioblastoma. *Molecular Carcinogenesis*, *59*(12), 1409-1419. <https://doi.org/10.1002/mc.23265>
- Matsumoto, T., Yokoi, A., Hashimura, M., Oguri, Y., Akiya, M., & Saegusa, M. (2018). TGF- β -mediated LEFTY/Akt/GSK-3 β /Snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, *57*(8), 957-967. <https://doi.org/10.1002/mc.22816>
- Mayer, R., & Sminia, P. (2008). Reirradiation Tolerance of the Human Brain. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, *70*(5), 1350-1360. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.08.015>
- McQuade, R. M., Stojanovska, V., Bornstein, J. C., & Nurgali, K. (2017). Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(15). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170111152436>
- Melkonian, E. A., & Schury, M. P. (2021). Biochemistry, Anaerobic Glycolysis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546695/>
- Migliorini, D., Dietrich, P.-Y., Stupp, R., Linette, G. P., Posey, A. D., & June, C. H. (2018). CAR T-Cell Therapies in Glioblastoma: A First Look. *Clinical Cancer Research*, *24*(3), 535-540. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2871>
- Miura, R., Yokoi, A., Matsumoto, T., Oguri, Y., Hashimura, M., Tochimoto, M., Kajita, S., & Saegusa, M. (2019). Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in ovarian endometriosis-clear cell carcinoma lesions. *BMC Cancer*, *19*(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5539-y>
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., & Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling: Two signalling pathways of the TGF- β superfamily. *Genes to Cells*, *7*(12), 1191-1204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00599.x>
- Munster, P., Mita, M., Mahipal, A., Nemunaitis, J., Massard, C., Mikkelsen, T., Cruz, C., Paz-Ares, L., Hidalgo, M., Rathkopf, D., Blumenschein, G., Smith, D. C., Eichhorst, B., Cloughesy, T., Filvaroff, E. H., Li, S., Raymon, H., de Haan, H., Hege, K., & Bendell, J. C. (2019). First-In-Human Phase I Study Of A Dual mTOR Kinase And DNA-PK Inhibitor (CC-115) In Advanced Malignancy. *Cancer Management and Research*, *11*, 10463-10476. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S208720>
- Nabors, L. B., Portnow, J., Ahluwalia, M., Baehring, J., Brem, H., Brem, S., Butowski, N., Campian, J. L., Clark, S. W., Fabiano, A. J., Forsyth, P., Hattangadi-Gluth, J., Holdhoff, M., Horbinski, C., Junck, L., Kaley, T., Kumthekar, P., Loeffler, J. S., Mrugala, M. M., ... Darlow, S. D. (2020). Central Nervous System Cancers, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *18*(11), 1537-1570. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0052>
- Nagaishi, M., Paulus, W., Brokinkel, B., Vital, A., Tanaka, Y., Nakazato, Y., Giangaspero, F., & Ohgaki, H. (2012). Transcriptional Factors for Epithelial-Mesenchymal Transition Are

- Associated with Mesenchymal Differentiation in Gliosarcoma: EMT in Gliosarcomas. *Brain Pathology*, 22(5), 670-676. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00571.x>
- Naifeh, J., Dimri, M., & Varacallo, M. (2021). Biochemistry, Aerobic Glycolysis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470170/>
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H.-J. S., Furnari, F. B., & Cavenee, W. K. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Research*, 62(22), 6764-6769.
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 9874592, Berubicin*. (2021). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Berubicin>.
- National Institute for Health and Care Excellence (Great Britain). (2018). *Brain tumours (primary) and brain metastases in adults*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544711/>
- Nelson, S. J., & Cha, S. (2003). Imaging Glioblastoma Multiforme: *The Cancer Journal*, 9(2), 134-145. <https://doi.org/10.1097/00130404-200303000-00009>
- Niyazi, M., Siefert, A., Schwarz, S. B., Ganswindt, U., Kreth, F.-W., Tonn, J.-C., & Belka, C. (2011). Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiotherapy and Oncology*, 98(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.11.006>
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), 6002-6007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0715>
- Nomura, M., & Li, E. (1998). Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature*, 393(6687), 786-790. <https://doi.org/10.1038/31693>
- Ochs, K., & Kaina, B. (2000). Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Research*, 60(20), 5815-5824.
- Ohgaki, H. (2009). Epidemiology of brain tumors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 472, 323-342. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_14
- Olympios, N., Gilard, V., Marguet, F., Clatot, F., Di Fiore, F., & Fontanilles, M. (2021). TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. *Cancers*, 13(5), 1147. <https://doi.org/10.3390/cancers13051147>
- O'Rourke, D. M., Nasrallah, M. P., Desai, A., Melenhorst, J. J., Mansfield, K., Morrisette, J. J. D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S. F., Navenot, J.-M., Zheng, Z., Levine, B. L., Okada, H., June, C. H., ... Maus, M. V. (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science Translational Medicine*, 9(399), eaaa0984. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0984>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N. E., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15 Suppl 2, ii1-56. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not151>

- O'Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(3), 171-181. <https://doi.org/10.1038/nrm2848>
- Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *282*(5), C947-C970. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>
- Park, C.-K., Kim, J. H., Nam, D.-H., Kim, C.-Y., Chung, S.-B., Kim, Y.-H., Seol, H. J., Kim, T. M., Choi, S. H., Lee, S.-H., Heo, D. S., Kim, I. H., Kim, D. G., & Jung, H.-W. (2013). A practical scoring system to determine whether to proceed with surgical resection in recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *15*(8), 1096-1101. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not069>
- Pasqualetti, F., Montemurro, N., Desideri, I., Loi, M., Giannini, N., Gadducci, G., Malfatti, G., Cantarella, M., Gonnelli, A., Montrone, S., Visani, L., Scatena, C., Naccarato, A. G., Perrini, P., Gambacciani, C., Santonocito, O., Morganti, R., & Paiar, F. (2021). Impact of recurrence pattern in patients undergoing a second surgery for recurrent glioblastoma. *Acta Neurologica Belgica*. <https://doi.org/10.1007/s13760-021-01765-4>
- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Louis, D. N., Rozenblatt-Rosen, O., Suvà, M. L., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)*, *344*(6190), 1396-1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
- Pegg, A. E. (1990). Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Research*, *50*(19), 6119-6129.
- Pegg, A. E., & Byers, T. L. (1992). Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *6*(6), 2302-2310. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1544541>
- Pekmezci, M., Rice, T., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Hansen, H., Sicotte, H., Kollmeyer, T. M., McCoy, L. S., Sarkar, G., Perry, A., Giannini, C., Tihan, T., Berger, M. S., Wiemels, J. L., Bracci, P. M., Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Clarke, J., ... Wrensch, M. R. (2017). Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: Additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathologica*, *133*(6), 1001-1016. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1690-1>
- Piccirillo, S. G. M., Reynolds, B. A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., & Vescovi, A. L. (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, *444*(7120), 761-765. <https://doi.org/10.1038/nature05349>
- Platten, M., Wick, W., Wild-Bode, C., Aulwurm, S., Dichgans, J., & Weller, M. (2000). Transforming Growth Factors β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 Promote Glioma Cell Migration via Up-Regulation of α V β 3 Integrin Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *268*(2), 607-611. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2176>
- Raizer, J. J., Fitzner, K. A., Jacobs, D. I., Bennett, C. L., Liebling, D. B., Luu, T. H., Trifilio, S. M., Grimm, S. A., Fisher, M. J., Haleem, M. S., Ray, P. S., McKoy, J. M., DeBoer, R., Tulas, K.-M. E.,

- Deeb, M., & McKoy, J. M. (2015). Economics of Malignant Gliomas: A Critical Review. *Journal of Oncology Practice*, 11(1), e59-e65. <https://doi.org/10.1200/JOP.2012.000560>
- Ralhan, R., & Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), 1061-1075. <https://doi.org/10.1517/13543776.17.9.1061>
- Rao, J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. *Nature Reviews Cancer*, 3(7), 489-501. <https://doi.org/10.1038/nrc1121>
- Ready, N. E., Ott, P. A., Hellmann, M. D., Zugazagoitia, J., Hann, C. L., de Braud, F., Antonia, S. J., Ascierto, P. A., Moreno, V., Atmaca, A., Salvagni, S., Taylor, M., Amin, A., Camidge, D. R., Horn, L., Calvo, E., Li, A., Lin, W. H., Callahan, M. K., & Spigel, D. R. (2020). Nivolumab Monotherapy and Nivolumab Plus Ipilimumab in Recurrent Small Cell Lung Cancer: Results From the CheckMate 032 Randomized Cohort. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(3), 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.10.004>
- Reardon, D. A., Brandes, A. A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., Baehring, J., Ahluwalia, M. S., Roth, P., Bähr, O., Phuphanich, S., Sepulveda, J. M., De Souza, P., Sahebjam, S., Carleton, M., Tatsuoka, K., Taitt, C., Zwirter, R., Sampson, J., & Weller, M. (2020). Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 6(7), 1003-1010. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.1024>
- Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., O'Rourke, D. M., Tran, D. D., Fink, K. L., Nabors, L. B., Li, G., Bota, D. A., Lukas, R. V., Ashby, L. S., Duic, J. P., Mrugala, M. M., Cruickshank, S., Vitale, L., He, Y., Green, J. A., Yellin, M. J., Turner, C. D., ... ReACT trial investigators. (2020). Rindopepimut with Bevacizumab for Patients with Relapsed EGFRVIII-Expressing Glioblastoma (ReACT): Results of a Double-Blind Randomized Phase II Trial. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(7), 1586-1594. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1140>
- Rock, K., McArdle, O., Forde, P., Dunne, M., Fitzpatrick, D., O'Neill, B., & Faul, C. (2012). A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme--the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: Has a more radical approach improved survival? *The British Journal of Radiology*, 85(1017), e729-733. <https://doi.org/10.1259/bjr/83796755>
- Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S. J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y., & Collis, S. J. (2021). Tumour treating fields therapy for glioblastoma: Current advances and future directions. *British Journal of Cancer*, 124(4), 697-709. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01136-5>
- Rossi, J., Giaccherini, L., Cavallieri, F., Napoli, M., Moratti, C., Froio, E., Serra, S., Fraternali, A., Ghadirpour, R., Cozzi, S., Ciammella, P., Iaccarino, C., Pascarella, R., Valzania, F., & Pisanello, A. (2020). Extracranial metastases in secondary glioblastoma multiforme: A case report. *BMC Neurology*, 20(1), 382. <https://doi.org/10.1186/s12883-020-01959-y>
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Corbí, A., Attisano, L., & Bernabéu, C. (2001). Synergistic Cooperation between Hypoxia and Transforming Growth Factor- β Pathways on Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38527-38535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104536200>

- Schier, A. F. (2003). Nodal Signaling in Vertebrate Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1), 589-621. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.041603.094522>
- Schuster, N., & Kriegstein, K. (2002). Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 307(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00441-001-0479-6>
- Schweickert, A., Ott, T., Kurz, S., Tingler, M., Maerker, M., Fuhl, F., & Blum, M. (2017). Vertebrate Left-Right Asymmetry: What Can Nodal Cascade Gene Expression Patterns Tell Us? *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 5(1), E1. <https://doi.org/10.3390/jcdd5010001>
- Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S. A., & Massagué, J. (2004). Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell*, 117(2), 211-223. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00298-3)
- Sherr, C. J. (1998). Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes & Development*, 12(19), 2984-2991. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2984>
- Shimizu, H., Kumabe, T., Tominaga, T., Kayama, T., Hara, K., Ono, Y., Sato, K., Arai, N., Fujiwara, S., & Yoshimoto, T. (1996). Noninvasive evaluation of malignancy of brain tumors with proton MR spectroscopy. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 17(4), 737-747.
- Shiratori, H., & Hamada, H. (2014). TGF β signaling in establishing left-right asymmetry. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 32, 80-84. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.029>
- Shukla, G., Alexander, G. S., Bakas, S., Nikam, R., Talekar, K., Palmer, J. D., & Shi, W. (2017). Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: A review. *Chinese Clinical Oncology*, 6(4), 40-40. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.28>
- Singh, H., Maurya, V., & Gill, S. (2002). Computerised Tomography Features in Gliomas. *Medical Journal Armed Forces India*, 58(3), 221-225. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(02\)80134-4](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(02)80134-4)
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821-5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396-401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Smart, D. (2017). Radiation Toxicity in the Central Nervous System: Mechanisms and Strategies for Injury Reduction. *Seminars in Radiation Oncology*, 27(4), 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.006>
- Stark, A. M., van de Bergh, J., Hedderich, J., Mehdorn, H. M., & Nabavi, A. (2012). Glioblastoma: Clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 114(7), 840-845. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.01.026>
- Steinbach, J. P., & Weller, M. (2004). Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Journal of Neuro-Oncology*, 70(2), 245-254. <https://doi.org/10.1007/s11060-004-2753-4>

- Stockhausen, M.-T., Kristoffersen, K., & Poulsen, H. S. (2010). The functional role of Notch signaling in human gliomas. *Neuro-Oncology*, *12*(2), 199-211. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop022>
- Strobel, H., Baisch, T., Fitzel, R., Schilberg, K., Siegelin, M. D., Karpel-Massler, G., Debatin, K.-M., & Westhoff, M.-A. (2019). Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines*, *7*(3), 69. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030069>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., 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., ... 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>
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meo, F., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., ... Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *318*(23), 2306-2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- Stupp, R., Tonn, J.-C., Brada, M., & Pentheroudakis, G. (2010). High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *21*, v190-v193. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq187>
- Sugimoto, K., Ideguchi, M., Kimura, T., Kajiwara, K., Imoto, H., Sadahiro, H., Ishii, A., Kawano, H., Ikeda, E., & Suzuki, M. (2016). Epithelioid/rhabdoid glioblastoma: A highly aggressive subtype of glioblastoma. *Brain Tumor Pathology*, *33*(2), 137-146. <https://doi.org/10.1007/s10014-015-0243-3>
- Sun, G., Shi, L., Li, M., Jiang, N., Fu, L., & Guo, J. (2014). Lefty inhibits glioma growth by suppressing Nodal-activated Smad and ERK1/2 pathways. *Journal of the Neurological Sciences*, *347*(1-2), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.09.034>
- Szczepanek, D., Marchel, A., Moskała, M., Krupa, M., Kunert, P., & Trojanowski, T. (2013). Efficacy of concomitant and adjuvant temozolomide in glioblastoma treatment. A multicentre randomized study. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, *47*(2), 101-108. <https://doi.org/10.5114/ninp.2013.34398>
- Tanaka, K., Babic, I., Nathanson, D., Akhavan, D., Guo, D., Gini, B., Dang, J., Zhu, S., Yang, H., De Jesus, J., Amzajerdi, A. N., Zhang, Y., Dibble, C. C., Dan, H., Rinkenbaugh, A., Yong, W. H., Vinters, H. V., Gera, J. F., Cavenee, W. K., ... Mischel, P. S. (2011). Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-κB pathway that promotes chemotherapy resistance. *Cancer Discovery*, *1*(6), 524-538. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0124>
- Tang, P., Steck, P. A., & Yung, W. K. (1997). The autocrine loop of TGF-α/EGFR and brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, *35*(3), 303-314. <https://doi.org/10.1023/a:1005824802617>
- Teng, M. W. L., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, *84*(4), 988-993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>

Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(10), 1985-1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>

The Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061-1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>

Tien, A.-C., Li, J., Bao, X., Derogatis, A., Kim, S., Mehta, S., & Sanai, N. (2019). A Phase 0 Trial of Ribociclib in Recurrent Glioblastoma Patients Incorporating a Tumor Pharmacodynamic- and Pharmacokinetic-Guided Expansion Cohort. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(19), 5777-5786. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0133>

Timmons, J. J., Zhang, K., Fong, J., Lok, E., Swanson, K. D., Gautam, S., & Wong, E. T. (2018). Literature Review of Spinal Cord Glioblastoma. *American Journal of Clinical Oncology*, 41(12), 1281-1287. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000434>

Topczewska, J. M., Postovit, L.-M., Margaryan, N. V., Sam, A., Hess, A. R., Wheaton, W. W., Nickoloff, B. J., Topczewski, J., & Hendrix, M. J. C. (2006). Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: Role in melanoma aggressiveness. *Nature Medicine*, 12(8), 925-932. <https://doi.org/10.1038/nm1448>

Tsang, L. L. H., Quarterman, C. P., Gescher, A., & Slack, J. A. (1991). Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 27(5), 342-346. <https://doi.org/10.1007/BF00688855>

Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A. W. M., Lu, C., Ward, P. S., Thompson, C. B., Kaufman, A., Guryanova, O., Levine, R., Heguy, A., Viale, A., Morris, L. G. T., Huse, J. T., Mellinghoff, I. K., & Chan, T. A. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483(7390), 479-483. <https://doi.org/10.1038/nature10866>

Tykocki, T., & Eltayeb, M. (2018). Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 54, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.05.002>

Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules*, 10(3), 487. <https://doi.org/10.3390/biom10030487>

Ulloa, L., Creemers, John W. M., Roy, S., Liu, S., Mason, J., & Tabibzadeh, S. (2001). Lefty Proteins Exhibit Unique Processing and Activate the MAPK Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21387-21396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006933200>

Ulloa, L., & Tabibzadeh, S. (2001). Lefty Inhibits Receptor-regulated Smad Phosphorylation Induced by the Activated Transforming Growth Factor- β Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21397-21404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010783200>

Undabeitia, J., Torres-Bayona, S., Samprón, N., Arrázola, M., Bollar, A., Armendariz, M., Torres, P., Ruiz, I., Caballero, M. C., Egaña, L., Querejeta, A., Villanua, J., Pardo, E., Etxegoien, I.,

- Liceaga, G., Urtasun, M., Michan, M., Emparanza, J. I., Aldaz, P., ... Úrculo, E. (2018). Costes indirectos asociados al glioblastoma. Experiencia en un centro. *Neurología*, 33(2), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.05.003>
- Van Den Bent, M., Eoli, M., Sepulveda, J. M., Smits, M., Walenkamp, A., Frenel, J.-S., Franceschi, E., Clement, P. M., Chinot, O., De Vos, F., Whenham, N., Sanghera, P., Weller, M., Dubbink, H. J., French, P., Looman, J., Dey, J., Krause, S., Ansell, P., ... Golfopoulos, V. (2020). INTELLANCE 2/EORTC 1410 randomized phase II study of Depatux-M alone and with temozolomide vs temozolomide or lomustine in recurrent EGFR amplified glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 22(5), 684-693. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz222>
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Cancer Genome Atlas Research Network. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Wang, S., He, Q., Zhang, Q., Guan, B., & Zhou, X. (2020). Clinicopathologic features and prognosis of epithelioid glioblastoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(7), 1529-1539.
- Wang, T., Zhang, Z., Wang, K., Wang, J., Jiang, Y., Xia, J., Gou, L., Liu, M., Zhou, L., He, T., & Zhang, Y. (2017). Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes. *Oncotarget*, 8(22), 35890-35901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16271>
- Waqas, M., Khan, I., & Shamim, M. S. (2017). Role of 5-ALA in improving extent of tumour resection in patients with Glioblastoma Multiforme. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(10), 1630-1632.
- Weenink, B., French, P. J., Sillevs Smitt, P. A. E., Debets, R., & Geurts, M. (2020). Immunotherapy in Glioblastoma: Current Shortcomings and Future Perspectives. *Cancers*, 12(3), 751. <https://doi.org/10.3390/cancers12030751>
- Wei, C. L., Miura, T., Robson, P., Lim, S., Xu, X., Lee, M. Y., Gupta, S., Stanton, L., Luo, Y., Schmitt, J., Thies, S., Wang, W., Khrebtukova, I., Zhou, D., Liu, E. T., Ruan, Y. J., Rao, M., & Lim, B. (2005). Transcriptome Profiling of Human and Murine ESCs Identifies Divergent Paths Required to Maintain the Stem Cell State. *STEM CELLS*, 23(2), 166-185. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0162>
- Weidlich, G. A., Schneider, M. B., & Adler, J. R. (2019). Correction: Characterization of a Novel Revolving Radiation Collimator. *Cureus*, 11(5), c21. <https://doi.org/10.7759/cureus.c21>
- Weiss, S. A., Wolchok, J. D., & Sznol, M. (2019). Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research*, 25(17), 5191-5201. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1550>
- Wen, P. Y., Macdonald, D. R., Reardon, D. A., Cloughesy, T. F., Sorensen, A. G., Galanis, E., DeGroot, J., Wick, W., Gilbert, M. R., Lassman, A. B., Tsien, C., Mikkelsen, T., Wong, E. T., Chamberlain, M. C., Stupp, R., Lamborn, K. R., Vogelbaum, M. A., van den Bent, M. J., & Chang, S. M. (2010). Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response

- Assessment in Neuro-Oncology Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11), 1963-1972. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.3541>
- Wen, P. Y., & Packer, R. J. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: Clinical implications. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1215-1217. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab120>
- Wick, W., Platten, M., & Weller, M. (2001). Glioma cell invasion: Regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *Journal of Neuro-Oncology*, 53(2), 177-185. <https://doi.org/10.1023/a:1012209518843>
- Wolbers, J. G. (2014). Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chinese Journal of Cancer*, 33(1), 8-15. <https://doi.org/10.5732/cjc.013.10219>
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Woodroffe, R. W., Zanaty, M., Soni, N., Mott, S. L., Helland, L. C., Pasha, A., Maley, J., Dhungana, N., Jones, K. A., Monga, V., & Greenlee, J. D. W. (2020). Survival after reoperation for recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 73, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.01.009>
- Worby, C. A., & Dixon, J. E. (2014). PTEN. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 641-669. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-082411-113907>
- Xiong, Y., Zhang, Y., Xiong, S., & Williams-Villalobo, A. E. (2020). A Glance of p53 Functions in Brain Development, Neural Stem Cells, and Brain Cancer. *Biology*, 9(9), 285. <https://doi.org/10.3390/biology9090285>
- Xu, G., Zhong, Y., Munir, S., Yang, B. B., Tsang, B. K., & Peng, C. (2004). Nodal Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation in Human Epithelial Ovarian Cancer Cells via Activin Receptor-Like Kinase 7. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(11), 5523-5534. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0893>
- Xu, X., Zhou, X., Gao, C., Cao, L., Zhang, Y., Hu, X., & Cui, Y. (2019). Nodal promotes the malignancy of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells via activation of NF-κB/IL-6 signals. *Biological Chemistry*, 400(6), 777-785. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0392>
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 360(8), 765-773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
- Yang, I., Tihan, T., Han, S. J., Wrensch, M. R., Wiencke, J., Sughrue, M. E., & Parsa, A. T. (2010). CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *Journal of Clinical Neuroscience*, 17(11), 1381-1385. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.03.031>
- Yashiro, K., Saijoh, Y., Sakuma, R., Tada, M., Tomita, N., Amano, K., Matsuda, Y., Monden, M., Okada, S., & Hamada, H. (2000). Distinct transcriptional regulation and phylogenetic divergence of human LEFTY genes: Distinct regulation of human LEFTY genes. *Genes to Cells*, 5(5), 343-357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00329.x>

- Yeh, H.-W., Lee, S.-S., Chang, C.-Y., Lang, Y.-D., & Jou, Y.-S. (2019). A New Switch for TGFβ in Cancer. *Cancer Research*, 79(15), 3797-3805. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2019>
- Yu, S., Wang, R., Tang, H., Wang, L., Zhang, Z., Yang, S., Jiao, S., Wu, X., Wang, S., Wang, M., Xu, C., Wang, Q., & Wu, Y. (2020). Evolution of Lung Cancer in the Context of Immunotherapy. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 14, 117955492097969. <https://doi.org/10.1177/1179554920979697>
- Yu, Y., & Ran, Q. (2015). Nuclear SMAD2 restrains proliferation of glioblastoma. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 35(5), 1756-1763. <https://doi.org/10.1159/000373987>
- Zabala, M., Lobo, N. A., Antony, J., Heitink, L. S., Gulati, G. S., Lam, J., Parashurama, N., Sanchez, K., Adorno, M., Sikandar, S. S., Kuo, A. H., Qian, D., Kalisky, T., Sim, S., Li, L., Dirbas, F. M., Somlo, G., Newman, A., Quake, S. R., & Clarke, M. F. (2020). LEFTY1 Is a Dual-SMAD Inhibitor that Promotes Mammary Progenitor Growth and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 27(2), 284-299.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.06.017>
- Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., & Greene, M. I. (2007). ErbB receptors: From oncogenes to targeted cancer therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2051-2058. <https://doi.org/10.1172/JCI32278>
- Zhang, L., Sato, E., Amagasaki, K., Nakao, A., & Naganuma, H. (2006). Participation of an abnormality in the transforming growth factor-beta signaling pathway in resistance of malignant glioma cells to growth inhibition induced by that factor. *Journal of Neurosurgery*, 105(1), 119-128. <https://doi.org/10.3171/jns.2006.105.1.119>
- Zhang, X.-P., Zheng, G., Zou, L., Liu, H.-L., Hou, L.-H., Zhou, P., Yin, D.-D., Zheng, Q.-J., Liang, L., Zhang, S.-Z., Feng, L., Yao, L.-B., Yang, A.-G., Han, H., & Chen, J.-Y. (2008). Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1-2), 101-108. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9589-0>
- Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>
- Zhao, H., Ayrault, O., Zindy, F., Kim, J.-H., & Roussel, M. F. (2008). Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes & Development*, 22(6), 722-727. <https://doi.org/10.1101/gad.1636408>
- Zhu, X., Xue, D., Liu, J., Dong, F., Li, Y., & Liu, Y. (2021). Nodal is involved in chemoresistance of renal cell carcinoma cells via regulation of ABCB1. *Journal of Cancer*, 12(7), 2041-2049. <https://doi.org/10.7150/jca.52092>

