



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



IDiBE
UNIVERSITAS
Miguel Hernández

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Máster Universitario en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología
Sanitaria de Elche (IDiBE)

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2020-2021

Autor: Montserrat Escobar Rosales

Tutor académico: Dr. Miguel Saceda Sánchez

Co-tutor: Dra. Meuri del Camino de Juan Romero

D. Miguel Saceda Sánchez, Doctor y Profesor Asociado del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y Dña. Meuri del Camino de Juan Romero, Doctora en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche de la Universidad Miguel Hernández-FISABIO,

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL
GLIOBLASTOMA MULTIFORME”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

MONTSERRAT ESCOBAR ROSALES

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 18 de junio del 2021.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
PALABRAS CLAVE.....	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El cáncer en cifras.....	5
1.2. Glioblastoma multiforme	6
1.3. La importancia del gen RAC1 en glioblastoma multiforme.....	8
1.4. La importancia del gen PRMT5 en glioblastoma multiforme.....	9
1.5. El gen HR en glioblastoma multiforme.....	11
2. ANTECEDENTES	13
3. OBJETIVOS	15
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	15
4.1. Líneas celulares	15
4.2. Ensayos de proliferación celular.....	16
4.3. Transfección con siRNA.....	16
4.4. Extracción de ARN total.....	17
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	18
4.6. PCR cuantitativa a tiempo real.....	18
4.7. Ensayo de cicatrización de heridas.....	19
4.8. Ensayo de invasividad.....	20
4.9. Citometría de flujo (ciclo celular)	21
4.10. Radioterapia	22
4.11. Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Objetivo 1. Estudio del efecto de inhibidores químicos de RAC1 y PRMT5 mediante ensayos de viabilidad celular en líneas celulares de GBM.....	23

5.2.	Objetivo 2. Validación de cada una de las tres potenciales dianas terapéuticas inhibiendo su expresión con siRNA.....	24
5.3.	Objetivo 3. Caracterización inicial de los mecanismos moleculares regulados por los genes de interés en GBM.....	25
5.3.1.	Uso de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666	25
5.3.2.	Inhibición de la expresión del gen HR con siRNA	35
5.4.	Objetivo 4. Determinación de como la inhibición de las dianas terapéuticas se combina con las terapias clásicas y otros fármacos de interés en este tipo de tumores.....	37
5.4.1.	Inhibición de los genes RAC1 y PRMT5 en combinación con el tratamiento con carmustina y otros fármacos de interés.....	37
5.4.2.	Efecto conjunto del silenciamiento del gen HR y el tratamiento con carmustina.....	41
5.4.3.	Efecto conjunto de la radioterapia y el tratamiento con los inhibidores químicos NSC23766 y EPZ015666.....	42
6.	DISCUSIÓN.....	43
7.	CONCLUSIONES	50
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

En el 2020 se produjeron 19.3 millones de casos nuevos de cáncer y casi 10 millones de muertes por la misma causa en todo el mundo, según estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Debido a que para el 2040 se espera que la incidencia crezca un 47%, existe una urgencia por encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan diagnosticar y/o mejorar los efectos de los tratamientos existentes, sobre todo para las neoplasias más agresivas, letales y de muy mal pronóstico como el adenocarcinoma de páncreas, el carcinoma de colon y el glioblastoma multiforme (GBM).

Por lo anterior, la presente investigación se centró en el estudio de los genes RAC1, PRMT5 y HR como posibles nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de GBM. Para conseguirlo, se evaluó el efecto de los inhibidores químicos de RAC1 y PRMT5, NSC23766 y EPZ015666, respectivamente, en las líneas celulares de GBM (HGUE-GB-39, HGUE-GB-42) mediante ensayos de viabilidad celular. Posteriormente, se realizó la validación de cada una de las tres potenciales dianas terapéuticas inhibiendo su expresión con el ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) y se inició la caracterización de los mecanismos moleculares regulados por las mismas, mediante ensayos de ciclo celular, pruebas de invasividad en Matrigel, ensayos de cicatrización y PCR cuantitativas en tiempo real (qPCR). Asimismo, se determinó cómo la inhibición de las dianas objeto de estudio se combinó con terapias clásicas como la radioterapia y el tratamiento con carmustina, además de otros fármacos de interés como verteporfin, AZD6244, erlotinib, OSI-906 y BMS-754807. La ausencia de un efecto notable de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 en las líneas de GBM llevó a probar su efecto en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas (Hs766T, RWP-1) y carcinoma de colon (SW-480, HT29), siguiendo la misma línea de trabajo mencionada con anterioridad.

Los resultados obtenidos indicaron que los efectos de la inhibición de las posibles dianas terapéuticas son dependientes del contexto celular y, por consiguiente, específicos a la línea celular objeto de estudio. Por un lado, se observó que el gen RAC1 está implicado en los procesos de migración e invasividad celulares, ya que su silenciamiento con siRNA incrementó la expresión de los genes que codifican para las metaloproteasas 2 y 9 y para la integrina $\beta 3$ e impidió el cierre de la herida en los ensayos de cicatrización. En lo que respecta al gen HR, su silenciamiento incrementó los niveles del gen MMP9 e inhibió significativamente la proliferación en líneas celulares de GBM. Finalmente, el uso de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 disminuyó significativamente la proliferación celular en las líneas celulares de GBM, adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon y potenció el efecto de la radioterapia en HGUE-GB-39. Sin embargo, los efectos observados en las qPCR con GBM difieren de los observados con la inhibición de la expresión de la diana terapéutica en cuestión, por lo que se concluye que no son buenos candidatos para su empleo como fármacos en el tratamiento de GBM.

ABSTRACT

In 2020, there were 19.3 million new cases of cancer and almost 10 million deaths from the same cause worldwide, according to estimates by the International Agency for Research on Cancer. Due to the fact that by 2040 the incidence is expected to grow by 47%, there is an urgency to find new therapeutic targets that allow diagnosing and/or improving the effects of existing treatments, especially for the most aggressive, lethal and highly dangerous poor prognosis neoplasms such as pancreatic adenocarcinoma, colon carcinoma, and glioblastoma multiforme (GBM).

Therefore, the present investigation focused on the study of the RAC1, PRMT5 and HR genes as possible new therapeutic targets for GBM treatment. In order to achieve this, the effect of RAC1 and PRMT5 chemical inhibitors, NSC23766 and EPZ015666, respectively, in GBM cell lines (HGUE-GB-39, HGUE-GB-42) was evaluated by means of cell viability assays. Subsequently, validation of each of the three potential therapeutic targets was carried out inhibiting their expression with the small interfering RNA (siRNA) and the characterization of molecular mechanisms regulated by them were started by means of cell cycle assays, Matrigel invasiveness tests, wound healing assays and quantitative real-time PCR (qPCR). Likewise, it was determined how the inhibition of the targets under study was combined with classical therapies such as radiotherapy and carmustine treatment, in addition to other drugs of interest such as verteporfin, AZD6244, erlotinib, OSI-906 and BMS-754807. The absence of a relevant effect of the inhibitors NSC23766 and EPZ015666 on GBM lines, led to testing their effect on pancreatic adenocarcinoma (Hs766T, RWP-1) and colon carcinoma (SW-480, HT29) cell lines, following the same line of work mentioned above.

The results obtained indicated that the effects of the inhibition of the possible therapeutic targets depend on the cellular context and, thus, they are specific to the cell line under study. On the one hand, it was observed that RAC1 gene is involved in cell migration and invasiveness cellular processes, since its silencing with siRNA increased the expression of genes that code for metalloproteases 2 and 9 and for β 3 integrin. Furthermore, the latter prevented the closure of the wound in wound healing assays. Regarding the HR gene, its silencing increased the levels of MMP9 gene and significantly inhibited proliferation in GBM cell lines. Finally, the use of the inhibitors NSC23766 and EPZ015666 significantly decreased cell proliferation in GBM, pancreatic adenocarcinoma and colon carcinoma cell lines and enhanced the effect of radiotherapy in HGUE-GB-39. However, the effects observed in qPCRs with GBM differ from those observed with the inhibition of the expression of the therapeutic target in question, so it is concluded that they are not good candidates for its use as drugs in GBM treatment.

PALABRAS CLAVE

RAC1, PRMT5, HR, glioblastoma, NSC23766, EPZ015666

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer en cifras

Según las estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) basadas en los reportes del Observatorio Global del Cáncer (GCO, por sus siglas en inglés) sobre la incidencia y mortalidad producidas por cáncer, se estima que en todo el mundo se produjeron 19.3 millones de casos nuevos y casi 10 millones de muertes por la misma causa en el 2020. Se espera que para el año 2040 la cantidad de casos sea de 28.4 millones, lo que representa un aumento del 47% con respecto al 2020 [2].

De todos los tipos de cáncer reportados, el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, por sus siglas en inglés), con un 85% -90% de todas las neoplasias pancreáticas [3], fue la sexta causa de muerte en ambos sexos a nivel mundial [2]. La edad media en el momento del diagnóstico es de 70-71 años [3]. Debido a la falta de síntomas tempranos y a la metástasis potencial de las células PDAC, generalmente se diagnostica en etapas avanzadas, cuando alrededor del 80% de los pacientes tienen un tumor irreseccable y el único tratamiento disponible es de carácter paliativo [3, 4]. La quimioterapia con fluorouracilo (5-FU) fue el pilar para su tratamiento desde 1950. Sin embargo, la gemcitabina demostró ser superior a este último en términos de aumento de supervivencia. A partir de entonces, nuevas quimioterapias combinadas de gemcitabina con paclitaxel unido a albúmina en nanopartículas (nab-paclitaxel) o FOLFIRINOX, una quimioterapia que combina el uso de ácido folínico o leucovorina, 5-fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino, se han desarrollado como la principal opción de tratamiento. Dirigirse a KRAS y a otros genes comúnmente mutados en esta enfermedad (como TP53, CDKN2A y SMAD4) no ha funcionado y dada la heterogeneidad de los tumores de páncreas, la probabilidad de éxito en el tratamiento atacando sólo una aberración genética a la vez, es muy baja [4]. Es por esto que se han realizado numerosos estudios para dilucidar los mecanismos moleculares asociados con la aparición, el desarrollo y la metástasis de esta enfermedad letal, así como la aparición de resistencia terapéutica. De esta forma, se ha visto que la invasividad podría estar correlacionada con la transición epitelio-mesenquimatosa (EMT, por sus siglas en inglés) [5].

En lo que respecta al carcinoma de colon, éste tipo de cáncer fue la segunda causa de muerte a nivel mundial en el 2020 [2]. El 70%-75% de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad sobreviven más allá de un año, el 30%-35% más de 3 años y menos del 20% más de 5 años [6]. El tratamiento principal para el carcinoma de colon metastásico irreseccable incluye terapia sistémica (quimioterapia citotóxica, terapia biológica como anticuerpos contra factores de crecimiento celular, inmunoterapia y sus combinaciones)[6]. Al igual que en adenocarcinoma de páncreas y en otros tipos

de neoplasias, existen estudios con pruebas sólidas del papel vital de la EMT en carcinoma de colon [7].

Finalmente, las neoplasias del Sistema Nervioso Central (SNC) representaron la onceava causa de muerte a nivel mundial en el 2020 [2]. Entre ellas se encuentra el glioblastoma multiforme, el cual, será objeto de estudio del presente trabajo.

Todos los tipos de cáncer mencionados con anterioridad, se encuentran dentro de las neoplasias malignas más agresivas, letales y con una escasa tasa de supervivencia a 5 años debido a las opciones limitadas para una terapia eficaz [2].

1.2. Glioblastoma multiforme

El GBM representa el 57% de todos los gliomas. El estándar internacional actual para la nomenclatura y el diagnóstico de gliomas de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2016), clasifica a estos últimos desde el grado I al grado IV, con base en el nivel de malignidad determinado por criterios histopatológicos. El GBM está clasificado como grado IV, ya que es uno de los tumores primarios más malignos, agresivos, invasivos e indiferenciados del SNC [8]. Su incidencia varía de 0.59 a 5 por 100,000 personas y está aumentando en muchos países [9]. Además, es un cáncer de mal pronóstico ya que posee una tasa de supervivencia a 1 año del 37.2% y una tasa de supervivencia a 5 años del 5.1% [10].

Puede ocurrir a cualquier edad, incluso en niños pequeños, aunque en ese caso sólo constituye el 8.8% de todos los tumores del SNC infantiles [11]. La incidencia es mayor entre los 55 a 60 años y parece tener una predilección por el género, siendo un 40% más frecuente en hombres que en mujeres [12]. La incidencia superior en hombres se asocia a la inactivación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y al incremento del fenotipo de células madre en los astrocitos masculinos en comparación con los astrocitos femeninos, eventos que están vinculados con la pérdida de la función de la neurofibromina 1 (NF1), que es una proteína que regula negativamente la vía de señalización RAS/MAPK, y p53, una proteína supresora de tumores que previene el crecimiento de células aberrantes al inducir la detención del ciclo celular, la reparación del ADN o la muerte celular programada [13].

Por otra parte, el GBM es más frecuente en la población caucásica [14]. Clínicamente se puede subdividir en dos tipos: 1) GBM primario, que se presenta sin antecedentes de cáncer cerebral de grado inferior; y 2) GBM secundario, que ocurre en pacientes con antecedentes de astrocitoma de grado inferior y que es mucho menos frecuente. Estos dos tipos de GBM tienen cambios genéticos distintos y, desde una perspectiva molecular, se pueden considerar como dos enfermedades diferentes [15]. Para efectos de la presente investigación, el enfoque se realizará únicamente hacia GBM primario.

Se han establecido varias subclases transcripcionales de GBM derivados de estudios globales de expresión génica. Los datos recientes de la investigación en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), clasifican al GBM en subtipos clásicos, mesenquimales, proneurales y neurales [16]. Esta enfermedad también se ha clasificado en tres subgrupos según la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y el estado de mutación de IDH2: 1) IDH-mutante; 2) IDH-tipo salvaje o “*wild-type*” (incluyendo a GBM de células gigantes, gliosarcoma y GBM epitelioides); y 3) NOS (no especificado de otra manera).

La codeleción o mutaciones cromosómicas 1p/19q (que representan sólo el 2% en tumores primarios de GBM), junto con la metilación del promotor de MGMT, son información importante que ayuda no sólo a determinar el tipo de cáncer, sino también a predecir la condición del paciente, ya que estas características moleculares suelen conferir un pronóstico favorable [17, 18].

Pese a las clasificaciones de GBM mencionadas con anterioridad, la mayoría de los pacientes recibe un tratamiento idéntico por la falta de terapias dirigidas eficaces. Dicho tratamiento incluye cirugía seguida de radioterapia o quimioterapia con temozolamida (TMZ, agente metilante), carmustina (BCNU) o lomustina (CCNU). El tratamiento no es curativo y en lo que respecta a los fármacos BCNU y CCNU, éstos son muy citotóxicos y su uso genera una resistencia muy temprana que limita su beneficio [19]. Ante ello, la TMZ es la única quimioterapia estándar para pacientes con GBM [20]. El carboplatino, oxaliplatino, etopósido e irinotecán son fármacos de segunda línea para aquellos pacientes que no responden al tratamiento previamente mencionado. Otros enfoques terapéuticos para GBM incluyen agentes anti-angiogénicos como anticuerpos monoclonales anti-VEGF (bevacizumab), anticuerpos anti-FGF, inhibidores de EGFR (erlotinib y gefitinib) e inhibidores de tirosina quinasa [21].

A pesar de los esfuerzos en este ámbito, esta enfermedad aún posee un pronóstico precario, ya que los pacientes generalmente mueren dentro de los 14 a 15 meses posteriores al diagnóstico [8].

Una vez que ocurre la recurrencia de GBM, las opciones terapéuticas para el paciente son limitadas. Recientemente la FDA aprobó un tratamiento para GBM recurrente y recién diagnosticado basado en el envío de campos eléctricos al sitio del tumor, con la finalidad de interrumpir la división de las células cancerosas (TTFields, Optune)[22].

Existen múltiples desafíos en GBM relacionados por un lado con su biología compleja y heterogénea y por otro con la ubicación de la enfermedad [23]. Esta última es vital en el tratamiento de los tumores cerebrales puesto que debe considerarse la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual, es semipermeable y altamente selectiva. Todas las estrategias terapéuticas orientadas al tratamiento de GBM están sujetas a las propiedades fisicoquímicas como el peso molecular, la lipofilia y la carga, quienes afectan directamente la capacidad de cualquier molécula para traspasar dicha barrera [24].

Respecto a la complejidad de su biología, se han identificado múltiples mecanismos de resistencia a la radioterapia y a la TMZ vinculados con un subconjunto de células de GBM con características similares a las células madre neurales, en parte, debido al aumento de la actividad de las vías de respuesta al daño de ADN en las células. También se ha considerado la participación de los microtúbulos en dichos mecanismos de resistencia [15].

Algunos de los biomarcadores moleculares de GBM son: 1) amplificación y mutación del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el cromosoma 7 (40% de los casos); 2) la sobreexpresión del homólogo de doble minuto 2 de ratón (MDM2); 3) la pérdida de la heterocigidad del cromosoma 10q que contiene el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN, 90% de los casos), un supresor tumoral; 4) la mutación del promotor TERT (80% de los casos); 5) la mutación TP53 (28% de los casos; más común en GBM secundario) [25]; 6) la delección de CDKN2A (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A, 80% de los casos); 7) la mutación del supresor tumoral NF1 (10% de los casos); y 8) la amplificación de PDGFRA (receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas, 10% de los casos), por mencionar algunos ejemplos [8, 15, 26]. Estas alteraciones genéticas se agrupan en tres vías de señalización principales: RAS/PI3K (alterada en casi el 88% de los casos), vía de p53 (alterada en el 87% de los casos) y en la vía de Rb (alterada en el 78% de los casos) [27].

Los esfuerzos para vincular las alteraciones encontradas en dichas vías con los distintos subtipos moleculares y epigenéticos de GBM, revelaron que distintas combinaciones pueden afectar el resultado clínico y la sensibilidad de los tumores individuales a la terapia [28]. Además, se ha evidenciado que el crecimiento de GBM está impulsado por una red de señalización con redundancia funcional que permite la adaptación en respuesta a tratamientos moleculares específicos [28]. Se sabe, por ejemplo, que las vías adicionales independientes de Akt también juegan un papel importante en la mediación de los efectos oncogénicos de la señalización de la vía PI3K. Una de dichas vías es la señalización a través de la GTPasa Rac [15].

1.3. La importancia del gen RAC1 en glioblastoma multiforme

Las proteínas Rac pertenecen a la superfamilia Ras y son una subfamilia de la familia Rho de proteínas G pequeñas. Esta subfamilia tiene cuatro miembros: Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG, codificadas por los genes en los cromosomas 7, 22, 17 y 11 respectivamente [15].

La información presente en la base de datos TCGA muestra que el ARN mensajero de Rac1 está expresado en niveles más altos que Rac2, Rac3 o RhoG en GBM [15]. El gen RAC1, que codifica para la GTPasa del mismo nombre, está en el brazo corto del cromosoma 7 (7p22.1). Aunque no suele formar parte del amplicón EGFR (7p11.2), la ganancia de copias de Rac1 en el 1% de los casos de GBM corresponde a un aumento de la expresión del ARN mensajero que puede contribuir al incremento de

la actividad de esta GTPasa en la enfermedad [15]. La activación aberrante de Rac1 mediada por PI3K, aunada a la pérdida de una copia de PTEN, es un evento temprano y común en GBM primario [15].

Por otro lado, se han identificado alrededor de 20 proteínas diferentes del factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), las cuales participan en la activación de todas las GTPasas al desplazar GDP (vinculado a un estado inactivo) por GTP (estado activo). Además de su papel en la activación de Rac1, GEF puede guiar la señalización de ésta última GTPasa aguas abajo de vías específicas [29]. Se ha visto que diferentes GEFs tienen efectos opuestos sobre la motilidad celular, ya que en un estudio con células NIH 3T3, TIAM1 inhibió la migración celular mientras que PREX1 la promovió formando un complejo ternario con Rac1 y la proteína remodeladora de actina no voladora homóloga I (FLII) [30]. Estos resultados muestran que los GEFs no son necesariamente redundantes y que podrían dictar resultados en la señalización de Rac [15]. Los GEFs de Rac que se han estudiado en GBM son Trio, Ect2, Vav3, DOCK1 y PREX1. Este último está en el cromosoma 20 (20q13.13) y se ha observado una ganancia de copia en aproximadamente el 40% de los casos de GBM. Tal ganancia también está asociada con el aumento en los niveles de ARN mensajero [15].

De manera general, varios estudios han comprobado la contribución de Rac al comportamiento maligno de GBM. Se ha visto que juega un papel importante en: 1) la migración celular; 2) la invasión de células cancerosas mediante mecanismos de lamelipodia [31] e invadipodia [32]; Rac1 controla la invasión de células cancerosas regulando la producción de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) y sus inhibidores naturales específicos de tejido (TIMPs); 3) la proliferación; 4) la apoptosis [33]; 5) la diferenciación celular (mantiene un estado similar al de las células madre) [34]; 6) la respuesta al daño del ADN; 7) el metabolismo (aumento de glucólisis) [35]; 8) la angiogénesis [36]; y 9) la inmunosupresión [37].

Por todo lo anterior, la inhibición de Rac1 podría ser beneficiosa no solo de manera directa, sino también indirecta, sensibilizando a el GBM frente a otras terapias que son ineficaces como agentes únicos [38]. Se han desarrollado varios inhibidores de Rac, entre ellos, NSC23766, el cual, se une a Rac1 impidiendo la interacción con los GEFs Tiam1 y Trio [39]. El empleo de inhibidores de Rac1 no solo permitiría la valoración de Rac1 como posible diana terapéutica, sino que también podría ser útil para dilucidar algunas funciones celulares y revertir los fenotipos de las células tumorales asociados a dicha GTPasa.

1.4. La importancia del gen PRMT5 en glioblastoma multiforme

La metilación de la arginina es un tipo de modificación postraducciona muy importante, ya que afecta múltiples procesos celulares como la expresión génica, la modificación de proteínas, la transducción de señales y la progresión del ciclo celular [40].

Este tipo de metilación es catalizada por las proteínas arginina metiltransferasas (PRMT) quienes utilizan como cosustrato S-adenosil metionina (SAM) para catalizar la transferencia de grupos metilo [41].

Existen 9 tipos de PRMTs. De todas ellas, la proteína tipo II arginina metiltransferasa 5 (PRMT5), cataliza la dimetilación simétrica de arginina (sDMA, por sus siglas en inglés) de las histonas H3 arginina 8 (H3R8me2s) y H4 arginina 3 (H4R3me2s). Está codificada por el gen que lleva el mismo nombre y regula la expresión de varios genes a través de la metilación de factores de transcripción como p53 y NF-KB. Esto último la ha vinculado al control de diferentes procesos celulares esenciales implicados en la progresión del cáncer. El hecho de que este gen se encuentre sobreexpresado, un evento común en varios tipos de cáncer incluido GBM, se correlaciona con un mal pronóstico para el paciente [42].

PRMT5 es la principal arginina metiltransferasa simétrica en mamíferos [43] e interactúa con varios socios de unión que influyen en su especificidad de sustrato, siendo las proteínas MEP50 un componente central de los complejos multiméricos [44]. En humanos, PRMT5 se une a estas últimas para formar un complejo heterooctamérico de aproximadamente 450 kDa. Es probable que el módulo (PRMT5)₄(MEP50)₄ sea la unidad estructural central que actúa con proteínas asociadas para formar los complejos de múltiples subunidades con especificidades y funciones discretas [45].

Cada vez existen mayores evidencias de que no sólo las alteraciones genéticas, sino también las alteraciones epigenéticas y las modificaciones postraduccionales desempeñan un papel clave en la regulación de las vías ERK1/2 y PI3K [46]. Aunado a ello, varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la inhibición y la eliminación de PRMT5 disminuyen la proliferación celular, la migración y la capacidad de formación de colonias, así como un aumento de la apoptosis y la detención del ciclo celular, motivo por el cual se ha convertido en una posible diana terapéutica [44].

La metilación de PRMT5 y sus efectos dependen del tipo de cáncer. Recientemente se ha demostrado que PRMT5 metila a ciertos receptores de factores crecimiento (GFR, por sus siglas en inglés) como EGFR. Dicha metilación en R1175 en el cáncer de mama, aparentemente amortigua la activación de ERK, suprimiendo el crecimiento celular [47]. Por el contrario, en adenocarcinoma de páncreas, la actividad de PRMT5 conduce a la fosforilación de EGFR y promueve la transición EMT a través de la vía EGFR/Akt/ β -catenina; su inhibición frena el crecimiento tumoral [48].

La inhibición de PRMT5 también parece tener importancia en la disminución de la expresión de PI3K, y, por consiguiente, de toda esta vía. Su papel en la familia de las pequeñas GTPsas de sarcoma en rata (RAS) está vinculado al oncogen KRAS, que es de los más mutados en adenocarcinoma de páncreas (95%), de tiroides (55%), colorectal (35%) y de pulmón (35%). Existen evidencias de que PRMT5 y KRAS interactúan de alguna manera para promover el crecimiento y desarrollo del cáncer,

por consiguiente, la inhibición de esta metiltransferasa podría ser terapéuticamente ventajosa en aquellos cánceres que presenten dicha mutación [49]; así como en linfomas y en GBM [50].

Por todo lo anterior, PRMT5 se ha convertido en un punto clave para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Se han abordado diferentes enfoques de búsqueda de inhibidores de molécula pequeña, como el cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés), el cribado virtual basado en farmacóforos y en el acoplamiento [51]. Existen aproximadamente 50 candidatos a inhibidores de PRMT5, entre ellos, EPZ015666 (GSK3235025). Este compuesto se une al sitio de unión al sustrato de PRMT5 con una gran afinidad ($K_D < 1$ nM) e inhibe la formación del complejo PRMT5:MEP50. Además de ello, es competitivo con el sustrato, no competitivo con SAM pero dependiente de éste último (SAM es necesario para la unión de EPZ015666 a la enzima diana, PRMT5) [50]. Su dosificación oral demostró actividad antitumoral dependiente de la dosis en múltiples modelos de xenoinjerto de linfoma de células del manto (MCL, por sus siglas en inglés) y una excelente selectividad para PRMT5 con una potencia prometedora ($IC_{50} = 22 \pm 14$ nM; $n=12$), sin actividad detectada contra un panel de otras 20 metiltransferasas [44].

La compañía GlaxoSmithKline (GSK) modificó a EPZ015666 y la versión mejorada (GSK3326595) se encuentra en ensayos clínicos de fase I (NCT 02783300) para su evaluación en pacientes con tumores sólidos avanzados o recurrentes y para linfoma no Hodgkin [51]. En este momento, debido a su destacada participación en diferentes tipos de cáncer, PRMT5 es probablemente la diana terapéutica más interesante entre todas las PRMT. Los resultados que se obtengan del ensayo clínico mencionado anteriormente, sin duda alguna aportarán mayor claridad sobre la relevancia biológica y el potencial terapéutico de su inhibición.

1.5. El gen HR en glioblastoma multiforme

El gen HR, ubicado en el cromosoma 8 (8p21.3) codifica para la proteína lisina desmetilasa HR y correceptor de receptor nuclear. A este gen también se le conoce como “el gen sin pelo”, debido a que se clonó por primera vez en ratones que carecían de pelo después del desprendimiento del pelaje infantil inicial [52]. Esta desmetilasa tiene una masa molecular de aproximadamente 130 kDa, 1189 aminoácidos de longitud y se expresa principalmente en la piel y el cerebro, aunque aún se desconoce su papel en esta última región anatómica [52, 53]. Posee dominios funcionales de señal de localización nuclear [54], de dirección de matriz nuclear [55], un dedo de zinc putativo [56] y un dominio Jumonji C (JmjC) [57]. Además de ello, puede interactuar directamente con varios factores de transcripción nuclear y moduladores de cromatina.

Específicamente en GBM, esta proteína se encuentra particularmente disminuida en comparación con el tejido normal, lo que sugiere que la pérdida de su expresión podría contribuir a la patogénesis

de la enfermedad. Niveles bajos en la expresión del gen HR están asociados con la disminución de la supervivencia [58] y se ha descubierto su unión a elementos que responden a p53, incluidos los implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis [53].

Además, el análisis de las secuencias de genomas de pacientes con GBM revelaron 10 mutaciones somáticas en el gen HR de sentido erróneo (P394L, L490I, G563G, E709K, R728M, T729I, P841S, L894F, P9962 y K1004N), de las cuales P996S y K1004N se encuentran en el dominio histona desmetilasa de HR. Tales mutaciones, al ser reconstruidas, fueron asociadas con el daño en las propiedades transactivadoras de p53 [52]. De manera general, las mutaciones en HR conducen a la pérdida de alguna funcionalidad de HR [58].

Las investigaciones realizadas sobre la lisina desmetilasa HR sugieren que posee propiedades supresoras de tumores en GBM, las cuales, podrían ser clínicamente relevantes y, por tanto, su estudio podría dilucidar una vía potencial para la intervención terapéutica.

2. ANTECEDENTES

En el laboratorio del Dr. Miguel Saceda se realizaron una serie de microarrays a partir de muestras de 7 pacientes con GBM, las cuales se compararon con el tejido cerebral en condiciones normales. Dichos estudios se llevaron a cabo por triplicado y a partir de ellos, se identificó la variación de 1000 genes, de los que se seleccionaron 80 genes que se encontraban especialmente desregulados en todos los pacientes.

Adicionalmente, se tenían muestras de 2 de los 7 pacientes mencionados anteriormente, antes y después de ser sometidos a radioterapia y quimioterapia. Los resultados del análisis de estas muestras permitieron identificar otros 26 genes que además de estar desregulados en GBM, mostraban los cambios más significativos tras los tratamientos.

Por otro lado, se obtuvieron datos de 19-20 genes relacionados con la división celular asimétrica en tejido neural de *Drosophila*. A partir de los resultados de un interactoma de afadin, se encontró que los ortólogos humanos de dichos genes aparecen vinculados a GBM. Dichos resultados se obtuvieron gracias a la colaboración con la Dra. Ana Carmena de la Cruz del Instituto de Neurociencias de Alicante. En dicho estudio se analizó el interactoma de la proteína Cno de *Drosophila* implicada en la formación de uniones celulares, migración, supervivencia y en la oncogénesis en tumores sólidos, cuyo ortólogo humano es afadin.

Todos los genes desregulados identificados en los microarrays (80), en las muestras de pacientes sometidos a radioterapia y quimioterapia (26) y en el interactoma de afadin (19-20), se llevaron a la base de datos STRING con la finalidad de analizar las interacciones existentes entre las proteínas codificadas por dichos genes. Con esta información, y con la obtenida al interior del grupo de investigación en Oncología Molecular del Dr. Miguel Saceda y de las Dras. Camino de Juan Romero y Pilar García, se han identificado posibles nuevas dianas terapéuticas.

La presente investigación se centra en el estudio de tres de esas posibles dianas terapéuticas: los genes RAC1, PRMT5 y HR. Su importancia, la cual ha quedado evidenciada en la introducción del presente trabajo, coincide con los hallazgos en los estudios mencionados en este apartado y con la búsqueda realizada en la base de datos UALCAN. Esta última posee una gran cantidad de datos provenientes del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés) y del Consorcio de Análisis Proteómico Clínico de Tumores (CPTAC, por sus siglas en inglés), motivo por el cual, representa un punto de apoyo importante para validar la información obtenida en los estudios comentados con anterioridad.

La búsqueda de los genes RAC1 y PRMT5 en UALCAN confirma la sobreexpresión significativa de los mismos, en pacientes con GBM versus el cerebro considerado normal (**Figura 1**). Para el estudio

del primero de ellos, se empleará el inhibidor NSC23766 y se analizará su efecto principalmente en los procesos de proliferación, migración e invasividad celulares. Por otro lado, para el estudio del gen PRMT5 se empleará el inhibidor EPZ015666.

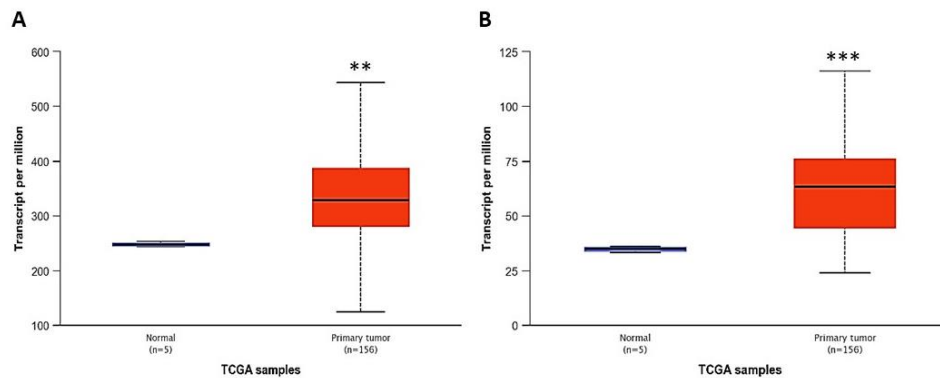


Figura 1. Datos de expresión obtenidos a partir de la base de datos UALCAN. Se muestra la expresión del gen RAC1 (A) y del gen PRMT5 (B) en transcritos por millón en pacientes con GBM (rojo) y el cerebro considerado normal (azul). ** indica $p < 0.01$ y *** indica $p < 0.001$.

En lo que respecta al gen HR, su búsqueda en UALCAN confirma que se encuentra disminuido en pacientes con GBM en comparación con el cerebro considerado normal (**Figura 2**). Esto concuerda con lo observado en los microarrays realizados donde, de manera interesante, se encontró una paciente que a diferencia del resto presentaba una expresión aumentada de este gen, y que consiguió vivir hasta 26 meses a diferencia de los demás pacientes que sólo sobrevivieron hasta 12 meses. Debido al posible vínculo del gen HR con la supervivencia en GBM, documentado en la bibliografía [58], se eligió para su investigación como posible diana terapéutica. Ante la ausencia de inhibidores químicos, existen dos posibilidades para abordar su estudio: inhibiendo su expresión con el siRNA, o bien, sobreexpresando dicho gen. Para efectos de este trabajo, se ha seleccionado la primera alternativa.

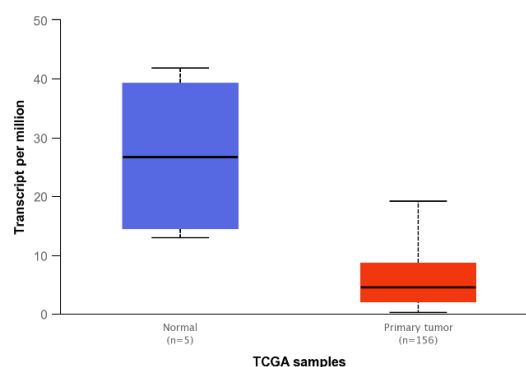


Figura 2. Datos de expresión del gen HR obtenidos a partir de la base de datos UALCAN. Se muestra la expresión del gen HR en transcritos por millón en pacientes con GBM (rojo) y el cerebro considerado normal (azul).

3. OBJETIVOS

La presente investigación tiene como objetivo general determinar si los genes RAC1, PRMT5 y HR pueden constituirse en nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del GBM. Este objetivo general ha sido subdividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del efecto de inhibidores químicos de RAC1 y PRMT5 mediante ensayos de viabilidad celular en líneas celulares de GBM.
2. Validación de cada una de las tres potenciales dianas terapéuticas inhibiendo su expresión con siRNA.
3. Caracterización inicial de los mecanismos moleculares regulados por los genes de interés en GBM.
4. Determinación de como la inhibición de las dianas terapéuticas se combina con las terapias clásicas y otros fármacos de interés en este tipo de tumores.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Líneas celulares

Las líneas celulares de glioblastoma HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 fueron establecidas en el Hospital General Universitario de Elche. Dichas líneas se obtuvieron a partir de cultivos primarios de aspirados quirúrgicos de pacientes diagnosticados con GBM. Todos los pacientes eran mayores de 18 años y habían firmado el consentimiento informado.

En lo que respecta a las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas humano RWP-1 (derivado de una metástasis de hígado) y Hs766T (derivado de una metástasis de un nodo linfático) y las líneas de carcinoma de colon humano SW-480 y HT-29, fueron donadas por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM, Barcelona, España).

Las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas y de carcinoma de colon se mantuvieron en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, por sus siglas en inglés) con glucosa alta (Biowest, MO, EE.UU.), mientras que las líneas celulares de GBM se mantuvieron en medio DMEM con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM F12) (Biowest, MO, EE.UU.). Tanto el medio DMEM como DMEM-F12 fueron suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Biowest, MO, EE.UU.) y 1% (v/v) de una mezcla de penicilina y estreptomina (Biowest, MO, EE.UU.). El pase celular, en todos los casos, se llevó a cabo al alcanzar el 80% de confluencia celular y las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, en el incubador ESCO CelCulture CO₂.

Los procedimientos para la obtención de muestras de pacientes con GBM siguieron las normas éticas y legales nacionales, así como las pautas establecidas en la Declaración de Helsinki (2000). El

proyecto de investigación tiene la aprobación escrita del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General Universitario de Elche, en colaboración con el Biobanco Hospitalario. Ambos forman parte de la Red Valenciana de Biobancos.

4.2. Ensayos de proliferación celular

Las líneas celulares HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 se sembraron en placas de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), con una densidad de 4000 células por pocillo. Se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C y 5% de CO₂, por 24 h. Después de este tiempo, se trataron a diferentes concentraciones del inhibidor químico, por sextuplicado, y se incubaron a las mismas condiciones por 72 h. Posteriormente, se añadió bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 0.25 mg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) por 3 h. La reducción metabólica de este compuesto en formazán, principalmente por la enzima succinato-deshidrogenasa, permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

La retirada del medio seguida de la adición de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) a cada pocillo, permite disolver los cristales del formazán formado, manteniendo las placas tratadas en agitación y a temperatura ambiente (TA) por 30 minutos. Finalmente, la absorbancia se midió a 570 nm en el lector de microplacas Gen5™ (BioTek®, Winooski, VT, EE.UU.), la cual, es directamente proporcional a la cantidad de células vivas y de formazán producido.

Para los ensayos de MTT en los cuales se deseaba observar el efecto del siRNA, se sigue el mismo principio, sólo que los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con una densidad de aproximadamente 200.000 células por pocillo. Se incubaron en las mismas condiciones y al cabo de 24 h, se realizó el protocolo de transfección. Después de 48 h, se añadió MTT (0.25 mg/mL), se dejó actuar dicho reactivo por 3 h y al finalizar este tiempo de espera, se añadió DMSO (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). El contenido fue distribuido en una placa de 96 pocillos (100 µL en cada uno), la cual se mantuvo en agitación constante y a TA por 30 minutos para posteriormente, ser leída como se describe anteriormente.

4.3. Transfección con siRNA

De manera general, la transfección consiste en la introducción de un ácido nucleico en células eucariotas, mediante el empleo de diferentes métodos químicos o físicos.

En este trabajo se empleó el método de lipofección, con el cual, se pretende introducir el siRNA, un tipo de ARN bicatenario formado por 21-25 nucleótidos de longitud. Dicho siRNA consiste en una secuencia complementaria a un fragmento específico del ARN mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés). Por consiguiente, la unión siRNA-mRNA suprime la expresión de los genes diana mediante la escisión del mRNA al interactuar con el complejo RISC [59].

Debido a que el siRNA posee una carga negativa, se realiza su atrapamiento en una vacuola lipídica catiónica o liposoma, formado por el reactivo en cuestión (Lipofectamine® Transfection Reagent de Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Dicho liposoma se fusiona con la membrana celular y ello permite liberar el siRNA deseado al interior de la célula [60].

Primeramente, se sembraron placas de 6 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) a una concentración de 100.000 células por pocillo en 2 mL de medio DMEM F-12 (Biowest, MO, EE.UU.) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Biowest, MO, EE.UU.) y 1% (v/v) de una mezcla de penicilina y estreptomycin (Biowest, MO, EE.UU.). Las placas se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C, 24 h, en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%.

Para llevar a cabo la transfección de las líneas celulares, se utilizaron los siRNA específicos de RAC1 (siRNA-RAC1, Ambion, EE.UU.), PRMT5 (siRNA-PRMT5, Ambion, EE.UU.), HR (siRNA-HR, Ambion, EE.UU.) y un siRNA no específico (NS, Ambion, EE.UU.) como control negativo, todos a una concentración de 5 nmol/mL.

El procedimiento implica la preparación de dos soluciones. La primera de ellas (solución A), consiste en la mezcla del siRNA de interés con Opti-MEM® Reduced Serum Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.); la segunda (solución B), de lipofectamina (Lipofectamine® Transfection Reagent de Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) también con medio Opti-MEM® Reduced Serum Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.).

Una vez preparadas dichas soluciones, se dejan reposar 5 minutos antes de ser mezcladas. La mezcla, que contiene el siRNA de interés a 25 pmol/mL y 10 µL/mL de lipofectamina, se deja reposar 20 minutos, tiempo durante el cual se realiza el cambio de medio DMEM-F12 por 1.5 mL de medio DMEM-F12 sin antibiótico (por pocillo). Posteriormente, se añaden 375 µL de la mezcla a cada uno de los pocillos y las placas se mantienen nuevamente en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a las condiciones anteriormente descritas, por 48 h.

4.4. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó conforme a lo establecido en el protocolo de NZY Total RNA Isolation kit (NZYTech Lda. Genes and Enzymes, Lisboa, Portugal). Después de completarse el respectivo tratamiento, las muestras fueron tratadas con 350 µL de un buffer de lisis 1:100 (350 µL buffer NR y 3.5 µL de β-mercaptoetanol) y almacenadas a -80°C hasta el día de la extracción.

Este kit utiliza un tampón de lisis desnaturante con tiocianato de guanidina para inactivar a las ARNasas celulares y con ello, asegurar la recuperación del ARN intacto. Adicionalmente, el protocolo contempla la adición de etanol para favorecer la unión selectiva del ARN total a la columna de

membrana de sílice, lo que permite la eliminación eficiente de las impurezas mediante lavados. Finalmente, al añadir una solución de ADNasa I a la membrana de sílice, se eluye ARN de alta calidad en agua libre de ARNasas.

Las muestras obtenidas de ARN total purificado fueron cuantificadas con ayuda del NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher® Scientific Inc., MA, EE. UU.) y almacenadas a -80°C.

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La transcripción inversa o retrotranscripción convierte el ARN en ADN complementario (cDNA, por sus siglas en inglés), mediante la enzima transcriptasa inversa (RTasa). Dicho cDNA servirá como molde para la amplificación exponencial mediante PCR. Para ello, todas las muestras de ARN se homogenizaron a una concentración de 1 µg con agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µL, dentro de los cuales, 13.2 µL son de la muestra de ARN y 6.8 µL corresponden a la MasterMix (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). Esta última contiene 2 µL de buffer, 0.8 µL de dNTP's, 2 µL de cebadores aleatorios, 1 µL de inhibidor de ARNasas y 1 µL de RTasa, por muestra a analizar.

El programa de conversión de ARN total a cDNA se realizó en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems y consta de las siguientes etapas: 1) 10 minutos a 25°C, para la unión de los cebadores al molde; 2) 120 minutos a 37°C, tiempo durante el cual se realiza la transcripción inversa; y 3) 5 minutos a 85°C, para la desnaturalización de los cebadores.

Al finalizar dicho programa, todas las muestras fueron cuantificadas con ayuda del NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher® Scientific Inc., MA, EE. UU.) y almacenadas a 4°C.

4.6. PCR cuantitativa a tiempo real

Este tipo de PCR combina la amplificación por PCR y la detección de los productos en un solo paso, mediante el empleo de sondas fluorescentes para la detección de la fase exponencial de la reacción. Para este trabajo, se emplearon las sondas TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para los genes RAC1 (ID: Hs01902432_s1), MMP2 (ID: Hs01548727_m1), MMP9 (ID: Hs00957562_m1), ITGB3 (ID: Hs01001469_m1), HR (ID: Hs00218222_m1) y PRMT5 (ID: Hs01047345_g1), usando la sonda de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como referencia endógena (ID: Hs02786624_g1). Las sondas TaqMan® están marcadas con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) en el extremo 5' como colorante indicador y con un desactivador de fluorescencia (*quencher*, en inglés) en el extremo 3'.

La qPCR se realizó utilizando el sistema de PCR en tiempo real 7300 de Applied Biosystems. Todas las muestras se homogenizaron a una concentración de 200 ng con agua libre de nucleasas y se procesaron con un volumen final de 20 µL, de los cuales, 4 µL corresponden al cDNA y 16 µL, a una

solución con 10 µL de NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (2x) ROX plus (NZYtech Lda. Genes and Enzymes, Lisboa, Portugal), 1 µL de la sonda y 5 µL de agua libre de nucleasas, por muestra a analizar.

Para cada uno de los genes analizados, se contempló un control negativo NTC (*Non Template Control*, por sus siglas en inglés), que consistió en la adición de agua libre de nucleasas en lugar de los 4 µL de cDNA. Todas las muestras se realizaron por triplicado y fueron sometidas a un ciclo térmico con las siguientes etapas: 1) 2 minutos a 50°C; 2) 10 minutos a 95°C; 3) 50 repeticiones de 15 segundos a 95°C seguidas de 1 minuto a 60°C.

La expresión génica relativa en las líneas celulares HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42, para cada uno de los genes anteriormente especificados, se calculó mediante el método del umbral de ciclo o C_t (*Cycle Threshold*, por sus siglas en inglés) comparativo, referido a la expresión génica de GAPDH, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta Ct}$$

4.7. Ensayo de cicatrización de heridas

El ensayo de cicatrización de heridas es un método simple, económico y uno de los primeros en ser desarrollados para el estudio de la migración celular *in vitro* en dos dimensiones. Implica la creación de una “herida” en una monocapa celular por exclusión física o eliminando las células mediante daño mecánico, con la subsecuente captura de imágenes al principio y a intervalos regulares. La exposición al área libre de células, induce a estas últimas a migrar a dicho espacio hasta el cierre completo de la herida [61].

Para este ensayo, las líneas celulares de GBM, así como las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas humano y de carcinoma de colon humano, se sembraron en placas de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con una densidad de aproximadamente 16.000 células por pocillo. Se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C y 5% de CO₂, por 24 h. Después de este tiempo, se realizó una cicatriz en el centro de cada pocillo, utilizando una punta de pipeta de 10 µL.

Para eliminar las células que pudieran haber quedado en el centro de la cicatriz, se hicieron dos lavados con 100 µL de medio de cultivo DMEM-F12 (GBM) y DMEM con glucosa alta (adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon). Posteriormente, se añadieron 100 µL de colorante Hoescht (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, EE.UU.) a cada pocillo y la placa se mantuvo en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C, 5% de CO₂ y en la oscuridad, por 20 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se realizó un último lavado con el medio de cultivo correspondiente y se añadieron 200 µL por pocillo del tratamiento con el inhibidor químico de interés.

En lo que respecta a los ensayos de cicatrización con el siRNA de RAC1, el experimento se llevó a cabo en placas de 6 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con una densidad de 200.000 células por

pocillo. Se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C y 5% de CO₂, por 24 h. Después de este tiempo, se realizó el protocolo de transfección y 48 h después, se realizó el ensayo de cicatrización tal cual se ha descrito anteriormente.

Las placas fueron fotografiadas con ayuda del lector multimodal de microplacas Cytation™ 3 (BioTek Instruments Inc., EE.UU.) a tiempo 0 y pasadas 24 h, en el caso de GBM y a los tiempos 0, 24 h, 48 h y 72 h, en adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon. El área de la cicatriz a lo largo del tiempo fue obtenida con el complemento (*plugin*) para ImageJ, desarrollado por Suárez-Arnedo *et al.* [62].

4.8. Ensayo de invasividad

Se realizaron ensayos de invasividad en las líneas celulares de GBM, según el protocolo de Corning® BioCoat™ Growth Factor Reduced Matrigel® Invasion Chamber (Corning®, NJ, EE.UU.). Las cámaras de invasión GFR Matrigel tienen reducidos los niveles de factores de crecimiento EGF, PDGF e IGF-1, lo que permite el estudio de los mecanismos de invasión *in vitro* en un entorno complejo, pero relativamente bien definido. Para ello, los insertos precubiertos con proteínas de la matriz extracelular (Matrigel) a temperatura ambiente (20°C), fueron rehidratados con 500 µL de medio de cultivo DMEM con glucosa alta (Biowest, MO, EE.UU.) y se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C y 5% de CO₂, por 2 h.

Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 750 µL de quimioatrayente (DMEM suplementado con 5% de FBS; Biowest, MO, EE.UU.) a los pocillos de la cámara de invasión. El medio de cultivo previamente añadido a cada uno de los insertos se retiró y en su lugar, se añadieron 500 µL de una suspensión celular de 5x10⁴ células/mL con 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) tratada con el inhibidor químico NSC23766 y sin él como control. Los insertos tratados y los controles, se transfirieron a los pocillos de la cámara de invasión con quimioatrayente y se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a las condiciones anteriormente descritas, por 24 h.

La capacidad invasiva de las células de GBM fue inducida con la presencia del quimioatrayente, lo que permitió la degradación de la capa de Matrigel y su llegada a la membrana en cada uno de los insertos. Después de las 24 h, se utilizó un hisopo de algodón para frotar la superficie de la membrana del inserto y así conseguir remover las células no invasivas. Con una hoja de bisturí, se desprendieron todas las membranas y se observaron con el objetivo de 40X, en campo claro y con ayuda del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U, equipado con una cámara digital (Nikon DS-1QM).

Se tomaron fotografías de tres campos distintos por muestra y se realizó la cuenta de las células presentes. Este experimento se realizó por triplicado y se obtuvo el porcentaje de invasión de cada una de las líneas celulares con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ invasión} = \frac{\text{Promedio de células en los insertos tratados}}{\text{Promedio de células en los insertos control}}$$

4.9. Citometría de flujo (ciclo celular)

La citometría de flujo permite estimar los porcentajes de una población celular con base en la unión estequiométrica del reactivo de tinción al ADN. El análisis del recuento de células frente a la fluorescencia lineal, permite obtener un histograma de la distribución del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular. De este modo, las células que se encuentran en la fase S tendrán más ADN que las células en la fase G1, por lo que emitirán una mayor fluorescencia. Así mismo, las células en G2 emitirán aproximadamente dos veces más fluorescencia que las células en G1. El histograma típico de un ciclo celular se observa en la **Figura 3**.

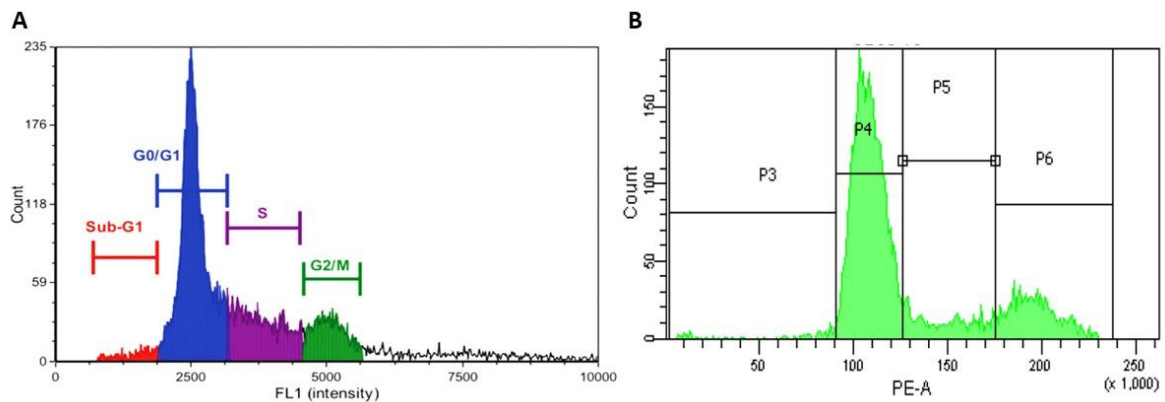


Figura 3. Histogramas representativos de los estudios del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestra un histograma de distribución del ADN en las fases del ciclo celular (A) [1] y el realizado en el IDiBE con la línea celular HGUE-GB-39 (B), empleando el citómetro de flujo BD FACSCanto™II (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). En ambos histogramas se utiliza yoduro de propidio como reactivo de tinción del ADN y se representan las fases subG1 (rojo/P3), G0/G1 (azul/P4), S (morado/P5) y G2/M (verde/P6). FL1: Filtro de paso de banda de 525 nm. PE: Ficoeritrina.

Las líneas celulares de GBM, adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon humanas, se sembraron en placas de 6 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con una densidad celular de aproximadamente 250.000 células por pocillo. Después del tratamiento correspondiente, se recolectaron mediante tripsinización con la subsecuente fijación en etanol frío al 75%, por mínimamente 30 minutos a 20°C.

Posteriormente, dichas células se sedimentaron mediante centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos y se resuspendieron en 400 µL (para las líneas celulares de GBM) o en 500 µL (para las líneas

celulares de adenocarcinoma de páncreas y de carcinoma de colón) de una solución compuesta de ARNasa A (25 µg/mL, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.), yoduro de propidio (25 ng/mL, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) para la tinción de ADN y para permeabilizar las células a la entrada de este último, se añadió Tritón X-100 al 0.5%. La ARNasa A y el Triton X-100 fueron diluidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Todas las muestras se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y fueron analizadas en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

4.10. Radioterapia

La radioterapia consiste en el empleo de radiación de alta energía para destruir a las células tumorales. Dicha radiación provoca un daño al ADN y, por consiguiente, evita que las células se dividan correctamente. El fraccionamiento de la dosis de radioterapia a lo largo del tiempo, es fundamental para permitir que los tejidos normales se reparen del daño [63].

Primeramente, se sembraron placas de 6 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con una densidad celular de 200.000 células por pocillo, las cuales, se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a 37°C y 5% de CO₂, por 24 h. La irradiación de las líneas celulares de GBM se realizó en la Unidad de Oncología Radioterápica del Hospital General Universitario de Elche. Para ello, todos los pocillos de la placa sembrada se cubrieron completamente con PBS 1X y se mantuvieron en un incubador con atmósfera controlada hasta el momento de ser sometidos a radioterapia. Ésta última se realizó en el acelerador lineal VARIANT 2100C, a una dosis de 7Gy. Las placas se mantuvieron en el incubador ESCO CelCulture CO₂ a las mismas condiciones anteriormente descritas, por 24 h. Finalmente, se procesaron para su análisis en el citómetro de flujo (ciclo celular).

4.11. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EE.UU.). Se realizó una estadística descriptiva, calculándose la media, el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés) y la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés) de los valores. Los resultados se reportan como la media ± SD de mínimamente tres experimentos realizados de manera independiente. Adicionalmente, para aquellos resultados en donde se estimó conveniente, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos y la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, para evaluar la asociación de variables.

5. RESULTADOS

5.1. Objetivo 1. Estudio del efecto de inhibidores químicos de RAC1 y PRMT5 mediante ensayos de viabilidad celular en líneas celulares de GBM

Los primeros experimentos que se realizaron fueron los ensayos de MTT con NSC23766 y EPZ015666, elegidos como inhibidores de la actividad de los genes RAC1 y PRMT5, respectivamente. La evaluación de dichos fármacos en las líneas celulares de GBM a diferentes concentraciones, se realizó con la finalidad de evaluar su efecto en la proliferación celular (**Figura 4**). De manera general, se observó que ambos compuestos tienen un efecto significativo superior en HGUE-GB-42, ya que la máxima inhibición de la proliferación fue del $51.19 \pm 5.63\%$ y del $37.47 \pm 5.24\%$ con NSC23766 y EPZ015666, respectivamente. En HGUE-GB-39, sólo se obtuvo un efecto significativo con NSC23766 a $150 \mu\text{M}$, concentración a la cual se consiguió inhibir la proliferación en un $22.07 \pm 4.85\%$. Con EPZ015666, la máxima inhibición de la proliferación fue del $23.05 \pm 3.97\%$ a $15 \mu\text{M}$. Esto parece indicar que HGUE-GB-42 es más sensible al efecto de ambos fármacos, sobre todo a NSC23766.

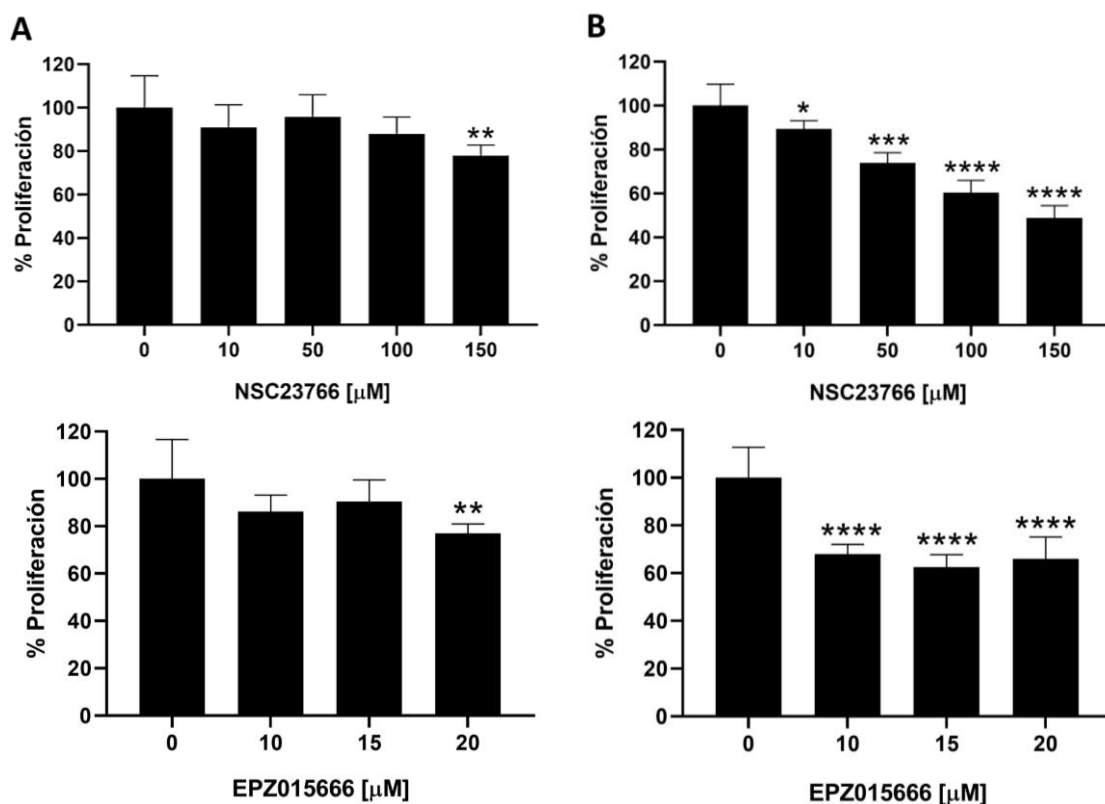


Figura 4. Ensayos de MTT a diferentes concentraciones de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 en las líneas celulares de GBM. Se muestran los resultados con la línea celular HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B). Todos los datos se presentan como la media \pm SD del porcentaje de células. * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.2. Objetivo 2. Validación de cada una de las tres potenciales dianas terapéuticas inhibiendo su expresión con siRNA

Con la finalidad de corroborar que los efectos observados con los inhibidores químicos de la actividad de RAC1 y PRMT5, NSC23766 y EPZ015666, respectivamente, son comparables con los efectos obtenidos mediante la inhibición de la expresión de dichos genes, se emplearon siRNAs específicos para los genes objetivo. Los efectos en la proliferación celular de la inhibición total de la expresión de dichos genes, se evaluó a través de un ensayo de MTT para ambas líneas celulares de GBM (**Figura 5**). Para todos los casos, los resultados se compararon con los obtenidos empleando un siRNA no específico (NS) como control negativo.

La inhibición de la expresión de la diana terapéutica obtenida con el respectivo siRNA y evaluada por qPCR fue satisfactoria y se comentará con detalle en el apartado 5.3.1. En la línea HGUE-GB-39, la inhibición de la proliferación con los siRNAs específicos fue del $26.07 \pm 1.90\%$, del $27.43 \pm 1.85\%$ y del $34.04 \pm 0.84\%$ para los genes RAC1, HR y PRMT5, respectivamente (**Figura 5A**). Por otro lado, en HGUE-GB-42 la inhibición de la proliferación fue del $7.85 \pm 5.95\%$, del $20.13 \pm 2.63\%$ y del $20.39 \pm 4.04\%$ para los genes RAC1, HR y PRMT5, respectivamente (**Figura 5B**). En lo que respecta al siRNA NS, este tiene un efecto similar al control en ambas líneas celulares de GBM. Por consiguiente, se puede afirmar que la inhibición de la proliferación se debe a la inhibición de la expresión de las dianas de interés con el respectivo siRNA.

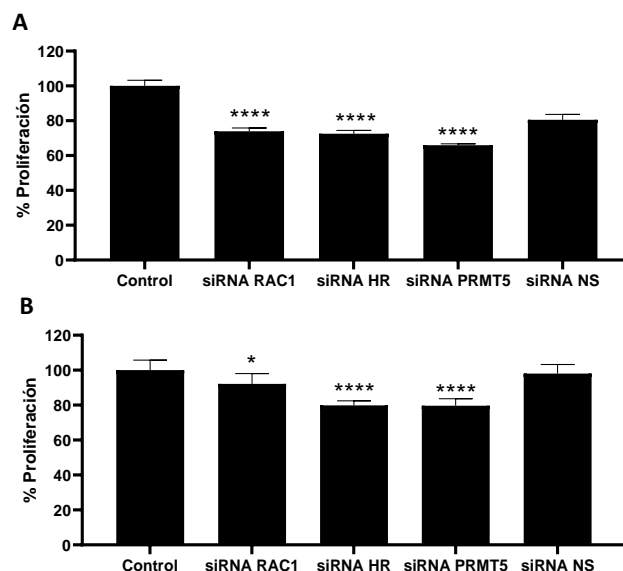


Figura 5. Ensayos de MTT con los siRNA de los genes RAC1, HR y PRMT5 en las líneas celulares de GBM. Se muestra la disminución del porcentaje de proliferación celular obtenido con las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B). El control es la línea celular sin transfectar y el control negativo, la transfección con siRNA NS. Todos los datos se presentan como la media \pm SD del porcentaje de células. * indica un valor de $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$.

5.3. Objetivo 3. Caracterización inicial de los mecanismos moleculares regulados por los genes de interés en GBM.

5.3.1. Uso de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666

La disminución de la proliferación celular puede deberse a un incremento de la muerte celular, o bien, a un bloqueo en el ciclo celular. Es por ello que, con la finalidad de profundizar los mecanismos moleculares regulados por las dianas de interés, se realizaron ensayos de ciclo celular en las líneas celulares de GBM.

En lo que respecta al gen PRMT5, el ensayo de ciclo celular se llevó a cabo inhibiendo su expresión con el respectivo siRNA. En la **Figura 6** se observa que su silenciamiento parece tener un efecto mínimo en la muerte celular en ambas líneas celulares de GBM respecto al control, con un ligero aumento de la fase subG1. Adicionalmente, en HGUE-GB-42 se observó la disminución de las fases S y G2/M. Dado que el siRNA NS aumenta ligeramente la fase S y que en el caso del siRNA de PRMT5 hay una pequeña bajada de la misma, parece desprenderse que el efecto más notable de la inhibición de este gen en ambas líneas de GBM es una disminución en la replicación del ADN que acontece en la fase S. Una pequeña disminución de las células ciclando en este tipo de experimentos (ciclo celular medido a 24 h), podría ser suficiente para explicar los efectos en la proliferación observados en los ensayos de MTT, en tres días de tratamiento, tanto con el inhibidor, como con la inhibición de la expresión con un siRNA.

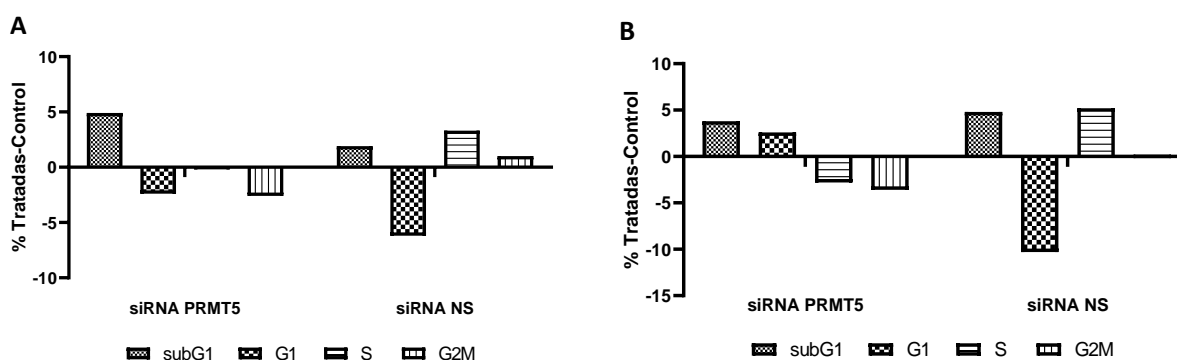


Figura 6. Ensayos de ciclo celular con el siRNA del gen PRMT5 en las líneas celulares de GBM. Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B). La información se reporta como el porcentaje de células tratadas con siRNA menos el porcentaje de células presentes en el control sin transfectar. El control negativo es la transfección con siRNA NS.

Debido a que los ensayos de ciclo celular no tienen la sensibilidad suficiente para observar pequeños cambios en la replicación del ADN, no se consideró apropiado llevarlos a cabo con las líneas celulares de GBM tratadas a diferentes concentraciones de EPZ015666.

Por otro lado, el ensayo de ciclo celular con NSC23766 se realizó evaluando una concentración baja y alta (10 μ M y 100 μ M, respectivamente) del inhibidor (**Figura 7**). De manera general no se observaron

diferencias notables con ambas líneas celulares de GBM, salvo el hecho de que nuevamente parece existir una bajada en la fase S respecto al control. Dados los efectos moderados en la proliferación celular observados en los ensayos de MTT y al no ser un efecto de muerte celular, los ensayos de ciclo celular no representan la mejor técnica para medir cambios en la replicación del ADN.

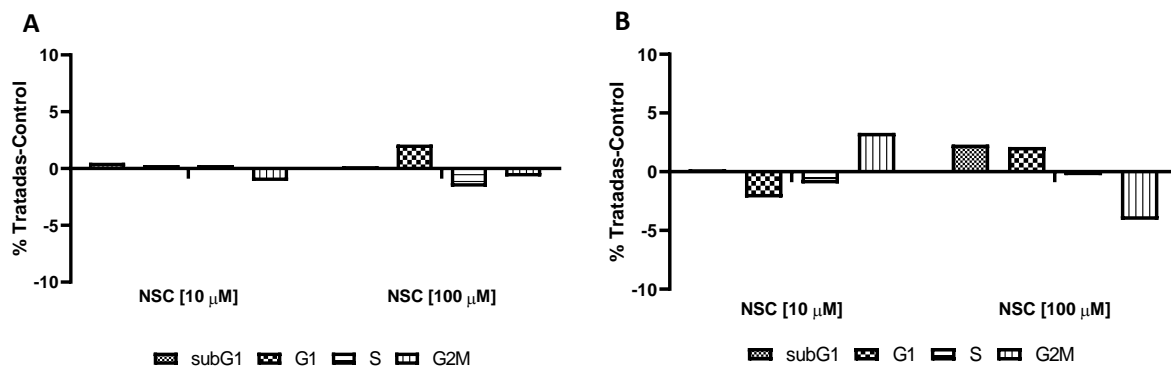


Figura 7. Ensayos de ciclo celular con el inhibidor químico NSC23766 en las líneas celulares de GBM. Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B), empleando NSC23766 (NSC) a 10 µM y 100 µM. La información se reporta como el porcentaje de células tratadas con el inhibidor menos el porcentaje de células presentes en el control (sin tratamiento).

El siguiente paso consistió en realizar qPCR para profundizar en los efectos que la inhibición de las tres probables dianas terapéuticas tiene en la expresión de otros genes de interés como MMP2, MMP9 e ITGB3, quienes codifican para la metaloproteasa 2, la metaloproteasa 9 y la integrina β3, respectivamente. Estos últimos genes se han visto implicados en mecanismos de adhesión, señalización e invasividad celular.

Como el estudio de la inhibición del gen RAC1 está dirigido a dilucidar su posible papel en los mecanismos de invasividad celular, se profundizó en esta diana terapéutica evaluando el efecto de la inhibición de su expresión con el siRNA RAC1 en los mismos genes de interés (**Figuras 8 y 9**).

En las **Figuras 8A y 9A**, se corrobora la inhibición satisfactoria específica de la expresión del gen RAC1 para ambas líneas celulares de GBM por el siRNA correspondiente, la cual debe ser mínimamente del 80%. En los experimentos realizados se logró un silenciamiento del gen RAC1 del $94.9 \pm 0.83\%$ en HGUE-GB-39 y del $96.48 \pm 0.49\%$ en HGUE-GB-42. Se observó que la inhibición del gen RAC1 incrementó significativamente la expresión relativa de MMP2 en ambas líneas celulares (**Figuras 8B y 9B**). Adicionalmente, la expresión del gen PRMT5 disminuyó significativamente en HGUE-GB-39 (**Figura 8E**) y la expresión del gen MMP9 incrementó significativamente en HGUE-GB-42 (**Figura 9C**).

Partiendo de la inhibición satisfactoria del gen RAC1 con el siRNA, se procedió a realizar la qPCR para evaluar el efecto de su inhibidor químico, NSC23766. Asimismo, esto último también se llevó a cabo con EPZ015666.

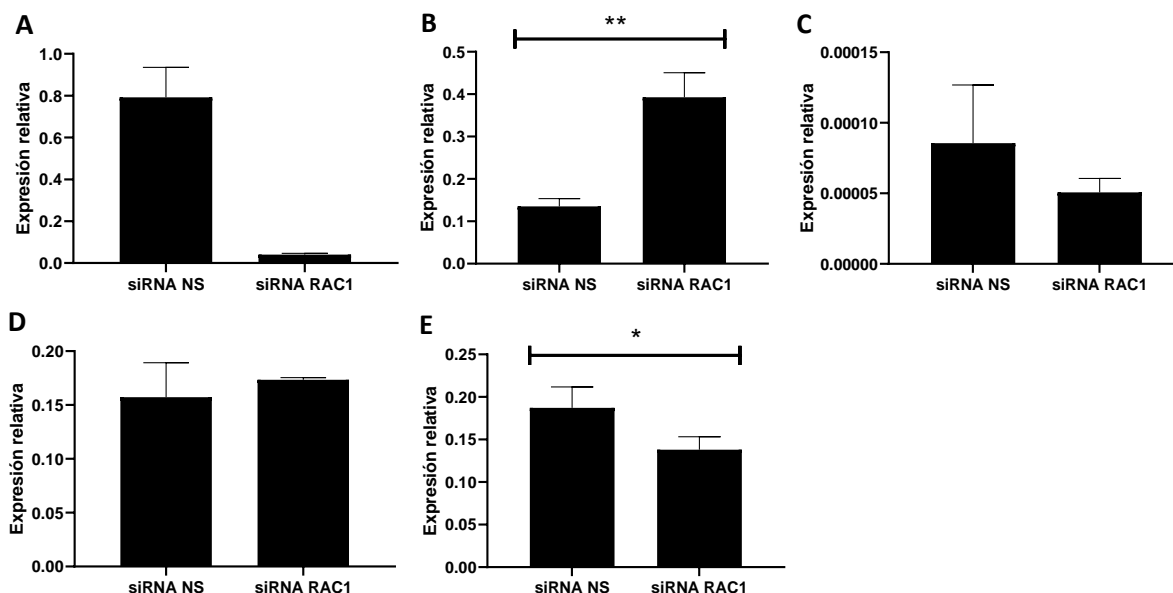


Figura 8. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-39 transfectada con el siRNA de RAC1. Se muestra la validación de la inhibición de la expresión del gen RAC1 (A) y su efecto en la expresión de los genes MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D) y PRMT5 (E). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Se considera a siRNA NS como control negativo. Los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

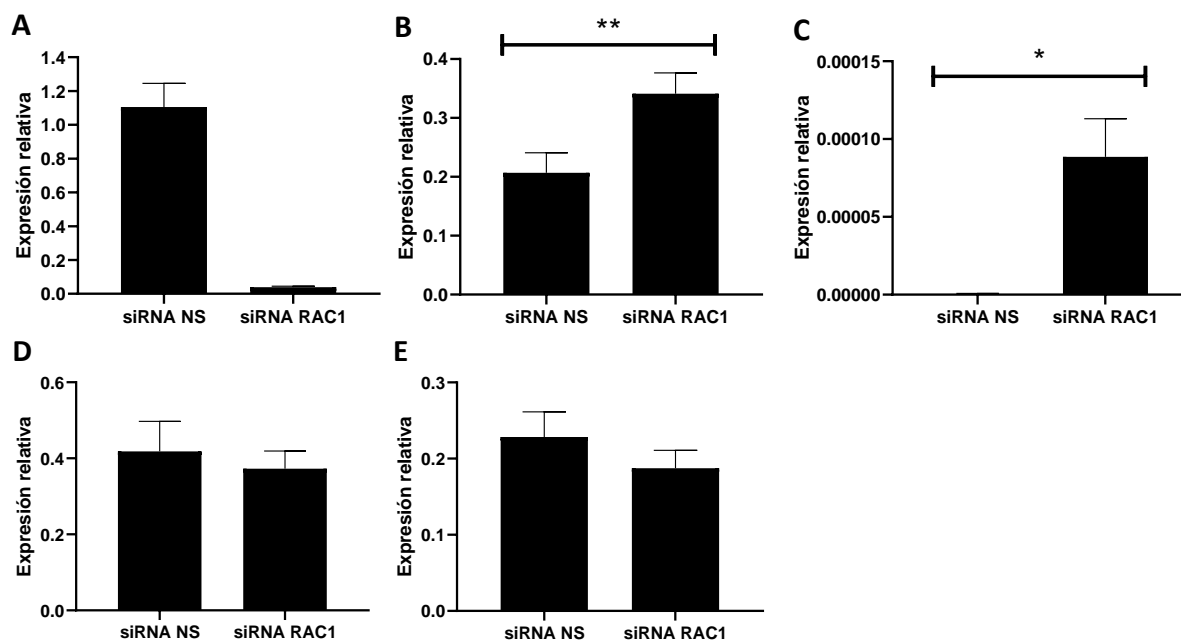


Figura 9. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-42 transfectada con el siRNA de RAC1. Se muestra la validación de la inhibición de la expresión del gen RAC1 (A) y su efecto en la expresión de los genes MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D) y PRMT5 (E). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Se considera a siRNA NS como control negativo. Los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

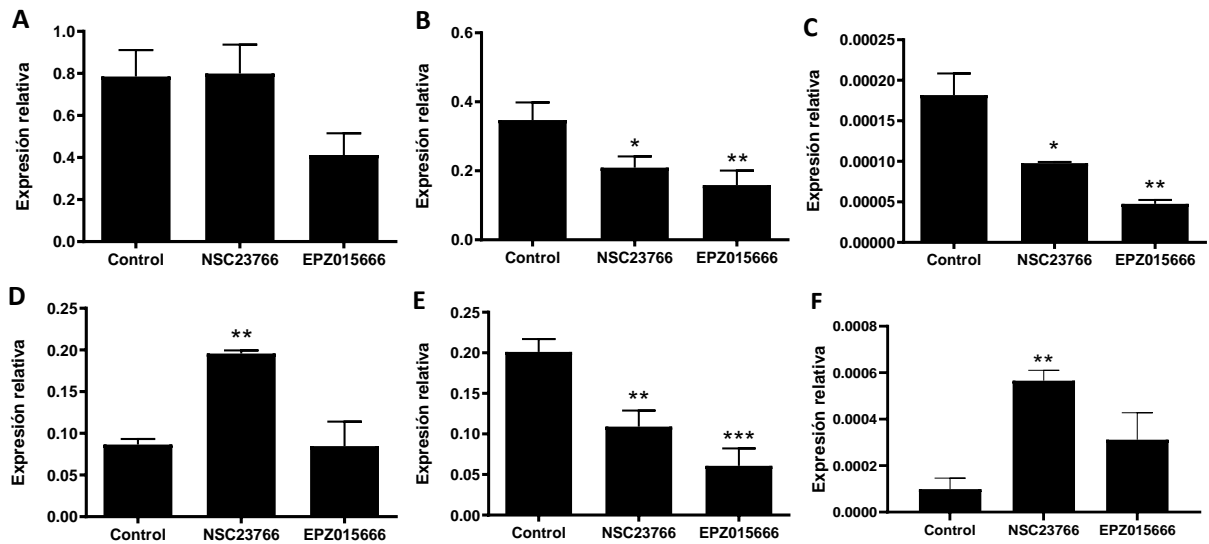


Figura 10. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-39 tratada con los inhibidores NSC23766 y EPZ015666. Se muestra el efecto de los inhibidores NSC23766 (a 50 μ M) y EPZ015666 (a 10 μ M) en la expresión de los genes RAC1 (A), MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D), PRMT5 (E) y HR (F). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

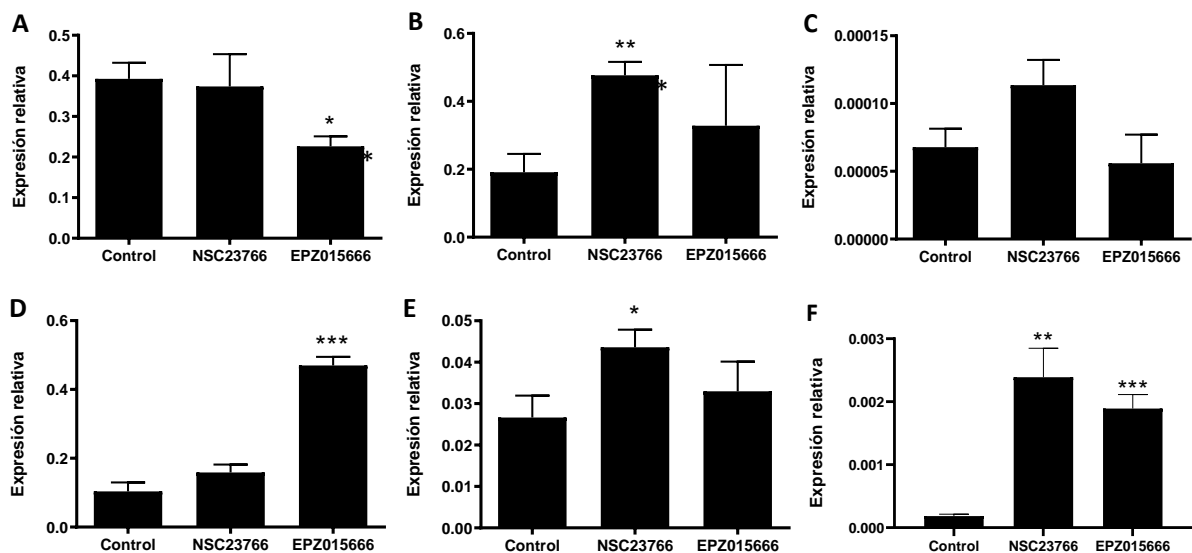


Figura 11. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-42 tratada con los inhibidores NSC23766 y EPZ015666. Se muestra el efecto de los inhibidores NSC23766 (a 50 μ M) y EPZ015666 (a 10 μ M) en la expresión de los genes RAC1 (A), MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D), PRMT5 (E) y HR (F). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En la **Figuras 10 y 11** se observan los gráficos comparativos del efecto observado con NSC23766 a 50 μM y EPZ015666 a 10 μM . Se observó que en la línea celular HGUE-GB-39, hubo una disminución significativa de la expresión de los genes MMP2, MMP9 y PRMT5 con ambos inhibidores, siendo mayor el efecto con EPZ015666 (**Figuras 10B, 10C, 10E**). Adicionalmente, NSC23766 incrementó significativamente la expresión de los genes ITGB3 y HR (**Figuras 10D, 10F**).

En HGUE-GB-42, NSC23766 incrementó significativamente la expresión de los genes MMP2, PRMT5 y HR (**Figuras 11B, 11E, 11F**) y en lo que respecta a EPZ015666, este inhibidor incrementó significativamente la expresión de los genes ITGB3 y HR (**Figuras 11D, 11F**) y disminuyó significativamente la expresión del gen RAC1 (**Figura 11A**). Estos resultados indican que los efectos obtenidos son dependientes del contexto celular y que sería deseable en el futuro validar los resultados a nivel de expresión de las proteínas correspondientes.

A partir de las diferencias halladas en la expresión de los genes MMP2 y MMP9 vinculadas a la inhibición del gen RAC1, se tomó la decisión de realizar ensayos de invasividad en Matrigel GFR. Para este ensayo, se evaluaron dos concentraciones intermedias de NSC23766, 25 μM y 50 μM , en ambas líneas celulares de GBM. A esta última concentración se obtuvo un porcentaje de invasión significativamente inferior en la línea celular HGUE-GB-42, el cual fue de 75.30% \pm 4.92% (**Figura 12A**).

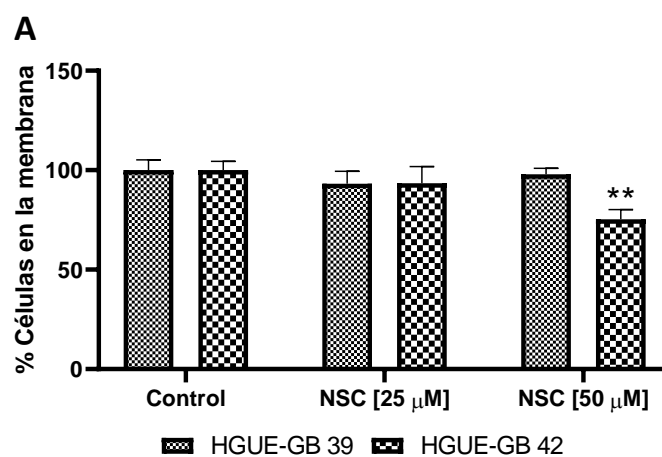


Figura 12. Ensayo de invasividad en Matrigel con las líneas celulares de GBM. Se muestra el porcentaje de células presentes en la membrana del inserto, con las líneas celulares HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 tratadas con NSC23766 a 25 μM y 50 μM . Se considera como control a las líneas celulares sin tratamiento. Todos los datos se presentan como la media \pm SD del porcentaje de células. ** indica un valor de $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El gen RAC1, además de ser reportado en la bibliografía con un papel importante en la invasividad celular, también parece estar implicado en la migración celular.

Para evaluar el posible efecto de NSC23766 en este último mecanismo, se llevaron a cabo ensayos de cicatrización con ambas líneas celulares de GBM. Tomando en cuenta lo observado en el experimento anterior, se decidió evaluar el efecto a 50 μM y a una concentración inferior (25 μM) y

superior (100 μM). Los resultados se compararon con los obtenidos al inhibir la expresión del gen RAC1 con el siRNA específico para dicho gen.

En la **Figura 13** se observa que el siRNA del gen RAC1 inhibió la migración celular en ambas líneas celulares de GBM después de 24 h. También se observa que el control negativo siRNA NS no interfirió con el proceso de migración celular, ya que en ambas líneas celulares de GBM se observó el cierre de la cicatriz. En lo que respecta a HGUE-GB-39, todos los pocillos tratados con NSC23766 cerraron la cicatriz al cabo de 24 h (**Figura 13A**). Únicamente se observó un ligero efecto del inhibidor en HGUE-GB-42 a 50 μM , similar al observado con el siRNA de RAC1 (**Figura 13B**).

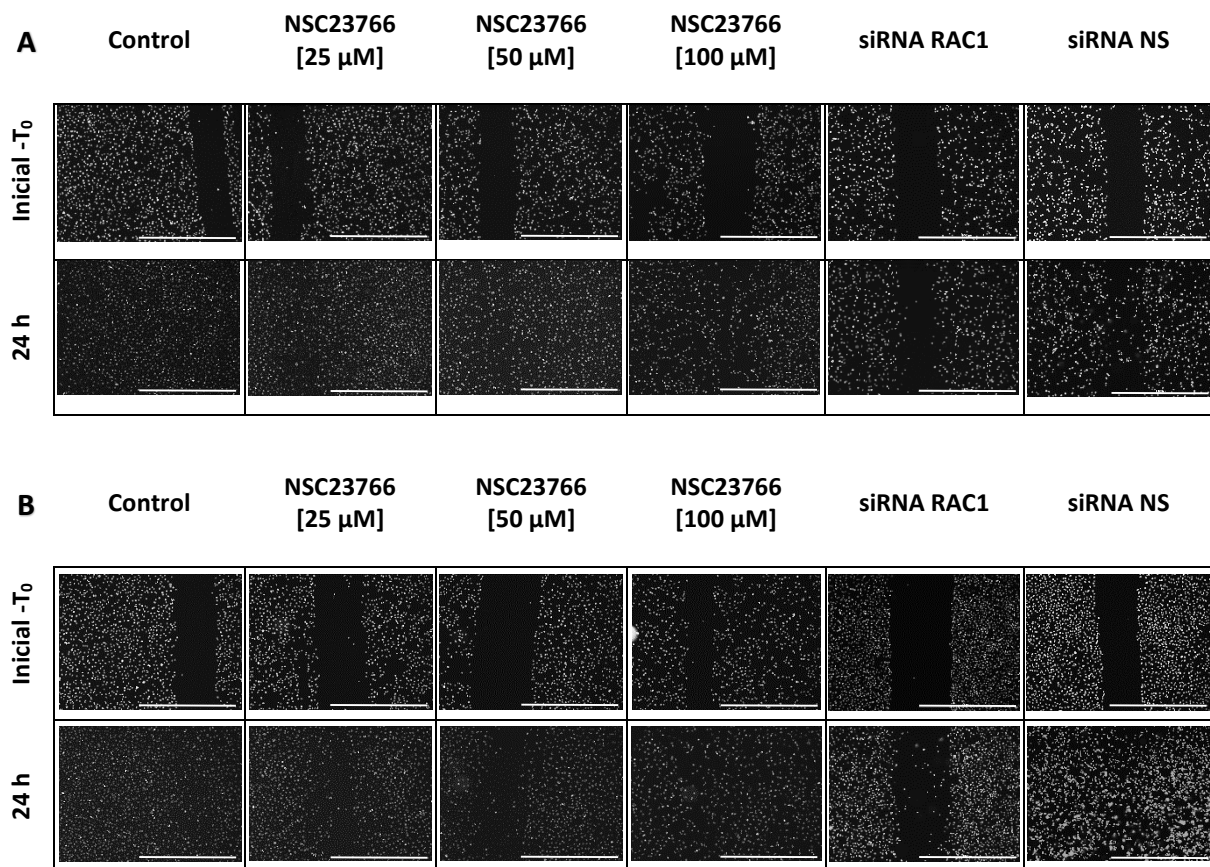


Figura 13. Ensayos de cicatrización con las líneas celulares de GBM. Se muestran las fotografías al inicio (T_0) y después de 24 h del ensayo de cicatrización empleando NSC23766 como inhibidor de RAC1, a 25 μM , 50 μM y 100 μM en las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B). Se considera como control a la línea celular sin tratamiento. La inhibición de la expresión del gen RAC1 con el siRNA representa el control positivo y se muestra su respectivo control negativo, la transfección con siRNA NS. Barra de escala: 1000 μM .

El hecho de no haber conseguido un efecto relevante con los inhibidores NSC23766 y EPZ15666 en las líneas celulares de GBM, hizo considerar la posibilidad de evaluar su efecto en otros tipos de cáncer, como el adenocarcinoma de páncreas y el carcinoma de colon. Estos tipos de cáncer son considerados, al igual que GBM, neoplasias de muy mal pronóstico. Adicionalmente, comparten el hecho de ser

invasivos y de estar vinculados con una transición EMT, tal como se abordó en la introducción del presente trabajo.

Siguiendo la misma línea de trabajo planteada para las líneas celulares de GBM, se realizaron ensayos de MTT en las líneas celulares de carcinoma de colon (SW-480, HT29) y adenocarcinoma de páncreas (Hs766T, RWP-1), para corroborar que, en efecto, existiera una mayor disminución de la proliferación celular que la observada en las líneas celulares de GBM (**Figura 4**).

En lo que respecta a las líneas celulares de carcinoma de colon, se observó un mayor efecto con el inhibidor NSC23766, obteniéndose una IC50 de 47.16 μ M para la línea celular SW-480 y una IC50 de 64.45 μ M para la línea celular HT29. En adenocarcinoma de páncreas, con NSC23766 se obtuvo una IC50 de 101.2 μ M en la línea celular Hs766T y una IC50 de 32.73 μ M en la línea celular RWP-1 (**Figura 14**).

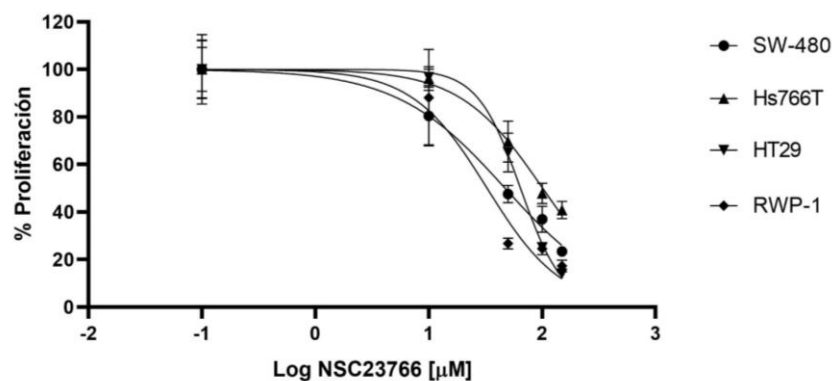


Figura 14. Efecto del inhibidor NSC23766 en carcinoma de colon y adenocarcinoma de páncreas. Se representa el porcentaje de proliferación celular frente al logaritmo de la concentración del inhibidor NSC23766 para el cálculo de la IC50 en las líneas celulares de carcinoma de colon humano (SW-480, HT29) y adenocarcinoma de páncreas humano (Hs766T, RWP-1). Todos los datos se presentan como la media \pm SD del porcentaje de células.

Por su parte, con EPZ015666 se obtuvieron efectos significativos tanto en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas como en las líneas celulares de carcinoma de colon (**Figura 15**). La inhibición máxima de la proliferación celular fue del $33.12 \pm 3.48\%$, del $52.79 \pm 8.11\%$, del $37.70 \pm 5.83\%$ y del $37.62 \pm 8.82\%$ para las líneas celulares Hs766T, RWP-1, SW-480 y HT29, respectivamente.

Con la intención de profundizar en el mecanismo de acción de los inhibidores químicos NSC23766 y EPZ015666 en estas líneas celulares, también se llevaron a cabo ensayos de ciclo celular (**Figura 16**). Con NSC23766, en la línea SW-480 se observó un pequeño aumento de la fase S y una disminución del resto de las fases. Por el contrario, EPZ015666 incrementó ligeramente la fase G1 y disminuyó la fase S (**Figura 16A**). En HT29, NSC23766 y EPZ015666 causaron un efecto similar, incrementando las fases G1, S y disminuyendo la fase G2/M. (**Figura 16B**).

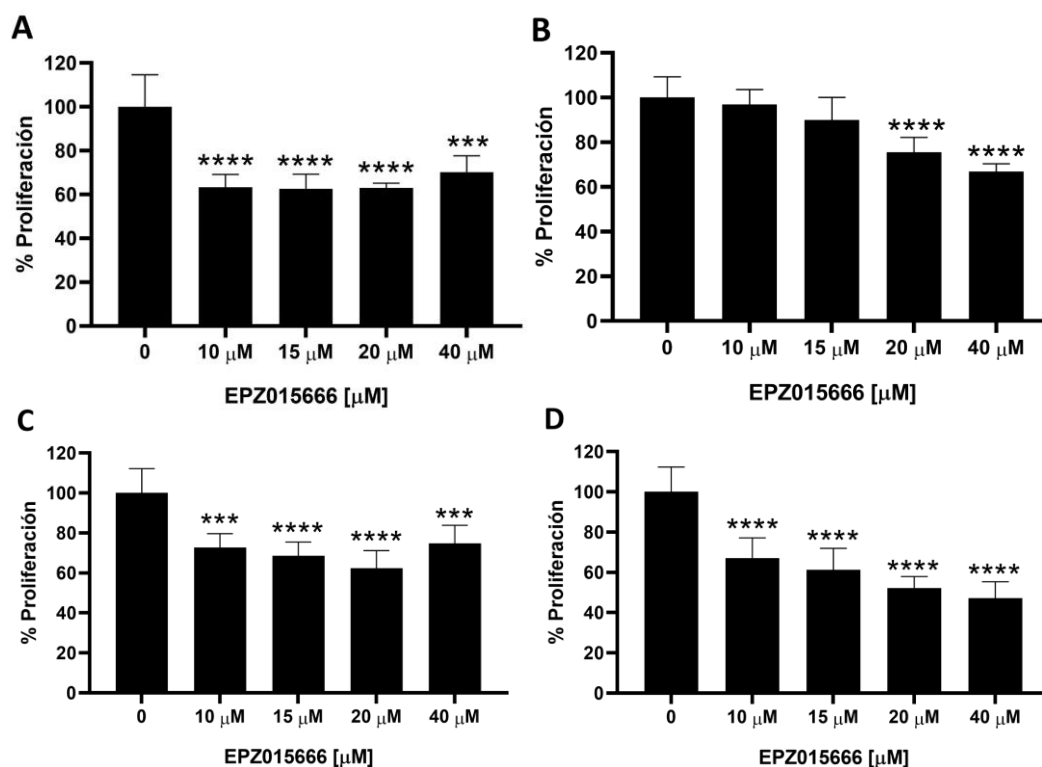


Figura 15. Ensayos de MTT a diferentes concentraciones de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 en las líneas celulares de carcinoma de colon y adenocarcinoma de páncreas. Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares SW-480 (A), Hs766T (B), HT-29 (C) y RWP-1 (D). Todos los datos se presentan como la media \pm SD del porcentaje de células. *** indica $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$.

En lo que respecta a las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas, en ambas se observa que los inhibidores químicos provocaron cambios mínimos de las fases G1 y S. (Figuras 16C y 16 D). Pese a los cambios mencionados con anterioridad, en general no se observó un efecto notable de estos inhibidores químicos.

Con la experiencia obtenida con las líneas celulares de GBM, se decidió realizar el ensayo de cicatrización con NSC23766 a 50 μ M, para evaluar el posible efecto en la migración celular en las líneas celulares de carcinoma de colon (Figura 17), y de adenocarcinoma de páncreas (Figura 18). Los ensayos de cicatrización para ambos tipos de cáncer se realizaron a 24 h, 48 h y 72 h. La razón por la cual los experimentos se mantuvieron por todo ese tiempo, fue para observar si en algún momento se conseguía que los controles cerraran completamente.

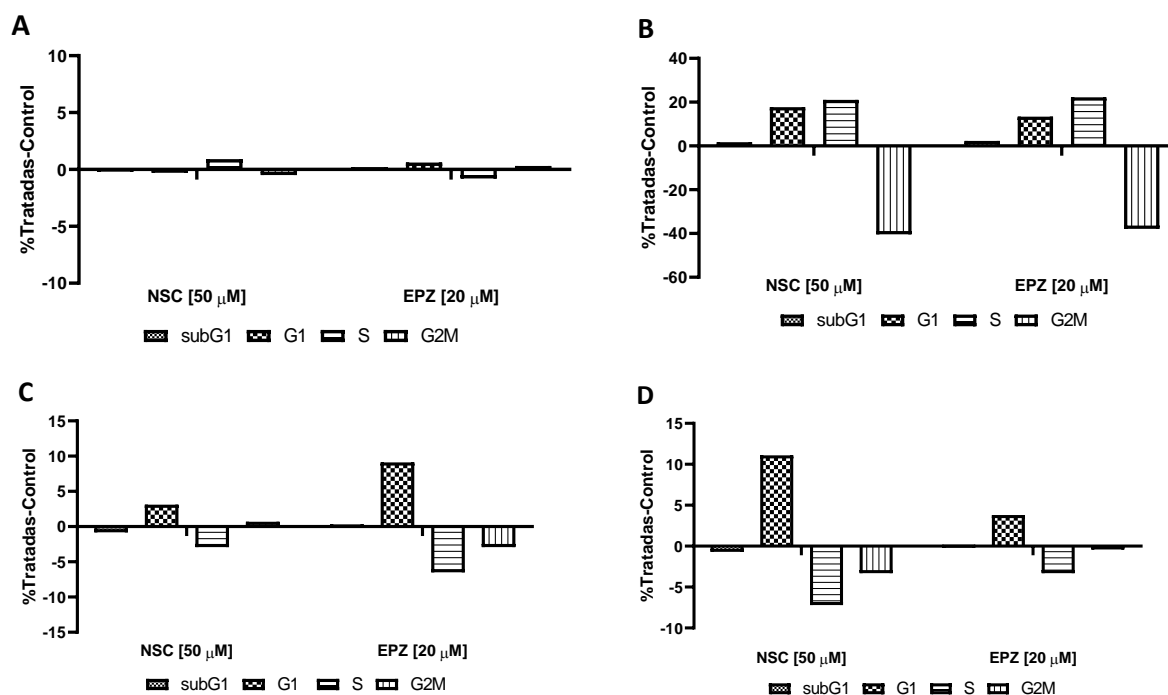


Figura 16. Ensayos de ciclo celular en líneas celulares de carcinoma de colon y adenocarcinoma de páncreas.

Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares SW-480 (A), HT29 (B), Hs766T (C) y RWP-1 (D), tratadas con NSC23766 (NSC) a 50 μ M y EPZ015666 (EPZ) a 20 μ M. La información se reporta como el porcentaje de células tratadas con el respectivo inhibidor menos el porcentaje de células presentes en el control (sin tratamiento).

En lo que respecta a la línea celular SW-480, se observó que a las 24 h el cierre de la cicatriz tratada con NSC23766 fue menor en comparación al control. Por otro lado, la cicatriz permaneció prácticamente igual en la línea celular HT29, con la diferencia de que se observó una disminución en la cantidad de células presentes en los pocillos tratados con el inhibidor, en comparación con los controles (**Figura 17**). Esto puede atribuirse al efecto en la proliferación celular observado en el MTT (**Figura 14**).

Cuando el ensayo de cicatrización se realizó para adenocarcinoma de páncreas, únicamente se observó un efecto de NSC23766 en la línea celular RWP-1. En esta última línea, la cicatriz prácticamente permanece igual en los pocillos tratados con el inhibidor, a diferencia de los controles, en los cuales la cicatriz se va cerrando a medida que transcurre el tiempo (**Figura 18**).

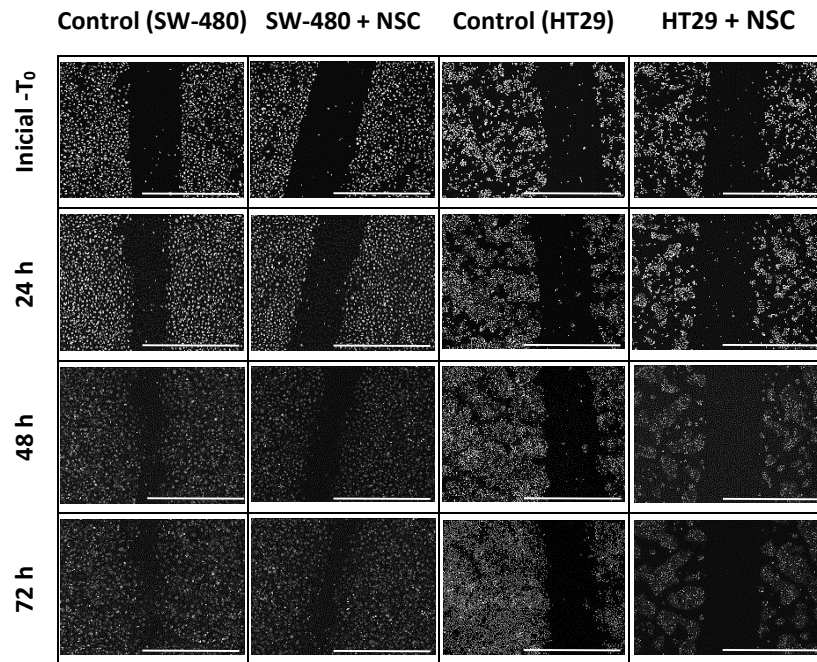


Figura 17. Ensayo de cicatrización con las líneas celulares de carcinoma de colon. Se muestran las fotografías al inicio (T₀) y después de 24 h, 48 h y 72 h con las líneas celulares SW-480 y HT29 empleando NSC23766 (NSC) como inhibidor de RAC1 a 50 μM. El control es la línea celular sin tratamiento. Barra de escala: 1000 μM.

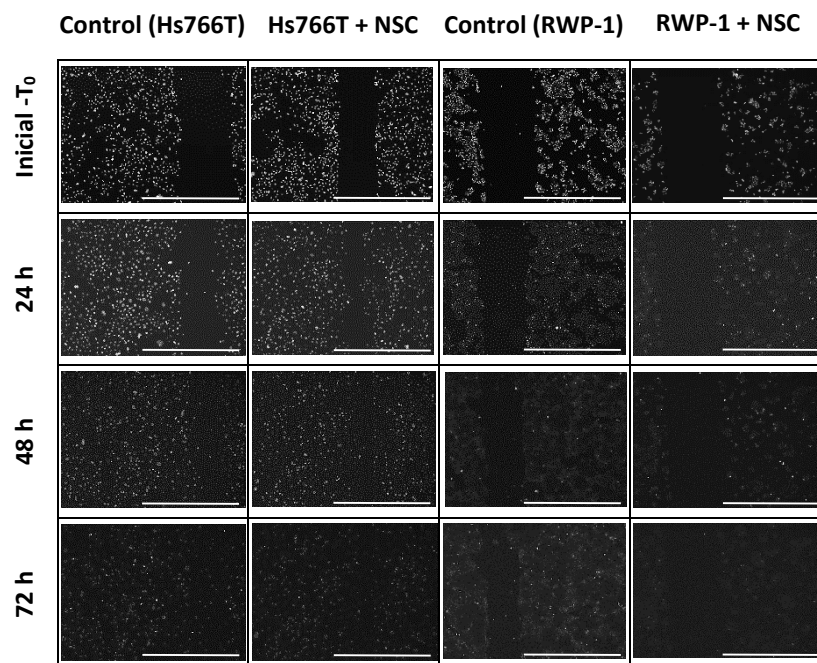


Figura 18. Ensayo de cicatrización con las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas. Se muestran las fotografías al inicio (T₀) y después de 24 h, 48 h y 72 h con las líneas celulares Hs766T y RWP-1 empleando NSC23766 (NSC) como inhibidor de RAC1 a 50 μM. El control es la línea celular sin tratamiento. Barra de escala: 1000 μM.

5.3.2. Inhibición de la expresión del gen HR con siRNA

5.3.2.1. Silenciamiento del gen HR en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Ante la falta de un inhibidor químico para el estudio del gen HR, se llevó a cabo su silenciamiento con el siRNA específico para este gen en las líneas celulares de GBM.

En las **Figuras 19A y 20A**, se observa la inhibición satisfactoria de la expresión del gen HR, la cual fue del $89.41 \pm 8.66\%$ para HGUE-GB-39 y del $93.91 \pm 2.50\%$ para HGUE-GB-42. Adicionalmente, se observó un aumento significativo de la expresión del gen MMP9 en ambas líneas celulares de GBM, el cual, es superior en HGUE-GB-39 (**Figuras 19C y 20C**).

Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de los genes MMP2 e ITGB3 en HGUE-GB-42 (**Figuras 20B y 20D**) y un ligero aumento de la expresión del gen ITGB3 en HGUE-GB-39 (**Figura 19D**), aunque estos cambios no fueron significativos.

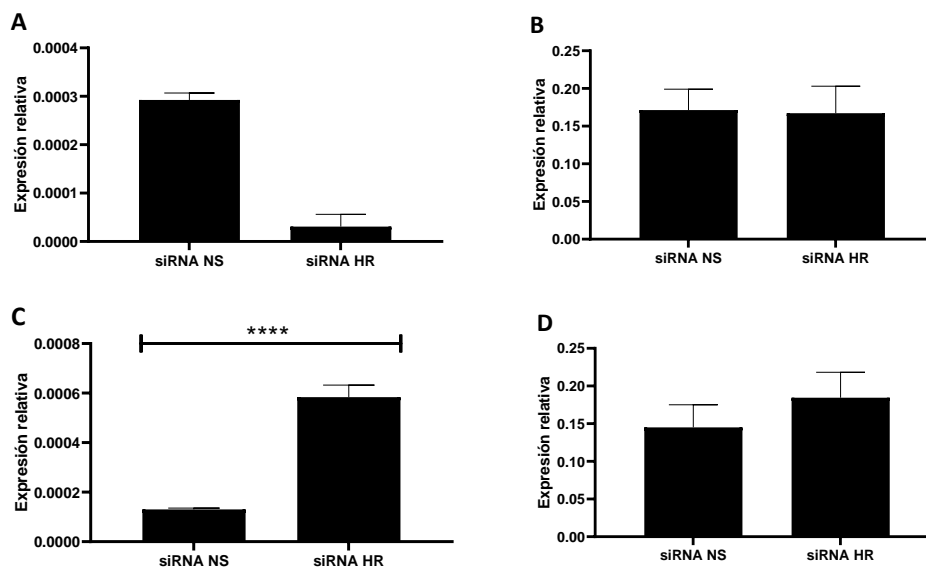


Figura 19. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-39 transfectada con el siRNA de HR. Se muestra la validación de la inhibición de la expresión del gen HR (A) y su efecto en la expresión de los genes MMP2 (B), MMP9 (C) e ITGB3 (D). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Se considera a siRNA NS como control negativo. Todos los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. **** indica $p < 0.0001$.

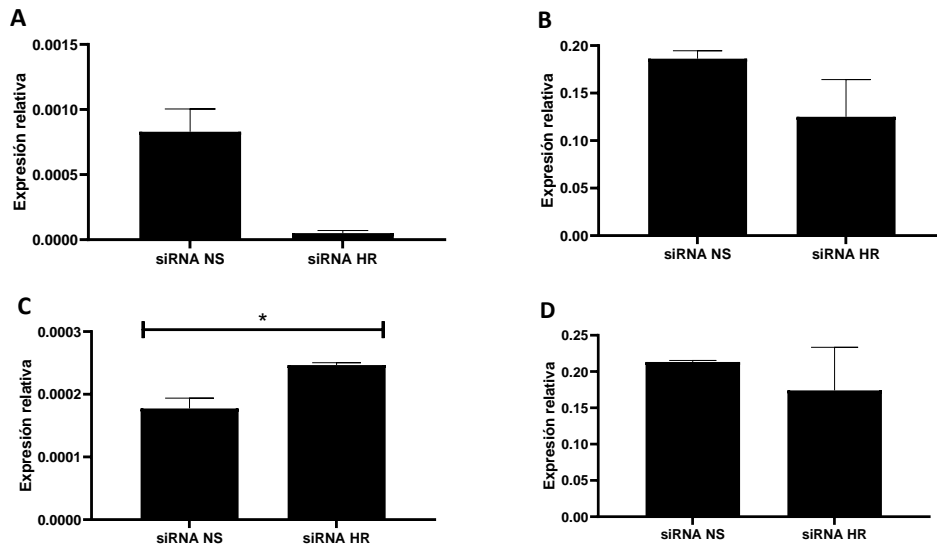


Figura 20. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-42 transfectada con el siRNA de HR. Se muestra la validación de la inhibición de la expresión del gen HR (A) y su efecto en la expresión de los genes MMP2 (B), MMP9 (C) e ITGB3 (D). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Se considera a siRNA NS como control negativo. Todos los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica $p < 0.05$.

5.3.2.2. Silenciamiento del gen HR en líneas celulares de carcinoma de colon y adenocarcinoma de páncreas

Habiendo analizado el efecto de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas y de carcinoma de colon, también se decidió evaluar el posible efecto del silenciamiento del gen HR en la proliferación de dichas líneas celulares, sobre todo después de que la búsqueda en la base de datos UALCAN mostrara que este gen se encuentra significativamente sobreexpresado en adenocarcinoma de páncreas (**Figura 21A**).

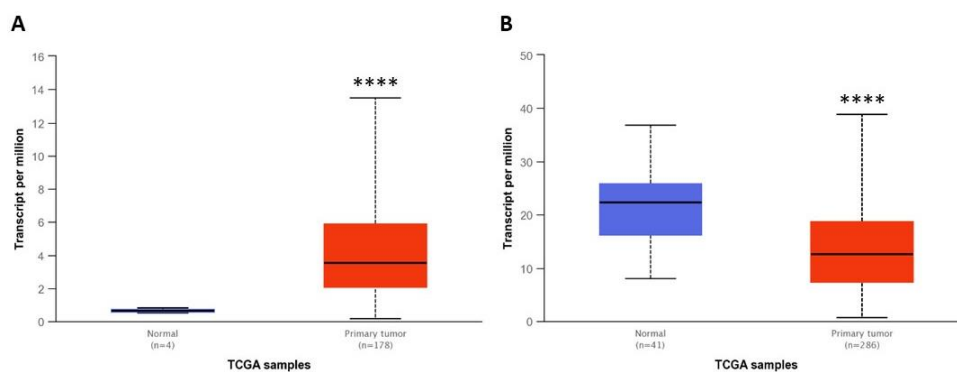


Figura 21. Datos de expresión obtenidos a partir de la base de datos UALCAN. Se muestra la expresión del gen HR en transcritos por millón en pacientes con adenocarcinoma de páncreas (rojo) en comparación al páncreas considerado normal (azul) (A) y en pacientes con carcinoma de colon (rojo) en comparación al colon considerado normal (azul) (B). **** indica $p < 0.0001$.

En lo que respecta a carcinoma de colon, se observó que existe un decremento en la expresión del gen HR similar al observado en GBM, con la diferencia de que en este tipo de cáncer dicha disminución si es significativa (**Figura 21B**).

El ensayo de MTT realizado con el siRNA de HR (**Figura 22**), mostró una inhibición significativa de la proliferación celular del $12.77 \pm 5.52\%$, del $12.58 \pm 2.35\%$ y del $11.60 \pm 4.43\%$ en las líneas celulares Hs766T, RWP-1 y SW-480, respectivamente. En la línea celular HT29 no se observó un cambio importante respecto al control.

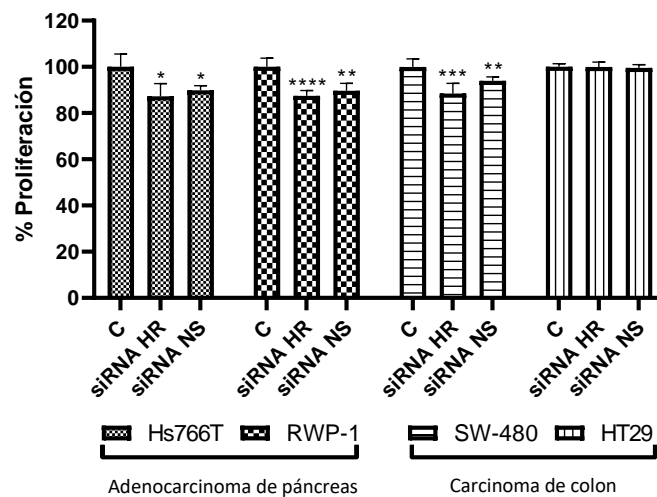


Figura 22. Ensayo de MTT con el siRNA del gen HR en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon. Se muestra la disminución del porcentaje de proliferación en las líneas celulares Hs766T, RWP-1, SW-480 y HT29. Se considera como control a la línea celular sin transfectar y como control negativo a la línea celular transfectada con el siRNA NS. Todos los datos se presentan como la media \pm SD del porcentaje de células. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.4. Objetivo 4. Determinación de como la inhibición de las dianas terapéuticas se combina con las terapias clásicas y otros fármacos de interés en este tipo de tumores

5.4.1. Inhibición de los genes RAC1 y PRMT5 en combinación con el tratamiento con carmustina y otros fármacos de interés

Para dilucidar los mecanismos que hacen a las células de GBM resistentes al tratamiento con las terapias clásicas, es importante conocer algunas de las variaciones existentes en los cultivos celulares resistentes frente a los cultivos en condiciones normales. Para ello, se realizó una qPCR con una línea de HGUE-GB-39 resistente a carmustina (R-BCNU), y se comparó la expresión relativa de los genes de interés previamente mencionados frente a la obtenida con la línea celular parental, como control. Cuando la línea celular es resistente a carmustina (BCNU), se observó un incremento significativo de la

expresión relativa de los genes MMP2, MMP9, ITGB3 y HR. Por el contrario, hubo una disminución significativa de la expresión relativa del gen RAC1 (**Figura 23**).

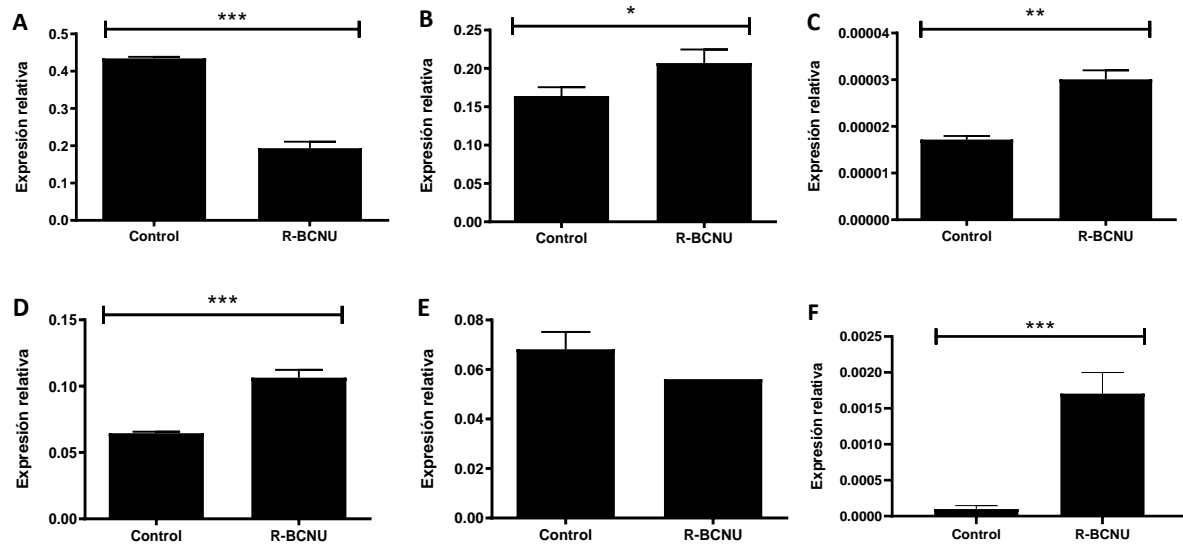


Figura 23. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-39 resistente a carmustina. Se muestra la variación de la expresión de los genes RAC1 (A), MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D), PRMT5 (E) y HR (F) en la línea celular HGUE-GB-39 resistente a carmustina (R-BCNU) frente a la línea celular parental. En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Todos los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Conociendo de antemano algunos de los genes que podrían estar correlacionados con la adquisición de posibles mecanismos de resistencia al tratamiento con BCNU, resultó importante evaluar el efecto normal o esperado en las líneas celulares de GBM. Por consiguiente, el siguiente paso consistió en realizar una qPCR para cada línea celular, evaluando el efecto no sólo de BCNU, sino también de otro fármaco prometedor: verteporfina (VPF). Este fármaco, derivado de benzoporfirina, es normalmente utilizado para el tratamiento fotodinámico de la degeneración macular. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que su uso inhibe el volumen, el crecimiento y la expresión de YAP del tumor, en una amplia variedad de modelos de xenoinjerto y de manera independiente a la fotoactivación [64, 65].

En HGUE-GB-39, se observó que el tratamiento con VPF incrementó la expresión relativa de todos los genes, particularmente de MMP2, MMP9, ITGB3, PRMT5 y HR (**Figuras 24B, 24C, 24D, 24E y 24F**) donde dicha expresión fue significativamente superior al control. Por otro lado, el tratamiento con BCNU disminuyó significativamente la expresión relativa de los genes RAC1, MMP9, ITGB3 y PRMT5, (**Figuras 24A, 24C, 24D, 24E**) e incrementó significativamente la expresión del gen HR, respecto al control (**Figura 24F**).

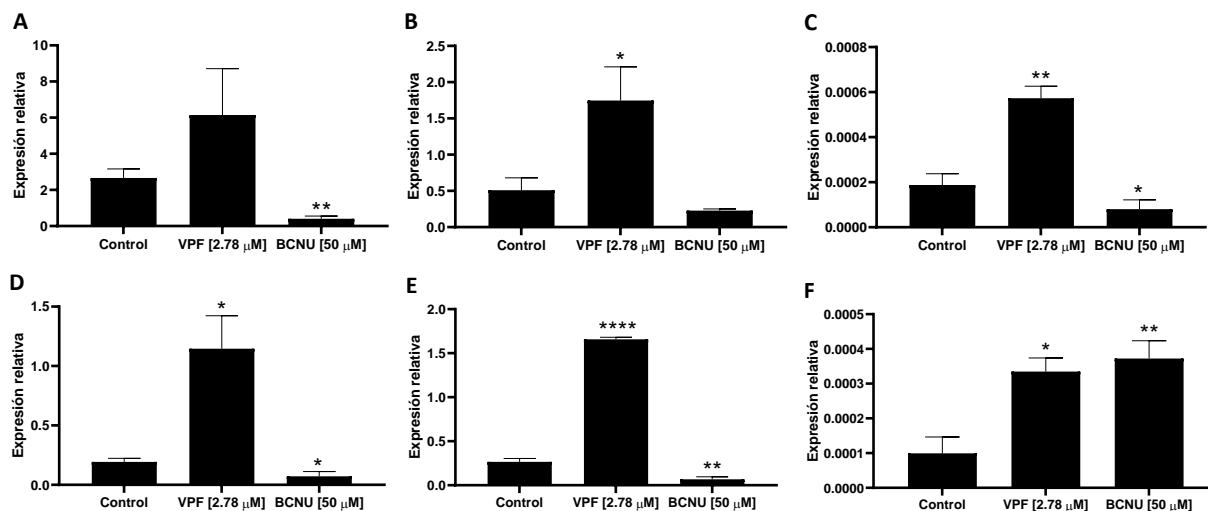


Figura 24. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-39 tratada con carmustina y verteporfin. Se muestra el efecto de la carmustina (BCNU) a 50 μ M y verteporfin (VPF) a 2.78 μ M en la expresión de los genes RAC1 (A), MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D), PRMT5 (E) y HR (F). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Todos los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

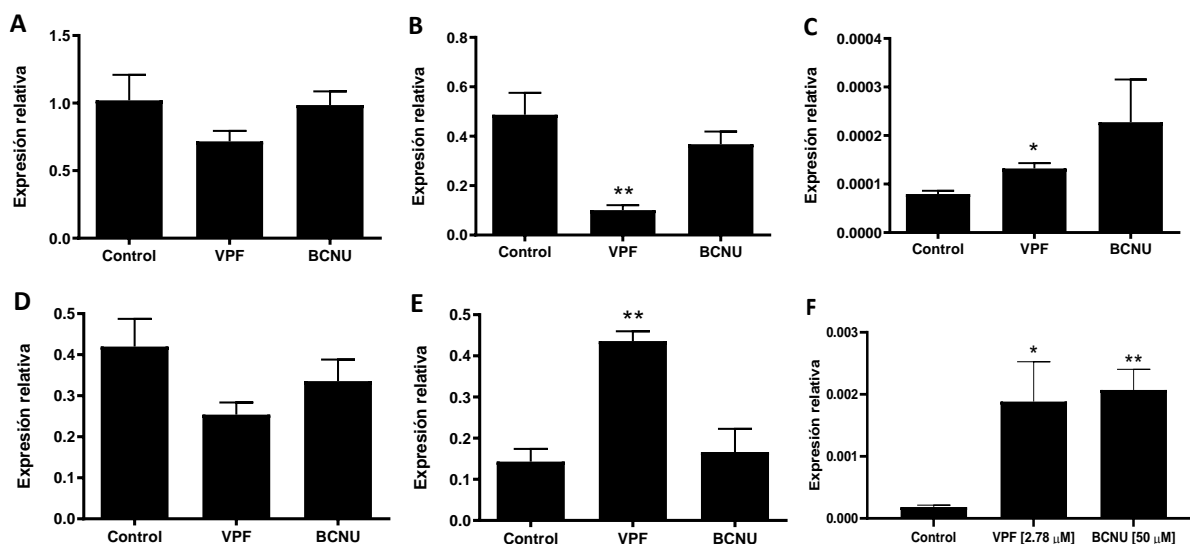


Figura 25. PCR cuantitativa con la línea celular HGUE-GB-42 tratada con carmustina y verteporfin. Se muestra el efecto de la carmustina (BCNU) a 50 μ M y verteporfin (VPF) a 2.78 μ M en la expresión de los genes RAC1 (A), MMP2 (B), MMP9 (C), ITGB3 (D), PRMT5 (E) y HR (F). En todos los casos se reporta la expresión relativa obtenida empleando el gen GAPDH como referencia endógena. Todos los datos se presentan como la media \pm SD de la expresión relativa. * indica un valor de $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En lo que respecta a HGUE-GB-42, BCNU incrementó significativamente la expresión relativa del gen HR (Figura 25F). También incrementó la expresión del gen MMP9 (Figura 25C) y disminuyó la expresión de los genes MMP2 e ITGB3, aunque de manera no significativa (Figuras 25B, 25D). Por el

contrario, VPF disminuyó significativamente la expresión relativa de MMP2 (**Figura 25B**) e incrementó significativamente la expresión relativa de los genes MMP9, PRMT5 y HR (**Figuras 25C, 25E, 25F**).

Debido a que no se observó un efecto importante al tratar las líneas celulares de GBM con EPZ015666, se tomó la decisión de realizar ensayos de ciclo celular evaluando su efecto en conjunto con otros fármacos de interés como BMS-754807, OSI-906 (ambos inhibidores del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina, IGFR1), AZD6244 (inhibidor de MEK1/2, el principal activador de ERK) y erlotinib (inhibidor de EGFR1). Lo anterior se llevó a cabo en un intento de hallar un posible efecto sinérgico. Todos ellos se encuentran en investigación para el tratamiento no sólo de GBM, sino también de otros tipos de cáncer de mal pronóstico, entre ellos, adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon.

De manera general, OSI-906 a 10 μ M, solo y en combinación con EPZ015666 no parece tener un efecto en las líneas celulares de GBM. Por otro lado, BMS-754807 a 10 μ M bloqueó el ciclo celular en la fase G2/M en ambas líneas celulares de GBM. (**Figura 26**).

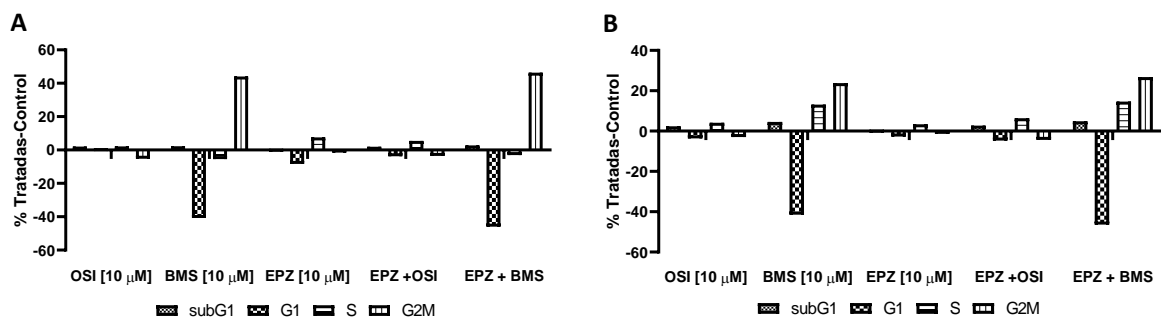


Figura 26. Ensayos de ciclo celular con EPZ015666 en combinación con BMS-754807 y OSI-906 en las líneas celulares de GBM. Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B) tratadas con EPZ015666 (EPZ) a 10 μ M, solo y en combinación con BMS-754807 (BMS) y OSI-906 (OSI), ambos a 10 μ M. Los resultados se presentan como el porcentaje de células tratadas con el (los) inhibidor(es) menos el porcentaje de células presentes en el control (sin tratamiento).

Cuando se empleó erlotinib a 10 μ M como inhibidor (solo o con EPZ015666), no se observó un efecto notable en ninguna de las dos líneas celulares de GBM (**Figura 27**). Por el contrario, el uso individual de AZD6244 a 1 μ M incrementó la fase G1 y disminuyó las fases S y G2/M en ambas líneas celulares de GBM. Cuando AZD6244 se empleó junto con EPZ015666, no se observó un incremento del efecto anteriormente mencionado.

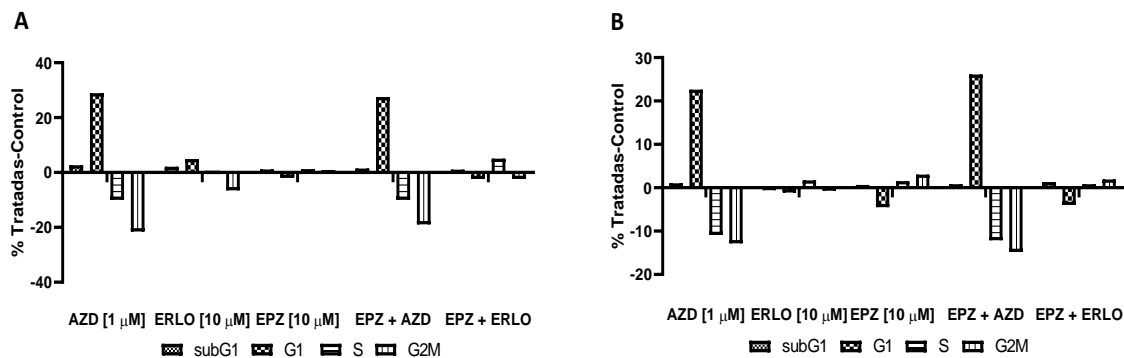


Figura 27. Ensayos de ciclo celular con EPZ015666 en combinación con AZD6244 y erlotinib en las líneas celulares de GBM. Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B) tratadas con EPZ015666 (EPZ) a 10 μM, solo y en combinación con AZD6244 (AZD) a 1 μM y erlotinib (ERLO) a 10 μM. Los resultados se presentan como el porcentaje de células tratadas con el (los) inhibidor(es) menos el porcentaje de células presentes en el control (sin tratamiento).

5.4.2. Efecto conjunto del silenciamiento del gen HR y el tratamiento con carmustina

Se realizaron ensayos de ciclo celular evaluando el efecto del silenciamiento del gen HR con el respectivo siRNA, en conjunto con el tratamiento con carmustina (BCNU) a 50 μM (Figura 28). Se observó que el tratamiento con BCNU en ambas líneas celulares de GBM disminuyó la fase G1 e incrementó la fase S. Sin embargo, cuando se emplearon de forma conjunta ambos tratamientos, no hubo potenciación del efecto entre ellos.

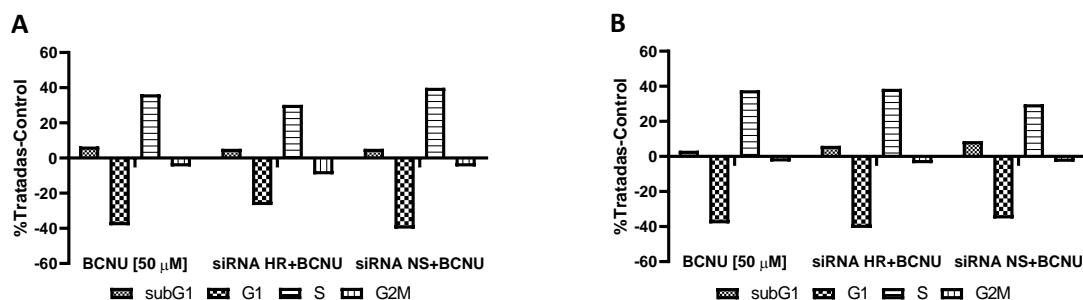


Figura 28. Ensayos de ciclo celular con el siRNA del gen HR en conjunto con carmustina en las líneas celulares de GBM. Se muestran los resultados obtenidos con las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B) transfectedas con el siRNA de HR en conjunto con el tratamiento con carmustina (BCNU) a 50 μM. Los resultados se presentan como el porcentaje de células transfectedas y/o tratadas con el inhibidor menos el porcentaje de células presentes en el control (sin tratamiento y sin transfectar, para BCNU; sin tratamiento, para siRNA HR+BCNU y siRNA NS+BCNU). El control negativo es la transfección con siRNA NS.

5.4.3. Efecto conjunto de la radioterapia y el tratamiento con los inhibidores químicos NSC23766 y EPZ015666

Además de la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que por sí mismas generen efectos importantes en la disminución de la progresión del cáncer, en este caso de GBM, es importante explorar la posibilidad de que su inhibición potencie las terapias clásicas existentes. Para ello, ambas líneas celulares de GBM se sometieron a radioterapia con 7 Gy y posteriormente fueron tratadas con los inhibidores NSC23766 o EPZ015666 (**Figura 29**).

La radioterapia como monoterapia, disminuyó notablemente la fase G1 e incrementó la fase G2/M. En HGUE-GB-39 se observó que el tratamiento con ambos inhibidores en conjunto con la radioterapia, incrementó las fases G1 y G2/M del ciclo celular, a diferencia del tratamiento con NSC23766 o con EPZ015666 de manera individual, los cuales incrementaron la fase G1 y disminuyeron la fase S (**Figura 29A**). Adicionalmente, se observó que el tratamiento conjunto de los inhibidores más la radioterapia, disminuyó la fase subG1.

Por otro lado, en HGUE-GB-42 se observó el incremento de la fase G1 para todos los casos y un ligero aumento de la fase subG1 con el tratamiento con EPZ015666 (**Figura 29B**).

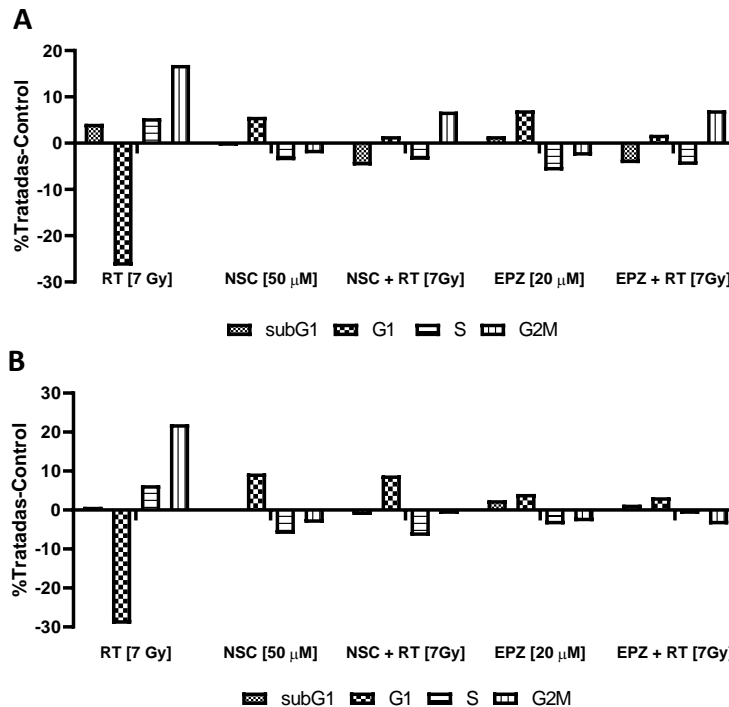


Figura 29. Ensayos de ciclo celular con NSC23766 y EPZ015666 en conjunto con radioterapia. Se muestra el efecto de los inhibidores NSC23766 (NSC, 50 μM) o EPZ015666 (EPZ, 20 μM), solos o en conjunto con radioterapia (RT) a 7 Gy, en las líneas celulares HGUE-GB-39 (A) y HGUE-GB-42 (B). Los resultados se presentan como el porcentaje de células tratadas y/o irradiadas menos el porcentaje de células presentes en el control (sin tratamiento, para RT, NSC y EPZ; sin RT, para NSC+RT y EPZ+RT).

6. DISCUSIÓN

La identificación de nuevas dianas terapéuticas para el diagnóstico y tratamiento de GBM representa una necesidad urgente para la mejora de la calidad de vida de los pacientes que sufren esta enfermedad y constituye la finalidad de la presente investigación.

Como parte de los nuevos enfoques de tratamiento, se parte de la observación de que un conjunto común de vías centrales de señalización se activa en GBM y ante ello, se busca bloquear puntos de convergencia no redundantes que puedan frenar algunos de los procesos asociados al incremento de la malignidad en este tipo de cáncer.

Para efectos de este trabajo, se propuso el estudio de los genes RAC1, PRMT5 y HR como posibles dianas terapéuticas. El empleo de inhibidores químicos para aquellos genes como RAC1 y PRMT5 donde estaban disponibles, representó una estrategia para dilucidar las posibles vías de señalización implicadas y los efectos globales de su bloqueo. De esta manera, al profundizar en el mecanismo de acción de los inhibidores químicos comparando los efectos observados con la inhibición de la expresión de dichos genes, se obtuvieron pistas que, a su vez, se traducen en mayor información sobre el posible papel de dichas dianas en GBM.

Los efectos observados con los inhibidores químicos NSC23766 y EPZ015666 son dependientes del contexto celular y, por tanto, específicos a la línea celular objeto de estudio, lo que complica la obtención de resultados generalizables. De este modo, las variaciones entre ellas están vinculadas a la expresión diferencial de ciertos genes que las hacen más resistentes o más susceptibles a los respectivos tratamientos.

De manera general, se observó que NSC23766 no parece estar inhibiendo completamente la actividad del gen RAC1 en la línea celular HGUE-GB-39. Los efectos observados son dependientes de la concentración del inhibidor y a concentraciones bajas, algunos de los efectos fueron opuestos a los obtenidos con la inhibición de la expresión empleando el siRNA de RAC1. Esto se comprueba en el ensayo de MTT, donde se requieren concentraciones altas de NSC23766 (150 μ M) para conseguir una inhibición significativa de la proliferación celular similar a la obtenida con el empleo del siRNA de RAC1 ($20.07 \pm 4.85\%$ con NSC23766 frente a $26.07 \pm 1.90\%$ con siRNA de RAC1) (**Figuras 4A y 5A**). En lo que respecta a la línea celular HGUE-GB-42, NSC23766 inhibió significativamente la proliferación celular a partir de 10 μ M (**Figura 4B**) y este efecto fue superior al observado con el siRNA de RAC1 ($51.19 \pm 5.63\%$ con NSC23766 frente a $7.85 \pm 5.95\%$ con el siRNA de RAC1) (**Figura 5B**).

El hecho de que NSC23766 ocasione una mayor o menor disminución de la proliferación celular que la observada al inhibir la expresión del gen en cuestión, podría deberse a una posible falta de especificidad del inhibidor, es decir, puede ser que tenga otros sitios de unión adicionales a Rac1.

Existen estudios en donde se muestra que NSC23766 tiene efectos independientes de Rac1 fuertes y distintos, a 100 μ M, en procesos asociados a la función plaquetaria [66]. Adicionalmente, la variación de los efectos de NSC23766 podría deberse a una afinidad deficiente de esta molécula por la diana terapéutica, lo cual, se sustenta con reportes existentes sobre su mejoramiento [67]. También puede ocurrir que los GEFs Tiam1 y Trio, para los cuales NSC23766 es específico, no se encuentren expresados en la misma proporción en las líneas celulares de GBM objeto de análisis. Aunado a ello, el uso de NSC23766 únicamente impide la unión de los GEFs anteriormente mencionados, dejando abierta la posibilidad de que Rac1 se active por asociación al resto de GEFs estudiados o a otros, de los cuales aún no se conoce del todo su función.

En cualquier caso, también es importante considerar que el efecto del bloqueo específico de los GEFs Tiam1 y Trio podría diferir del obtenido con la inhibición de la expresión del gen RAC1 en su totalidad, pues dicha GTPasa participa en diferentes procesos celulares en las células de GBM.

En los ensayos de ciclo celular con una concentración baja y alta de NSC23766 (**Figura 7**) y en los obtenidos con la radioterapia (**Figura 29**), se observó que este inhibidor provoca un ligero bloqueo en la fase G1 y una bajada en la fase S, en ambas líneas celulares de GBM.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las qPCR realizadas inhibiendo la expresión del gen RAC1 con el respectivo siRNA (**Figuras 10 y 11**), también difieren de los obtenidos después de someter a las líneas celulares de GBM al tratamiento con NSC23766 (**Figuras 8 y 9**). En HGUE-GB-39, este último incrementó significativamente la expresión de los genes ITGB3 y HR y disminuyó los niveles de MMP2, contrariamente a lo observado con el siRNA de RAC1 (**Figuras 8 y 10**). En HGUE-GB-42, NSC23766 incrementó de manera adicional la expresión significativa de los genes PRMT5 y HR, mientras que con el siRNA de RAC1, hubo un incremento significativo del gen MMP9 que no se vio con el uso del inhibidor (**Figuras 9 y 11**). Estas diferencias podrían explicar por qué HGUE-GB-42 es más susceptible al tratamiento con NSC23766 que HGUE-GB-39. Debido a que NSC23766 incrementa la expresión del gen HR en ambas líneas celulares de GBM, la diferencia entre ellas probablemente se atribuya a un posible efecto conjunto de este último y los genes ITGB3 y PRMT5.

En lo que respecta al gen ITGB3, este codifica para la integrina β 3, también llamada CD61 o GP3A. La localización de esta integrina en la membrana celular, le confiere funciones biológicas notables en la unión de las células con los contrareceptores de otras células y ligandos en la matriz extracelular. Su sobreexpresión está asociada con la invasión y la migración en las células tumorales, por consiguiente, está vinculado a la disminución de la supervivencia. Adicionalmente, esta integrina está asociada a procesos de reprogramación metabólica, EMT, pro-angiogénesis, reeducación del microambiente estromal e inmunológico y la adquisición de resistencia a fármacos [68]. Sobre esto último, se ha visto que la inhibición de ITGB3 resulta en una mayor sensibilidad a TMZ al reducirse la reparación de las

roturas del ADN inducidas por este fármaco [69]. Además de ello, niveles altos de ITGB3 se han vinculado con la resistencia a la inhibición de EGFR, debido al complejo formado por ITGB3–KRAS – RalB y la activación de TBK1 y NFκB mediada por dicho complejo [70]. Por todo lo anterior, el incremento de la expresión de ITGB3 por NSC23766 en HGUE-GB-39 podría tener un papel importante y explicaría la ausencia de efectos en los ensayos de invasividad y cicatrización.

Por su parte, el silenciamiento del gen RAC1 con el respectivo siRNA incrementó significativamente la expresión de MMP2 en ambas líneas celulares de GBM (**Figuras 8B y 9B**). Así mismo, MMP9 aumentó significativamente en HGUE-GB-42 (**Figura 9C**). El hecho de que el siRNA de RAC1 evitara el cierre de la herida en los ensayos de cicatrización (**Figura 13**), indica la existencia de un mecanismo de regulación de MMPs que está impidiendo su efecto en el proceso de migración celular. En este sentido, se comprobó que, en efecto, Rac1 parece regular la producción de MMPs [71] y podría hacerlo a través del eje Rac1/PAK1/p38/MMP-2 [72].

El incremento de los genes MMP2 y MMP9 no necesariamente implica su participación en la progresión de GBM. La metaloproteasa 2 o gelatinasa A, codificada por el gen MMP2, es inusual en su expresión constitutiva por muchas células, su distribución tisular ubicua y su modo de activación que difiere del resto de metaloproteasas. Posee un mecanismo único de activación que involucra la formación de un complejo trimolecular conformado por la metaloproteasa de tipo membrana 1 (MT1-MMP o MMP14), TIMP-2 y el dominio C terminal de MMP2. Aunado a ello, parece estar regulada transcripcionalmente, aunque este mecanismo no se ha estudiado a detalle [73].

Ahora bien, la expresión de la metaloproteasa 9 o gelatinasa B, codificada por el gen MMP9, puede estar influenciada por la presencia de factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular y otros agentes que alteran la forma celular [73].

La actividad de las gelatinasas A y B está controlada por los TIMPs, los cuales, también son regulados por Rac1 [71]. De hecho, MMP2 y MMP9 suelen aislarse en complejo con sus inhibidores endógenos TIMP-2 y TIMP-1, respectivamente. Además, las metaloproteasas de tipo membrana (MT-MMP) pueden activar tanto a la enzima libre como al complejo enzima-inhibidor en la superficie celular [73].

Curiosamente, la regulación del gen MMP9 parece estar vinculada con la expresión del gen HR. En las qPCR realizadas inhibiendo la expresión de este último, se observó un incremento significativo de la expresión relativa del gen MMP9 en ambas líneas celulares de GBM (**Figuras 19C y 20C**). En cambio, cuando se empleó el inhibidor NSC23766, se observó que el incremento significativo de la expresión del gen HR disminuyó significativamente la expresión del gen MMP9 en HGUE-GB-39 (**Figuras 10C y 10F**); en HGUE-GB-42 se observó un ligero aumento, pero este no fue significativo (**Figuras 11C y 11F**).

Existen estudios que muestran que la proteína lisina desmetilasa HR y correpresor de receptor nuclear, codificada por el gen HR, se une a elementos que responden a p53. A su vez, se ha visto que p53 modula negativamente el nivel del inductor de metaloproteasas de matriz extracelular (EMMPRIN o CD147) a través de la vía de degradación lisosomal [74]. Esta proteína de 58 kDa es miembro de la familia de las inmunoglobulinas y es una glicoproteína enriquecida en la superficie de varios tipos de células tumorales. EMMPRIN se expresa de manera diferente en el cerebro humano normal y en GBM, por lo que podría estar asociado con la progresión de astrocitoma [75]. Además de ello, se sabe que su expresión promueve la invasión y la metástasis al incrementar la producción de varias MMPs y regula positivamente la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la angiogénesis. Respecto al aumento de MMPs, EMMPRIN estimula la producción in vitro de MMP1, MMP2 y MMP3 por las células estromales [76]. Aunque no regula la expresión de MMP9, MT1-MMP, TIMP-1 y TMP-2, se sabe que MMP2 también puede activar a MMP9 [73]. De este modo, podría existir una regulación positiva entre MMP9 y MMP2, y una regulación negativa entre los genes MMP9 y HR que, por supuesto, estaría sujeta a p53 y sus respectivas interacciones. Por otra parte, el silenciamiento del gen HR también causó la disminución significativa de la proliferación celular en ambas líneas celulares de GBM (**Figura 5**).

En lo que respecta a EPZ015666, este fármaco tiene un efecto en la proliferación celular, el cual, nuevamente es mayor en HGUE-GB-42, ya que en HGUE-GB-39 únicamente se observaron efectos significativos con la mayor concentración (20 μ M) ($37.47 \pm 5.24\%$ en HGUE-GB-42 frente a $23.05 \pm 3.97\%$ en HGUE-GB-39) (**Figura 4**). Esta diferencia podría deberse a que, en esta última línea celular, este inhibidor está disminuyendo significativamente la expresión del gen RAC1 (**Figura 11A**). Por otro lado, lo observado en los experimentos de la combinación de EPZ015666 con otros fármacos de interés (**Figuras 26 y 27**), aunado a los resultados obtenidos con la radioterapia (**Figura 29**), mostraron que este inhibidor bloqueó la fase G1 y causó una bajada de la fase S del ciclo celular. Adicionalmente, la inhibición del gen PRMT5 con el respectivo siRNA incrementó ligeramente la fase subG1 (**Figura 6**). El hecho de que la muerte celular, asociada a esta última fase, no coincida con la vista en los ensayos de MTT, se debe a que en estos últimos experimentos se observó el efecto máximo del inhibidor a las 72 h, mientras que, en el ciclo celular, se ve el efecto producido a las 24 h.

Pese a lo anterior, de manera general no se observó un efecto importante de EPZ015666 en las líneas celulares de GBM, motivo por el cual se buscó potenciar su efecto mediante el uso de los fármacos que se describirán a continuación.

BMS-754807 es un inhibidor de IGF1R que está implicado en la promoción de la transformación oncogénica. Su activación desencadena una cascada de reacciones que activan, por un lado, a Ras, Raf y la proteína quinasa activada por mitógenos, y por el otro, la vía PI3K [77]. En los ensayos de ciclo

celular realizados con este compuesto (**Figura 26**), se observó un bloqueo de la fase G2/M y un ligero incremento de la fase subG1, tal cual se ha reportado en la bibliografía [78]. Su uso en combinación con EPZ015666, no potenció el efecto anteriormente descrito.

OSI-906, también conocido como linsitinib, es otro inhibidor de IGFR1. Su uso individual y en conjunto con EPZ015666 no tuvo ningún efecto importante en las líneas de GBM (**Figura 26**). Lo mismo ocurrió con el empleo de erlotinib, inhibidor de EGFR1 (**Figura 27**).

AZD6244, también llamado selumetinib, es un inhibidor de MEK1/2, el principal activador de ERK. La unión de este fármaco a MEK1/2 evita la fosforilación de ERK1/2 aguas abajo e inhibe la vía de señalización RAF/MEK/ERK. Los ensayos de ciclo celular con este compuesto, cuando se usó de manera individual, mostraron un bloqueo de la fase G1 en ambas líneas celulares de GBM (**Figura 27**). Este efecto coincide con lo reportado en la bibliografía [79]. No obstante, su uso en combinación con EPZ015666 no potenció dicho efecto.

Los efectos modestos de los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 con las líneas celulares de GBM, fueron superados en las líneas de adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon (**Figuras 14 y 15**).

En cuanto al adenocarcinoma de páncreas, NSC23766 tuvo un mayor efecto en la línea RWP-1 en comparación con la línea Hs766T. Lo anterior se refleja en un valor de IC50 más pequeño (IC50 de 32.73 μ M en RWP-1 frente a 101.2 μ M en Hs766T) indicando un mayor impacto en la proliferación celular (**Figura 14**). Adicionalmente, lo anterior causó un ligero efecto en la disminución de la migración celular a las 48 h, durante el ensayo de cicatrización (**Figura 18**). Por su parte, NSC23766 y EPZ015666 bloquearon mínimamente el ciclo celular en la fase G1 en ambas líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas (**Figura 16**). Aunque no se observó un incremento importante de la fase subG1 asociada a la muerte celular, es importante destacar que en el ciclo celular sólo se está observando el efecto de los inhibidores a las 24 h posteriores al tratamiento. Si se realizara el seguimiento de los mismos a las 48 h y a las 72 h, se observaría su efecto máximo y este coincidiría con la disminución en la proliferación observada en los ensayos de MTT.

En carcinoma de colon, el efecto de NSC23766 en la proliferación celular es superior en la línea celular SW-480. Esto último, de igual manera se traduce en un valor de IC50 inferior al obtenido con la línea celular HT29 (47.16 μ M versus 64.45 μ M, respectivamente) (**Figura 14**). Este efecto superior de NSC23766 en la línea SW-480 podría explicar el ligero efecto observado en la disminución de la migración celular a las 24 h, durante el ensayo de cicatrización (**Figura 17**). Por otro lado, NSC23766 parece bloquear ligeramente la fase S del ciclo celular en ambas líneas celulares de carcinoma de colon. En cambio, el uso de EPZ015666 bloqueó mínimamente la fase G1 en la línea celular SW-480 y la fase S en la línea celular HT29 (**Figura 16**).

En lo que respecta al gen HR, se observó que su inhibición con el respectivo siRNA también tuvo un efecto modesto en la proliferación celular de las líneas de adenocarcinoma de páncreas y en la línea celular SW-480 de carcinoma de colon (**Figura 22**).

La lucha contra los mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales ante el uso prolongado de las terapias clásicas, forma parte de los desafíos en el tratamiento del GBM, entre los cuales, se encuentra la resistencia a BCNU. La comparación de R-BCNU frente a la línea parental, mostró que el aumento de la expresión relativa de los genes MMP2, MMP9 e ITGB3 parece estar correlacionado con la adquisición de la resistencia a dicho fármaco (**Figura 23**). Aunado a ello, el gen HR nuevamente parece jugar un papel importante en ambas condiciones, ya que su expresión se encontró significativamente incrementada tanto en la línea resistente a BCNU como en ambas líneas celulares normales de GBM tratadas con dicho fármaco (**Figuras 23F, 24F y 25F**). Probablemente se deba a su interacción con las histonas desacetilasas y a sus funciones como correpressor transcripcional de múltiples receptores nucleares, reportadas en la bibliografía.

En lo que respecta a BCNU, este fármaco parece bloquear el ciclo celular en la fase S (**Figura 28**). Aunque este bloqueo es inusual, la detención de la fase S ha sido reportada en algunos tipos de células después de la exposición a fármacos citotóxicos específicos [80]. De cualquier manera, el bloqueo en la fase S llevará al bloqueo en la fase G2/M y posteriormente, a una muerte celular apoptótica.

La búsqueda de la potenciación de las terapias clásicas, llevó a la evaluación de VPF en las líneas celulares de GBM. El uso de éste último compuesto está asociado a la inhibición de la expresión de YAP, un componente de la vía de señalización Hippo. Esta vía detecta la densidad celular y las señales mecánicas para la regulación de la proliferación celular y el tamaño de los órganos, mediante dos coactivadores transcripcionales: YAP y TAZ. Ambas proteínas regulan la transcripción de muchos genes implicados en la proliferación, autorrenovación y muerte celular [81]. Esto último se comprobó en el presente trabajo, ya que VPF incrementó significativamente la expresión de los genes MMP9, PRMT5 y HR en ambas líneas celulares de GBM (**Figuras 24C, 24E, 24F y 25C, 25E, 25F**). En HGUE-GB-39, este inhibidor también incrementó significativamente la expresión de los genes MMP2 e ITGB3 (**Figuras 24B y 24D**).

Finalmente, se evaluó el efecto de la radioterapia en combinación con los inhibidores objeto de estudio en el presente trabajo (**Figura 29**). De manera general, la radioterapia a 7 Gy incrementó la muerte celular propia de la fase subG1 y bloqueó la fase G2/M en ambas líneas celulares de GBM, en comparación con el control sin radioterapia y sin tratamiento con alguno de los inhibidores químicos. El efecto combinado tanto de NSC23766 como de EPZ015666 con la radioterapia en HGUE-GB-39, disminuyó notablemente la muerte celular asociada a la fase subG1 (**Figura 29A**). Asimismo, se observó que ambos inhibidores bloquearon la fase G1 del ciclo celular (porque hubo una diferencia en los

niveles de dicha fase respecto al control sometido a radioterapia) y están potenciando el efecto de la radioterapia al incrementar la fase G2/M, lo cual, es un indicio de que ambos tratamientos, NSC23766 o EPZ01566 y la radioterapia, están actuando aditivamente. Esto último es importante, ya que se sabe que de las líneas caracterizadas por el grupo del Dr. Miguel Saceda, HGUE-GB-39 es la línea más resistente a la radioterapia con sólo el $21.2 \pm 1.6\%$ de células afectadas después de ser irradiadas [82].

En contraste, con HGUE-GB-42 no parece existir una potenciación de los efectos individuales de los tratamientos, ya que el efecto con ambos inhibidores impera sobre el tratamiento con radioterapia. Esto último se observó en el bloqueo de la fase G1 para todos los casos y coincidió con el hecho de que precisamente, NSC23766 y EPZ015666 tuvieron mayores efectos en esta línea celular. Además de ello, se observó que el tratamiento con EPZ015666 más radioterapia incrementó la muerte celular (fase subG1) (**Figura 29B**).

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

1. NSC23766 y EPZ015666 disminuyen significativamente la proliferación celular en las líneas celulares de GBM, adenocarcinoma de páncreas y carcinoma de colon, siendo mayor su efecto en estas últimas.
2. La línea celular HGUE-GB-39 es más resistente a los tratamientos con los inhibidores NSC23766 y EPZ015666, en comparación con la línea celular HGUE-GB-42.
3. La evaluación de los efectos de los inhibidores mediante ensayos de ciclo celular no ha resultado ser la técnica ideal para detectar cambios pequeños en la replicación del ADN.
4. El inhibidor NSC237666 no es tan apropiado para el estudio del gen RAC1 como diana terapéutica, ya que los resultados obtenidos con este primero difieren de los observados con el silenciamiento del gen RAC1 en ambas líneas celulares de GBM.
5. El gen RAC1 está implicado en los procesos de migración e invasividad celulares ya que su silenciamiento con el siRNA incrementa significativamente la expresión de los genes MMP2, MMP9 e impide el cierre de la herida en los ensayos de cicatrización, en ambas líneas celulares de GBM.
6. Los inhibidores NSC23766 y EPZ015666 no son buenos candidatos, de momento, para su empleo como fármacos en el tratamiento de GBM.
7. La inhibición de la expresión del gen HR disminuye significativamente la proliferación celular en las líneas celulares de GBM.
8. La inhibición de la expresión del gen HR incrementa significativamente la expresión del gen MMP9 en ambas líneas celulares de GBM.
9. Los efectos tanto de los inhibidores químicos, como de los siRNAs específicos contra RAC1, PRMT5 y HR son dependientes del contexto celular en los diferentes modelos celulares estudiados.
10. La resistencia a BCNU parece estar correlacionada con el aumento de la expresión de los genes MMP2, MMP9 e ITGB3.
11. El tratamiento con VPF parece tener un efecto en la regulación de genes implicados en la proliferación, autorrenovación e invasividad, ya que incrementó significativamente la expresión de los genes MMP2, MMP9, PRMT5, HR e ITGB3.
12. La radioterapia como monoterapia bloquea la fase G2/M en ambas líneas de GBM y su efecto fue potenciado con el uso de NSC23766 y EPZ015666 en HGUE-GB-39.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. *Image-based analysis of cell cycle using PI*. Nexcelom Bioscience. [cited 2021 05 Junio]; Available from: <https://www.nexcelom.com/Literature/image-based-analysis-of-cell-cycle-using-pi.pdf>.
2. Sung, H., et al., *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021. **71**(3): p. 209-249.
3. Lambert, A., et al., *An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma*. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2019. **11**.
4. Teague, A., K.H. Lim, and A. Wang-Gillam, *Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies*. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2015. **7**(2): p. 68-84.
5. Wang, S., S. Huang, and Y.L. Sun, *Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: a review*. BioMed Research International, 2017. **2017**: p. 2646148.
6. Biller, L.H. and D. Schrag, *Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review*. Journal of the American Medical Association, 2021. **325**(7): p. 669-685.
7. Vu, T. and P.K. Datta, *Regulation of EMT in colorectal cancer: a culprit in metastasis*. Cancers, 2017. **9**(12): p. 171.
8. Hanif, F., et al., *Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017. **18**(1): p. 3-9.
9. Grech, N., et al., *Rising incidence of glioblastoma multiforme in a well-defined population*. Cureus, 2020. **12**(5): p. e8195.
10. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro-oncology, 2015. **17 Suppl 4**(Suppl 4): p. iv1-iv62.
11. Dohrmann, G.J., J. Farwell, and J. Flannery, *Glioblastoma multiforme in children*. Journal of Neurosurgery, 1976. **44**(4): p. 442-448.
12. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathologica, 2005. **109**(1): p. 93-108.
13. Sun, T., et al., *Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males*. The Journal of Clinical Investigation, 2014. **124**(9): p. 4123-4133.
14. Adamson, C., et al., *Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2009. **18**(8): p. 1061-1083.
15. Lorimer, I.A.J., *Aberrant Rac pathway signalling in glioblastoma*. Small GTPases, 2021. **12**(2): p. 81-95.
16. McLendon, R., et al., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-1068.
17. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
18. Simińska, D., et al., *Epidemiology of anthropometric factors in glioblastoma multiforme. Literature review*. Brain Sciences, 2021. **11**(1): p. 116.
19. Friedman, H.S., T. Kerby, and H. Calvert, *Temozolomide and treatment of malignant glioma*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(7): p. 2585-2597.
20. Reardon, D.A. and P.Y. Wen, *Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents*. The Oncologist, 2006. **11**(2): p. 152-164.
21. Iacob, G. and E.B. Dinca, *Current data and strategy in glioblastoma multiforme*. Journal of Medicine and Life, 2009. **2**(4): p. 386-393.
22. Branter, J., S. Basu, and S. Smith, *Tumour treating fields in a combinational therapeutic approach*. Oncotarget, 2018. **9**(93): p. 36631-36644.

23. Kesari, S., *Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments*. Seminars in Oncology, 2011. **38**: p. S2-S10.
24. Kakee, A., T. Terasaki, and Y. Sugiyama, *Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood-brain barrier*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996. **277**(3): p. 1550-1559.
25. Mellai, M., et al., *IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors*. Journal of Neuro-Oncology, 2011. **105**(2): p. 345.
26. Chen, R., et al., *Glioma subclassifications and their clinical significance*. Neurotherapeutics, 2017. **14**(2): p. 284-297.
27. Aldape, K., et al., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathologica, 2015. **129**(6): p. 829-848.
28. Brennan, C.W. and e. al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-477.
29. Marei, H. and A. Malliri, *GEFs: dual regulation of Rac1 signaling*. Small GTPases, 2017. **8**(2): p. 90-99.
30. Marei, H., et al., *Differential Rac1 signalling by guanine nucleotide exchange factors implicates FLII in regulating Rac1-driven cell migration*. Nature Communications, 2016. **7**(1): p. 10664.
31. Krause, M. and A. Gautreau, *Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(9): p. 577-590.
32. Hoshino, D., K.M. Branch, and A.M. Weaver, *Signaling inputs to invadopodia and podosomes*. Journal of Cell Science, 2013. **126**(Pt 14): p. 2979-2989.
33. Senger, D.L., et al., *Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes*. Cancer Research, 2002. **62**(7): p. 2131.
34. Yoon, C.H., et al., *The small GTPase Rac1 is involved in the maintenance of stemness and malignancies in glioma stem-like cells*. FEBS Letters, 2011. **585**(14): p. 2331-2338.
35. Kohn, A.D., et al., *Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation **. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(49): p. 31372-31378.
36. Bid, H.K., et al., *RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis*. Molecular Cancer Therapeutics, 2013. **12**(10): p. 1925-1934.
37. Buerki, R.A., Z.S. Chheda, and H. Okada, *Immunotherapy of primary brain tumors: facts and hopes*. Clinical Cancer Research, 2018. **24**(21): p. 5198-5205.
38. Marei, H. and A. Malliri, *Rac1 in human diseases: the therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms*. Small GTPases, 2017. **8**(3): p. 139-163.
39. Gao, Y., et al., *Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(20): p. 7618-7623.
40. Sapir, T., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) and the ERK1/2 & PI3K pathways: a case for PRMT5 inhibition and combination therapies in cancer*. Molecular Cancer Research, 2021. **19**(3): p. 388.
41. Guccione, E. and S. Richard, *The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019. **20**(10): p. 642-657.
42. Shailesh, H., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer*. Oncotarget, 2018. **9**(94): p. 36705-36718.
43. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Molecular Cell, 2009. **33**(1): p. 1-13.
44. Chan-Penebre, E., et al., *A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models*. Nature Chemical Biology, 2015. **11**(6): p. 432-437.
45. Antonyamy, S., et al., *Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(44): p. 17960-17965.

46. Mohammad, H.P., O. Barbash, and C.L. Creasy, *Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer*. Nature Medicine, 2019. **25**(3): p. 403-418.
47. Hsu, J.M., et al., *Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation*. Nature Cell Biology, 2011. **13**(2): p. 174-181.
48. Ge, L., et al., *PRMT5 promotes epithelial-mesenchymal transition via EGFR- β -catenin axis in pancreatic cancer cells*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. **24**(2): p. 1969-1979.
49. Kranenburg, O., *The KRAS oncogene: past, present, and future*. Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer, 2005. **1756**(2): p. 81-82.
50. Ferreira de Freitas, R., D. Ivanochko, and M. Schapira, *Methyltransferase inhibitors: competing with, or exploiting the bound cofactor*. Molecules, 2019. **24**(24): p. 4492.
51. Zhou, Z., et al., *A novel small-molecule antagonizes PRMT5-mediated KLF4 methylation for targeted therapy*. EBioMedicine, 2019. **44**: p. 98-111.
52. Zarach, J.M., et al., *The co-repressor hairless has a role in epithelial cell differentiation in the skin*. Development, 2004. **131**(17): p. 4189-4200.
53. Brook, L., et al., *Hairless regulates p53 target genes to exert tumor suppressive functions in glioblastoma*. Journal of Cellular Biochemistry, 2019. **120**(1): p. 533-543.
54. Djabali, K., V.M. Aita, and A.M. Christiano, *Hairless is translocated to the nucleus via a novel bipartite nuclear localization signal and is associated with the nuclear matrix*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(2): p. 367-376.
55. Djabali, K. and A.M. Christiano, *Hairless contains a novel nuclear matrix targeting signal and associates with histone deacetylase 3 in nuclear speckles*. Differentiation, 2004. **72**(8): p. 410-418.
56. Ahmad, W., et al., *A missense mutation in the zinc-finger domain of the human hairless gene underlies congenital atrichia in a family of irish travellers*. The American Journal of Human Genetics, 1998. **63**(4): p. 984-991.
57. Clissold, P.M. and C.P. Ponting, *JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2 β* . Trends in Biochemical Sciences, 2001. **26**(1): p. 7-9.
58. Maatough, A., et al., *Human hairless protein roles in skin/hair and emerging connections to brain and other cancers*. Journal of Cellular Biochemistry, 2018. **119**(1): p. 69-80.
59. Dana, H., et al., *Molecular mechanisms and biological functions of siRNA*. International Journal of Biomedical Science, 2017. **13**(2): p. 48-57.
60. Felgner, P.L. and G.M. Ringold, *Cationic liposome-mediated transfection*. Nature, 1989. **337**(6205): p. 387-388.
61. Jonkman, J.E.N., et al., *An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy*. Cell adhesion & migration, 2014. **8**(5): p. 440-451.
62. Suarez-Arnedo, A., et al., *An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays*. PLOS ONE, 2020. **15**(7): p. e0232565.
63. Samant, R. and A.C.C. Gooi, *Radiotherapy basics for family physicians. Potent tool for symptom relief*. Canadian Family Physician, 2005. **51**(11): p. 1496-1501.
64. Floriane, G., et al., *Non-photoinduced biological properties of verteporfin*. Current Medicinal Chemistry, 2016. **23**(11): p. 1171-1184.
65. Lui, J.W., et al., *The efficiency of verteporfin as a therapeutic option in pre-clinical models of melanoma*. Journal of Cancer, 2019. **10**(1): p. 1-10.
66. Dütting, S., et al., *Critical off-target effects of the widely used Rac1 inhibitors NSC23766 and EHT1864 in mouse platelets*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2015. **13**(5): p. 827-838.
67. Hernández, E., et al., *Novel inhibitors of Rac1 in metastatic breast cancer*. Puerto Rico Health Sciences Journal, 2010. **29**(4): p. 348-356.
68. Zhu, C., et al., *ITGB3/CD61: a hub modulator and target in the tumor microenvironment*. American Journal of Translational Research, 2019. **11**(12): p. 7195-7208.

69. Christmann, M., et al., *Integrin α V β 3 silencing sensitizes malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair*. *Oncotarget*, 2016. **8**(17): p. 27754-27771.
70. Seguin, L., et al., *An integrin β 3–KRAS–RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition*. *Nature Cell Biology*, 2014. **16**(5): p. 457-468.
71. De, P., J.C. Aske, and N. Dey, *RAC1 takes the lead in solid tumors*. *Cells*, 2019. **8**(5).
72. Gonzalez-Villasana, V., et al., *Rac1/Pak1/p38/MMP-2 axis regulates angiogenesis in ovarian cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2015. **21**(9): p. 2127-2137.
73. Chintala, S.K., J.C. Tonn, and J.S. Rao, *Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 1999. **17**(5-6): p. 495-502.
74. Zhu, H., et al., *A role for p53 in the regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human cancer cells*. *Cancer biology and therapy*, 2009. **8**(18): p. 1722-1728.
75. Sameshima, T., et al., *Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas*. *International Journal of Cancer*, 2000. **88**(1): p. 21-27.
76. Caudroy, S., et al., *EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells*. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2002. **19**(8): p. 697-702.
77. Cappuzzo, F., et al., *Insulin-like growth factor receptor 1 (IGFR-1) is significantly associated with longer survival in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib*. *Annals of Oncology*, 2006. **17**(7): p. 1120-1127.
78. Carboni, J.M., et al., *BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009. **8**(12): p. 3341-3349.
79. Grasso, S., et al., *Resistance to selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines is mediated by p70S6K and RPS6 activation*. *Neoplasia*, 2014. **16**(10): p. 845-860.
80. Xu, G.W., et al., *Inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to 1,3-bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea*. *Cancer Research*, 2001. **61**(10): p. 4155-4159.
81. Yang, W.H., et al., *The Hippo pathway effector YAP promotes ferroptosis via the E3 Ligase SKP2*. *Molecular Cancer Research*, 2021. **19**(6): p. 1005.
82. Ventero, M.P., et al., *Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3*. *PLOS ONE*, 2019. **14**(2): p. e0212581.