

Ainoha García Claver

Identificación de marcadores
moleculares y dianas terapéuticas
relacionadas con la respuesta a
inhibidores de la ruta
EGFR/PI3K/AKT en gliomas

Departamento
Farmacología y Fisiología

Director/es

Meléndez Asensio, Bárbara
Alcalde Herrero, Ana Isabel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES Y DIANAS TERAPÉUTICAS
RELACIONADAS CON LA RESPUESTA A
INHIBIDORES DE LA RUTA EGFR/PI3K/AKT EN
GLIOMAS

Autor

Ainoha García Claver

Director/es

Meléndez Asensio, Bárbara
Alcalde Herrero, Ana Isabel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Farmacología y Fisiología

2013



**Universidad
Zaragoza**

Departamento de Farmacología y Fisiología

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES Y
DIANAS TERAPÉUTICAS RELACIONADAS CON LA
RESPUESTA A INHIBIDORES DE LA RUTA
EGFR/PI3K/AKT EN GLIOMAS**

TESIS DOCTORAL

**Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica,
Doña AINOHA GARCÍA CLAVER para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Zaragoza.**

Dirigida por:

Dra. Bárbara Meléndez Asensio

Investigadora en la Unidad de Investigación de Patología Molecular
Hospital Virgen de la Salud de Toledo

Dra. Ana Isabel Alcalde Herrero

Catedrática de la Universidad de Zaragoza
Facultad de Veterinaria. Departamento de Farmacología y Fisiología

Zaragoza 2013


La Dra. Dña. Bárbara Meléndez Asensio, Investigadora en la Unidad de Investigación de Patología Molecular del Hospital Virgen de la Salud de Toledo y la Dra. Dña. Ana Isabel Alcalde Herrero, Catedrática de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por Dña. Ainoha García Claver con el título: “IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES Y DIANAS TERAPÉUTICAS RELACIONADAS CON LA RESPUESTA A INHIBIDORES DE LA RUTA EGFR/PI3K/AKT EN GLIOMAS” ha sido realizada bajo su dirección en la Unidad de Investigación de Patología Molecular del Hospital Virgen de la Salud de Toledo.

Asimismo, la presente memoria se corresponde con el Proyecto de Tesis Doctoral presentado y aprobado previamente por el órgano responsable y cumple las condiciones exigidas, por lo que se autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente el 4 de septiembre de 2013.



Dra. Bárbara Meléndez Asensio
Unidad de Investigación de Patología
Molecular
Hospital Virgen de la Salud de Toledo



Dra. Ana Isabel Alcalde Herrero
Dpto. Farmacología y Fisiología
Universidad de Zaragoza

Agradecimientos

Agradecimientos

Tanto tiempo esperando este momento y parece que me quedo sin palabras, justo cuando más las necesito. Tengo tanto que agradecer a tanta gente, que no sé ni por dónde empezar.

Por supuesto, en primer lugar quiero agradecer a Bárbara, mi directora, todo el esfuerzo que me ha dedicado. Y aunque muchas veces hemos tenido puntos de vista diferentes, sin duda, si he llegado donde estoy y el trabajo ha alcanzado el valor y la calidad pretendida han sido gracias a ella. Muchas gracias también a Anabel, mi directora en la distancia, que me ha facilitado mucho las cosas y siempre me ha ayudado en todo lo que le he pedido. Da gusto encontrarse por la vida con gente así.

Muchas gracias a la gente del Laboratorio de Genética y de la Unidad de Patología Molecular del Hospital Virgen de la Salud de Toledo. Han sido muchos años, muchas horas con vosotros y muchas impresiones intercambiadas. En especial, quiero darle las gracias a Yoli Ruano, que me enseñó a trabajar en el laboratorio y siempre me explicaba todo con gran paciencia, dulzura e inteligencia; a Yoli Campos, por trabajar conmigo codo a codo y animarme siempre; a Pilar Mur, ya que sin ella, sus madrugones y viajes a Madrid, no habría podido sacar el artículo adelante. ¡Gracias Pili! Que decir tiene del apoyo en laboratorio que me han dado Carmen y Gema. Nunca os podré agradecer lo que habéis hecho por mí. Esta tesis también es vuestra. Gema, gracias por tus broncas, tus regañinas y tus collejas. He aprendido mucho contigo, me he reído mucho y te considero una amiga de verdad. Gracias a Sonsoles, a Vanesa, a Elisa y al resto del personal del laboratorio. facultativos y técnicos. También agradecer a la Dra. Mollejo el entusiasmo y el optimismo que siempre me contagió. Verla tantas horas en su microscopio, enfrente de mi cuartito de cultivos me animaba a seguir.

Por otra parte, gracias a todo el personal de Bioquímica del hospital. Porque aunque no sabías bien a qué me dedicaba con mis tubos de un lado para otro, siempre me dabáis apoyo, me entendías y me animabáis cuando me veíais agobiada. Se me ocurre mucha gente a la que darle las gracias, porque casi todo el personal del servicio me ha dado ayudado en algún momento. Y aun sin haberse dado cuenta. ¡Gracias! Echo mucho de menos los buenos

Agradecimientos

momentos de las guardias, las fiestas del laboratorio, los días de Reyes, y, en general, a toda la gente fantástica que he conocido estos años en Toledo.

No me olvidaré aquí, de dar las gracias a todos mis “amigos de Toledo”, que siempre me han apoyado, me han escuchado en mis momentos bajos y han sabido darme unas palabras de cariño y un aliento cuando más lo necesitaba. Gracias Laura y Raquel, también habéis sufrido esta tesis conmigo. Ahora vendrá lo mejor, ¡la celebración! Porque vosotras creíais en mí, cuando ni yo lo hacía. Gracias M^a Jesús, compañera de trabajo, de piso y amiga, ha sido un placer encontrarte. Pedro, mi amigo, compañero y “bailador” favorito, ¡gracias! Por acogerme y por hacerme sentir desde el primer día como tu familia. Gracias Diego, por hacerme reír siempre tanto, aun cuando tenía ganas de llorar.

Gracias a Miguel Moreno, mi gran amigo paleontólogo, por hacerme la portada, ser tan bueno siempre conmigo y escucharme. ¡Ahora te toca a ti!

Por último, agradezco a mi familia, que siempre está ahí apoyándome, a pesar de la distancia, del mal humor y de mis nervios. Todo lo que soy, os lo debo a vosotros. Y, Miguel, que decirte... que tenías más ganas todavía que yo de que terminara esta tesis. Gracias por escucharme sin saber lo que te contaba, gracias por entenderme, apoyarme y consolarme siempre, incluso cuando no estábamos juntos. Me has dado la fuerza para estar aquí y me sigues dando cada día motivos para sonreír.

A mi familia. A Miguel

Abreviaturas

Abreviaturas

AKT: Proteína quinasa B	LOH: <i>Loss of Heterozigosity</i>
BCNU: carmustina (bis-cloroetilnitrosourea)	LY: LY294002, inhibidor de PI3K
BIRC5: <i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i> (survivina)	MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
CBTRUS: <i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>	MDM2: <i>Murine doble minute 2</i>
CDKN2A: p16 ^{INK4a}	MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa
CDKN2B: p15 ^{INK4b}	MLPA: <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
CDKN2C: p18 ^{INK4c}	mTOR: <i>Mammalian target of rapamycin</i>
CGH: <i>Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridación genómica comparada)	MTT: <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
CGP: <i>Cancer Genome Project</i>	NSCLC: <i>Non-small cell lung cancer</i>
COSMIC: <i>Catalogue of somatic mutations in cancer</i>	OMS: Organización Mundial de la Salud
CTGF: <i>Connective tissue growth factor</i>	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
DMSO: Dimetil sulfoxido.	PDGFRA: Receptor alfa para el factor de crecimiento derivado de plaquetas
EGF: <i>Epidermal Growth Factor</i>	PGFA: Proteína glio-fibrilar ácida
EGFR: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	PI: Yoduro de propidio
EGFRvIII: <i>EGFR deletion mutant variant III</i>	PI3K: Fosfatidil inositol-3 quinasa
ERCC5: <i>Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 5</i>	PIP2: Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato
ERK: <i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>	PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5- trisfosfato
ERL: Erlotinib	PLK1: <i>Polo-like kinase 1</i>
ES: <i>Enrichment Score</i>	PS: Fosfatidil serina
FBS: <i>fetal bovine serum</i>	PTEN: Fosfatasa y homólogo de la tensina
FDR: <i>False Discovery Rate</i>	PVDF: fluoruro de polivinilideno
FITC: Isocianato de fluoresceína	qRT-PCR: PCR cuantitativa
GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	RAS: <i>Rat sarcoma</i> (proteína G)
GBM: Glioblastoma	RB1: Retinoblastoma 1
GEF: Gefitinib	RT-PCR: transcripción reversa PCR
GEPAS: <i>Gene expression pattern analysis suite</i>	TCGA: <i>The Cancer Genome Atlas</i>
GSEA: <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>	TEMS: Temsirolimus
HDAC3: <i>Histone deacetylase 3</i>	TK: tirosina quinasa
HRAS: <i>v-Ha-Ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	TKI: Inhibidor de Tirosina quinasa
ICW: <i>In cell western</i>	TNF-α: Factor de necrosis tumoral α
IDH: isocitrato deshidrogenasa NADPH-dependiente	TP53: Proteína supresora de tumores p53
IHC: Inmunohistoquímica	TMZ: Temozolomida
	VEGF: <i>vascular endothelial growth factor</i>
	WB: <i>Western blot</i>
	wtEGFR: <i>wild type</i> EGFR (EGFR nativo)

Índice

Introducción	1
1. Gliomas. Definición, clasificación e incidencia.	1
1.1. Clasificación de los gliomas según la OMS	1
2. Alteraciones moleculares de los gliomas	3
2.1. Alteraciones en la dosis génica y mutaciones en GBM.....	5
2.2. Identificación de subtipos moleculares de GBM	7
3. Ruta del EGFR	8
3.1. Activación y funcionamiento	8
3.2. Desregulación de la ruta EGFR/PI3K.....	11
3.2.1 EGFR.....	11
3.2.2 PTEN	13
3.2.3 PI3K.....	13
4. Tratamiento de los GBM	14
4.1. Erlotinib.....	16
4.2. Gefitinib.....	17
4.3. Otros inhibidores.....	18
4.4. Tratamientos combinados	19
4.5. Uso de <i>microarrays</i> para predicción de respuesta a TKIs	21
Objetivos	23
Material y Métodos.....	27
1. Cultivos celulares e inhibidores.....	29
2. Viabilidad celular.....	30
3. Extracción de DNA y RNA	31
4. PCR y secuenciación.....	32
5. Detección de <i>EGFRvIII</i> por RT-PCR.....	33
6. Hibridación genómica comparada	34
7. MLPA.....	36
8. Análisis de expresión con <i>microarrays</i>	39
8.1. Muestras para los análisis de expresión génica.....	39
8.2. <i>Microarrays</i> de expresión y análisis de datos	39
9. PCR cuantitativa (qRT-PCR)	41
10. Citometría de flujo.....	41
10.1. Ciclo celular	42
10.2. Apoptosis	43
11. Análisis de proteínas.....	44

Índice

11.1. Inmunohistoquímica.....	44
11.2. <i>Western Blot</i>	45
11.3. <i>In cell western</i>	45
12. Análisis estadístico	47
Resultados.....	49
1. Caracterización molecular de líneas celulares de gliomas	51
1.1. Alteraciones en la dosis génica	51
1.1.1 Deleciones	53
1.1.2 Ganancias.....	60
1.2. Análisis de moléculas relevantes en GBM	64
1.2.1 PTEN	64
1.2.2 EGFR	66
1.2.3 TP53	67
1.3. Resumen de alteraciones moleculares en gliomas.....	68
2. Estudio del efecto de los inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT en las líneas celulares derivadas de gliomas	71
Erlotinib.....	71
2.1. Viabilidad celular.....	71
2.2. Tratamiento combinado con TEMS	73
2.3. Ciclo celular	78
2.4. Señalización intracelular.....	79
2.5. Perfil de expresión génica en sensibles y resistentes.....	82
2.6. Estudio del efecto del erlotinib sobre la expresión génica	89
Gefitinib.....	96
2.7. Viabilidad celular.....	96
2.8. Ciclo celular	97
2.9. Apoptosis	98
2.10. Señalización intracelular.....	99
LY294002	104
2.11. Viabilidad celular.....	104
Discusión.....	107
Conclusiones	125
Bibliografía	129
Publicaciones.....	143

Introducción

1. GLIOMAS. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN E INCIDENCIA

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) suponen el 2% de todas las neoplasias y la segunda causa de muerte por causas neurológicas por detrás de los accidentes cerebrovasculares. Constituyen uno de los tipos de cáncer con peor pronóstico, por su difícil tratamiento y su alta tasa de recidivas. Los gliomas son tumores de origen neuroepitelial que derivan de células cerebrales llamadas células gliales y representan más del 50% de todos los tumores del SNC. En España se calcula una incidencia de tumores cerebrales malignos de 8,73 por 100.000 habitantes/año según los datos de la Asociación Española Contra el Cáncer.

La organización mundial de la salud (OMS) actualmente clasifica los gliomas en base a criterios histopatológicos en: astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas y ependimomas (Figura 1) (Louis *et al.*, 2007).

1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS GLIOMAS SEGÚN LA OMS

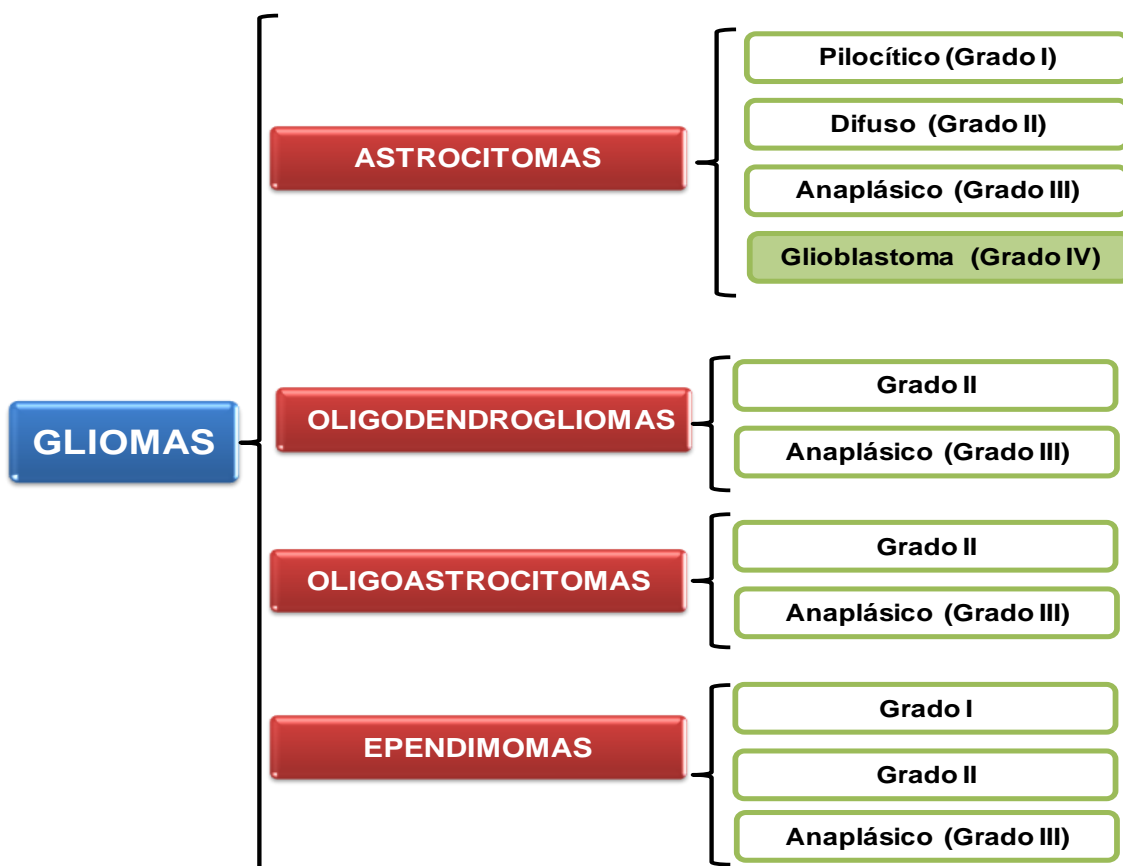


Figura 1. Clasificación de Gliomas según la OMS

Además del tipo de tumor, la OMS establece unos criterios para la gradación de las lesiones tumorales, que correlacionan con el pronóstico de la enfermedad. Esta gradación, aplicada a los astrocitomas, separaría principalmente esta entidad en dos grandes grupos: los de bajo grado de malignidad, que corresponden a astrocitomas de grado I (*astrocitoma pilocítico*, no infiltrante, sin tendencia a recurrir y que afecta sobre todo a población infantil) y grado II (*astrocitoma difuso*, infiltrante y con tendencia a recurrir) y los de alto grado, que comprenden los astrocitomas de grado III (*astrocitoma anaplásico*) y grado IV (*glioblastoma*) (Louis *et al.*, 2007). **Los astrocitomas de alto grado**, que son infiltrantes, y presentan altas tasas de proliferación, tienen tendencia a recurrir y **suponen el 76% del total de gliomas** según el registro de tumores del sistema nervioso central de Estados Unidos (CBTRUS, 2011).

La predicción en cuanto a supervivencia y respuesta al tratamiento está basada en la gradación tumoral, la edad del paciente, el estado neurológico, la localización y el comportamiento radiológico del tumor, los índices de proliferación y las alteraciones genéticas. Para cada entidad tumoral, las combinaciones de estos parámetros contribuyen a la estimación global del pronóstico. Sin embargo, a pesar de estas variables, en general, los pacientes con tumores de grado II sobreviven más de 5 años, mientras que aquellos con tumores de grado III tienen una esperanza de vida de 2-3 años.

La forma más agresiva de los gliomas es el **glioblastoma** (GBM) que supone más del 50% de los tumores cerebrales primarios. Tiene una baja tasa de supervivencia, con una esperanza de vida de un año para el 33% de los pacientes y sólo el 5% de los pacientes llegan a vivir más de 5 años tras el diagnóstico (CBTRUS 2011; Louis *et al.*, 2007).

Atendiendo a las características clínicas, los GBM se han dividido tradicionalmente en **GBM primarios** y **GBM secundarios**. Los **GBM primarios**, que representan la mayoría de los GBM, aparecen *de novo*, en pacientes con una edad media de unos 60 años, sin que existan lesiones previas. La historia clínica del paciente suele ser corta, debido a la gran malignidad y rápido crecimiento del tumor. Los **GBM secundarios**, que representan menos del 10% de los GBM, surgen como progresión de astrocitomas de más bajo grado (astrocitoma difuso o astrocitoma anaplásico) y

afectan a pacientes más jóvenes. La evolución clínica es más lenta y los pacientes tienen una supervivencia media significativamente superior, tanto por la menor edad del paciente como por el crecimiento tumoral más lento (Ohgaki y Kleihues, 2007).

2. ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS GLIOMAS

A pesar de que clásicamente la clasificación histopatológica ha sido determinante para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los tumores, ésta no siempre es sencilla, especialmente en el caso de los gliomas. Es por ello que se han dirigido numerosos esfuerzos hacia el descubrimiento de marcadores moleculares que apoyen los hallazgos histológicos.

Centrándonos en los GBM, las características moleculares que se asocian a los dos grupos serían las siguientes: los **GBM primarios** se caracterizan por presentar amplificación de EGFR, pérdida de 10q (y/o mutación de *PTEN*), pérdida de CDKN2A/B/p14ARF y amplificación de PDGFRA, mientras que los **GBM secundarios** presentan mutaciones en TP53 más frecuentemente (Louis *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguna de estas alteraciones parece suficiente para discriminar correctamente estas dos entidades.

Una de las alteraciones recientemente descritas es la mutación en el dominio de unión al sustrato de la enzima isocitrato deshidrogenasa NADPH-dependiente (**IDH**) que participa en el ciclo del ácido cítrico (Parsons *et al.*, 2008). Se conocen varias isoenzimas para esta proteínas, de las que **IDH1** e **IDH2** son las que están implicadas en gliomagénesis. Estas mutaciones provocan alteraciones bioquímicas en la glucólisis y en la lipogénesis e inhiben la metilación de histonas y del DNA, alterando la regulación epigenética y aumentando la expresión de genes que controlan la diferenciación y proliferación celular (Dunn *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). Los estudios en gliomas muestran que estas mutaciones son frecuentes en gliomas de grado II y III y en GBM secundarios, mientras que están ausentes en los astrocitomas pilocíticos (grado I), GBM primarios y ependimomas (Parsons *et al.*, 2008; Riemenschneider *et al.*, 2010). El descubrimiento de la mutación de *IDH* en etapas precoces de la gliomagénesis ha hecho cambiar la idea sobre el origen

de los glioblastomas primarios y secundarios. De este modo, la adquisición de esta mutación por parte de la célula precursora, parece ser clave en la progresión tumoral (Figura 2).

Por otra parte, la presencia de mutaciones en *IDH* se ha establecido como un factor pronóstico, ya que se han asociado con una mayor supervivencia (Parsons *et al.*, 2008). Parsons y colaboradores proponen que la presencia de mutaciones en *IDH1* por sí sola constituye un mejor factor pronóstico que los que se usaban anteriormente, como eran la edad del paciente y la mutación en *TP53*. Estudios recientes demuestran que aquellos pacientes con tumores portadores de mutaciones en *IDH1* ó *IDH2* tienen una mayor supervivencia que pacientes sin mutación, sugiriendo la necesidad de aplicar una terapia más agresiva para este grupo de pacientes (Ohno *et al.*, 2013).

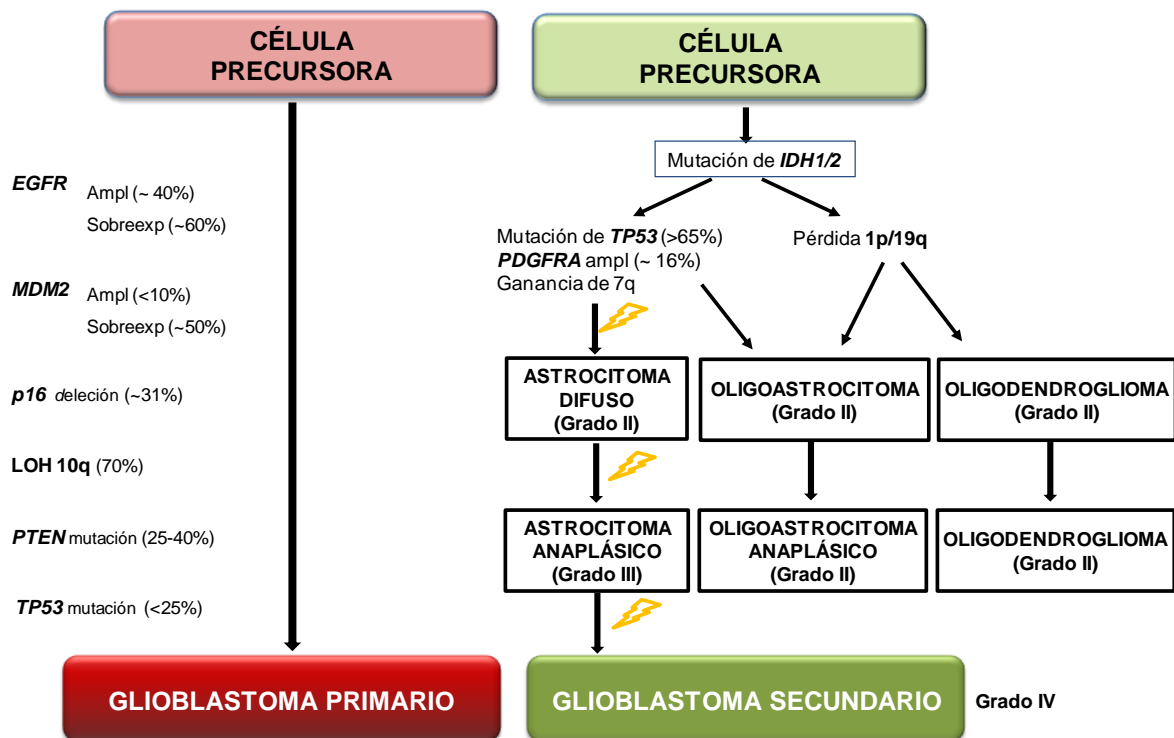


Figura 2. Alteraciones moleculares en gliomas difusos (adaptado de Ohgaki y Klehues, 2007 y Riemenschneider *et al.*, 2010).

2.1 ALTERACIONES EN LA DOSIS GÉNICA Y MUTACIONES EN GBM

El desarrollo de técnicas de análisis masivo de genes ha supuesto un gran avance en el estudio molecular del cáncer. El análisis de la dosis génica y de expresión mediante *microarrays* en GBM ha permitido conocer en profundidad la naturaleza de este tumor e identificar nuevas alteraciones moleculares. Los datos obtenidos en los diferentes estudios con *microarrays* se recogen, en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) del Instituto de Salud Nacional de Estados Unidos (<http://cancergenome.nih.gov>), y, entre otras más, en estas dos bases de datos (www.oncomine.org; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/>). Esta última, además recoge datos de genes mutados implicados en cáncer, mutaciones puntuales y datos sobre líneas celulares.

Mediante técnicas de análisis génico masivo se han descrito las alteraciones de la **dosis génica** más frecuentes en GBM. Se han encontrado amplificaciones en 1q (*MDM4*, *PIK3C2B*), 4q (*PDGFRA*), 7p (*EGFR*, *CDK6*), 7q (*MET*, *PEX1*, *CDK6*), 12p (*CCDN2*), 12q (*MDM2*, *GLI*, *CDK4*) o 13q (*TNFSF13B*, *COL4A2*). Las regiones más frecuentemente perdidas han sido 1p (*CAMTA1*, *CDKN2C*), 6q (*PARK2*), 9p (*CDKN2A*, *CDKN2B*), 10q (*PTEN*) 11q, 13q (*SPRY2*, *RB1*) (Rao *et al.*, 2010; Ruano *et al.*, 2006).

En concreto, estos análisis han permitido identificar las tres rutas **más frecuentemente alteradas** en el GBM: la **ruta TP53** (TP53, MDM2, MDM4) con el **87%** de los tumores afectados, la **ruta RB1** (RB1, CD4, CDKN2A), que afecta al **78%**, y la **ruta RTK/PI3K/PTEN** (PI3KCA, PIK3R1, PTEN, IRS1, MET, NF1, EGFR, PDGFR) que afecta al **88%** de los pacientes con GBM. Además en la mayoría de los casos, las mutaciones afectan exclusivamente a uno de los miembros de cada ruta, no encontrándose de manera general, alteraciones en varias proteínas de una misma ruta a la vez. Esto sugiere que estas mutaciones son funcionalmente equivalentes para la génesis tumoral (Chin *et al.*, 2008).

En un estudio de nuestro grupo en 194 GBM primarios, se observó un patrón excluyente para la alteración de *EGFR* y *TP53*, de modo, que si un

tumor presenta una alteración, es poco frecuente que presente la otra de manera simultánea. Estas dos alteraciones por sí mismas no constituyen factores pronósticos independientes, sin embargo, se observó que el grupo minoritario de los GBM que portaban ambas alteraciones presentaban una peor supervivencia (Ruano *et al.*, 2009).

En cuanto a **mutaciones génicas puntuales**, el trabajo de Parsons y colaboradores recoge las siguientes (entre paréntesis se muestran los porcentajes de tumores afectados para n=105): **TP53** (35%), **PTEN** (26%), **NF1** (15%), **EGFR** (14%), **IDH1** (11%), **PI3KCA** (10%), **PIK3R1** y **RB1** (8% respectivamente) (Parsons *et al.*, 2008) (Tabla 1).

A continuación, en la siguiente tabla se recogen las alteraciones moleculares más frecuentes en GBM, según datos del TCGA (Chin *et al.*, 2008).

RUTA	GENES	% CASOS * (DEL/AMP)	% MUTACIONES PUNTUALES **
TP53	PIK3C2B,MDM4	7.7 (35/456) AMP	
	MDM2	9.2 (42/456) AMP	
	TP53	1.9 (7/366) DEL	35
RB1	CDKN2A,CDKN2B	46.4 (170/366) DEL	0
	GLI,CDK4	13.4 (61/456) AMP	0
	CAMTA1,CDKN2C	4.6 (17/366) DEL	
	SPRY2, RB1	6.3 (23/366) DEL	8
	CDK6	2 (9/456) AMP	
	CCND2	2.2 (10/456) AMP	
RTK/ PI3K / PTEN	EGFR	35.7 (163/456) AMP	14
	PTEN	10.9 (40/366) DEL	26
	AKT1	0.9 (4/456) AMP	
	NF1	2.2 (8/366) DEL	15
	PDGFRA	7.7 (35/456) AMP	
	MET	3.7 (17/456) AMP	

Tabla 1. Tabla con alteraciones moleculares más frecuentes en GBM recogidas en TCGA. AMP: amplificación; DEL: delección homocigota; * adaptado de Rao *et al.*, 2010; **: para n=105, Parsons *et al.*, 2008

2.2 IDENTIFICACIÓN DE SUBTIPOS MOLECULARES DE GBM SEGÚN SUS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

El rápido progreso de las técnicas de análisis génico masivo en los últimos años ha permitido realizar diversos estudios de expresión génica a gran escala en GBM. En uno de estos estudios, Philips y colaboradores, definieron una firma molecular basada en 35 genes, atendiendo a los genes relacionados con supervivencia, que diferenciaban los gliomas de alto grado (grados III y IV) en tres subtipos: *proneural*, *proliferativo* y *mesenquimal*. Mientras que el subtipo *proneural* se asociaría a grado histológico III (pacientes más jóvenes y con una mejor supervivencia) los otros dos subtipos conllevarían un peor pronóstico, asociándose a grado IV, necrosis celular, pérdida de *PTEN*, ganancia o amplificación de *EGFR* y ganancia de *PIK3R3*. (Phillips *et al.*, 2006).

Más recientemente, también mediante el análisis de los perfiles de expresión génica, Verhaak y colaboradores, identificaron 840 genes que les permitieron establecer cuatro subtipos moleculares de GBM: *clásico*, *mesenquimal*, *proneural* y *neural* (Verhaak *et al.*, 2010). Este trabajo, además, demostraba que estos subtipos tenían orígenes celulares distintos. Mientras que el subtipo *clásico*, derivaría de astrocitos, el *proneural* de oligodendrocitos y el *mesenquimal* de células astrogiales, el subtipo *neural*, mantiene marcadores de oligodendrocitos, astrocitos y neuronas. En cuanto a las características de cada subtipo serían las siguientes:

- *Proneural*: es el más semejante a los GBM secundarios. Afecta a pacientes más jóvenes, tiene mutación en *IDH1* y en *TP53* y amplificación de *PDGFRA*. Sería el subtipo de GBM que presentaría una mejor supervivencia.
- *Neural*: tiene marcadores neuronales *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5* y es el que más se parece al cerebro normal.
- *Clásico*: presentaría las alteraciones más típicas de los GBM, como ganancia del cromosoma 7, con amplificación y/o mutación de *EGFR*,

pérdida del cromosoma 10, deleción de *CDKN2A* y ausencia del resto de alteraciones (ej. *TP53*, *IDH1*, etc.).

- *Mesenquimal*: se caracteriza por alta expresión de marcadores de células mesenquimales, *CHI3L1* y *MET* y por deleción de *NF1*.

Así, Verhaak y colaboradores, proponen que la clasificación molecular de los GBM se basaría en la caracterización del siguiente conjunto de biomarcadores: pérdida de *NF1* y *PTEN*, mutación de *IDH1* y *PI3K*, amplificación de *PDGFRA* y *EGFR* y estado de metilación de *MGMT* (Verhaak *et al.*, 2010).

Por otra parte, además de permitir la clasificación molecular de los gliomas, estos estudios de expresión génica han propuesto la hipótesis más aceptada en la actualidad de que los gliomas derivarían de células madre neuronales (*neural stem cells*) y no de células gliales, como se creía anteriormente (Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010).

3. RUTA DEL EGFR

Como hemos visto anteriormente, uno de los principales mecanismos responsables de la gliomagénesis es la amplificación y/o sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**), especialmente en GBM primarios.

3.1 ACTIVACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE LA RUTA DEL EGFR

El EGFR, que está implicado en varios tumores humanos además de en gliomas, pertenece a la familia de receptores tipo HER, que están implicados en proliferación, diferenciación celular y supervivencia. Todos los receptores de la familia HER, de los que EGFR es el tipo 1 (HER1), constan de un dominio extracelular de unión al ligando, una parte transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (TK) (Figura 3). Los receptores de la familia HER se expresan en muchos tipos celulares y están implicados, vía cascada de señalización celular, en el control de diversas funciones celulares, incluyendo proliferación y diferenciación (Wells, 1999). El EGFR se activa por unión del ligando, que puede ser el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el

factor de crecimiento tumoral α (TNF α). Este ligando se une al dominio extracelular y produce la dimerización del receptor, que activa el dominio intracelular TK por autofosforilación.

Una vez fosforilado, el EGFR activa otras rutas intracelulares, que se sabe que están implicadas en diversos procesos tumorales, como la ruta de **MAPK**, la de **PI3K/AKT** y la de **Jak2/STAT3** (Figura 3) (Gazdar *et al.*, 2009; Karpel-Massler *et al.*, 2009; Krastad *et al.*, 2010).

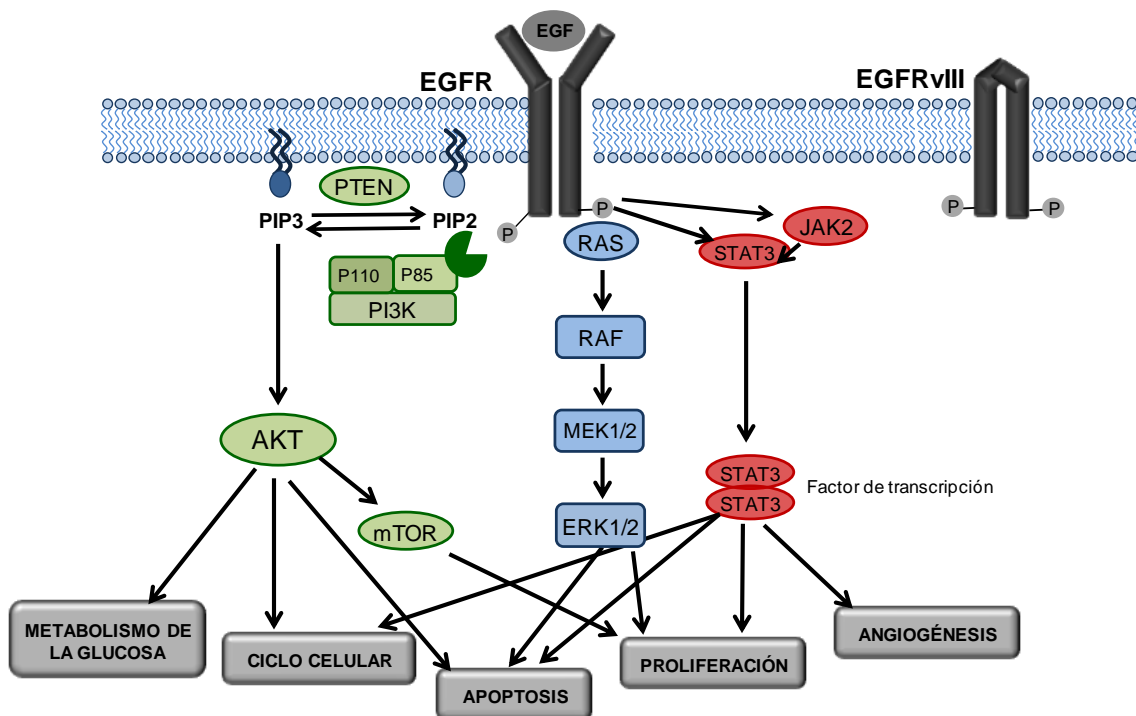


Figura 3. Ruta EGFR en la que se muestran las vías intracelulares por las que actúa este receptor: MAPK (RAS, RAF, ERK), PI3K/AKT y Jak2/STAT3.

La **ruta de la PI3K/AKT** se activaría de la siguiente forma. La fosforilación del dominio TK del receptor EGFR, atrae hacia la membrana a la fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3K), que se une al mismo a través de dos dominios SH2. La PI3K, genera el segundo mensajero, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), a partir de la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂). Esta quinasa es un heterodímero formado por dos subunidades, la p110, que es la subunidad catalítica y la p85, que es la subunidad reguladora y es la que se

une al dominio TK del EGFR. Esta producción de PIP3 en la membrana intracelular produce la activación de otras proteínas, como AKT (Fresno Vara *et al.*, 2004; Vivanco *et al.*, 2002). Esta proteína es el punto en común y de regulación de muchos otros procesos celulares, como se ha mencionado anteriormente: metabolismo de la glucosa, ciclo celular, apoptosis, etc. (Figura 3, Tabla 2).

Función Celular	Genes implicados
Apoptosis	<i>BAD, NFκB, FKHR, CREB, IKK, procaspasa 9, MDM2</i>
Ciclo celular y proliferación	<i>GSK3β, mTOR, p27, TSC1/TSC2, MDM2</i>
Metabolismo de la glucosa	<i>GSK3β</i>
Reparación del DNA	<i>MDM2/TP53</i>

Tabla 2. Procesos celulares regulados por AKT y algunos de los genes implicados (Fresno Vara *et al.*, 2004; Vivanco *et al.*, 2002).

La **ruta MAPK** se activa mediante la acción de la proteína G RAS de membrana, una de las primeras proteínas oncogénicas identificadas. La activación de RAS por el EGFR recluta a RAF, iniciando así la cascada de señalización celular que implica a las quinasas MEK y ERK1/2 (Figura 3) y que causa la traslocación al núcleo de distintos factores de transcripción que regulan la proliferación (CREB) y la supervivencia (NF-Kb) (Krakstad *et al.*, 2010).

Por otro lado, la ruta **Jak2/STAT3** que también se activa por EGFR, se ha encontrado constitutivamente activada en gliomas de alto grado y algunos estudios indican que la inhibición conjunta de EGFR y STAT3, aumenta la efectividad de estos agentes terapéuticos en GBM (Lo *et al.*, 2008).

Otra proteína muy importante en la ruta de señalización de EGFR/PI3K/AKT y en la gliomagénesis es la fosfatasa **PTEN** (*phosphatase and tensin homologue*), que ejerce el efecto opuesto a la PI3K, mediante la defosforilación del segundo mensajero, PIP₃. PTEN es una proteína de 47 kDa codificada por un gen de 9 exones localizado en 10q23.3. Además de inhibir la

señalización a través AKT, también existen indicios de que puede inhibir la señalización a través de MAPK (Yart *et al.*, 2001).

3.2 DESREGULACIÓN DE LA RUTA EGFR/PI3K

Como se ha mencionado, una de las principales rutas celulares cuya alteración está directamente relacionada con la génesis de los gliomas, es la ruta del EGFR/PI3K. A continuación se detallan, los principales puntos en los que se ve afectada esta ruta de señalización en los gliomas.

3.2.1 EGFR

Entre las variantes mutacionales que puede tener este receptor, la más frecuente en GBM primarios es **EGFRvIII**, que surge a partir de la delección de los exones 2 al 7. EGFRvIII se encuentra hasta en un tercio de GBM primarios y hasta en el 50-60% de los GBM con amplificación del gen *EGFR* (Louis *et al.*, 2007; Ohgaki & Kleihues, 2007). A consecuencia de la delección, se genera una forma aberrante del EGFR carente del dominio extracelular de unión a ligando y que está constitutivamente activo, es decir, que no necesita de su ligando para activarse (Gan *et al.*, 2009) (Figura 4).

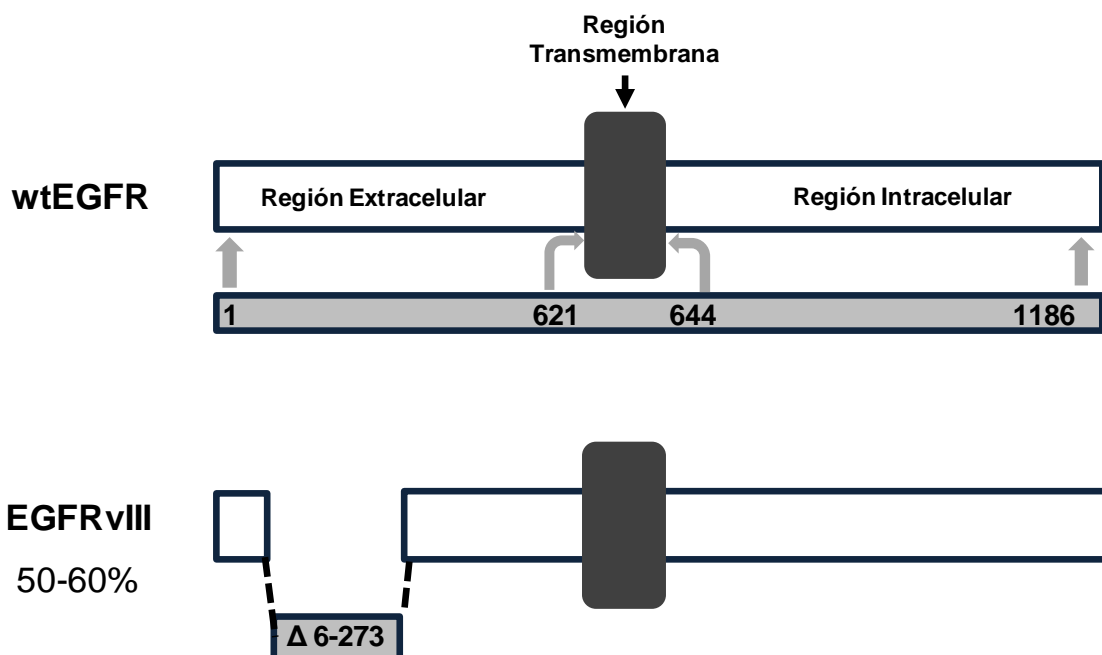


Figura 4. Esquema de la estructura del receptor nativo (wtEGFR) y del receptor mutante (EGFRvIII) (adaptado de Nicholas *et al.*, 2006),

Hay estudios *in vitro* que han demostrado que EGFRvIII es más tumorigénico que el receptor nativo (wtEGFR) y que la sobreexpresión del mutante puede influir en varios aspectos de la biología tumoral, incluyendo supervivencia, proliferación celular, motilidad e invasividad y resistencia a los tratamientos. Además de tener una activación constitutiva, hay estudios que indican que el EGFRvIII permanece durante más tiempo en la membrana celular, mientras que el wtEGFR es rápidamente internalizado por endocitosis (Hatanpaa *et al.*, 2010).

Por otro lado, también se ha demostrado, que ante un cierto número de copias del receptor, las tres rutas activadas por EGFR (PI3K, MAPK y Jak2/STAT3) se activan equitativamente, pero ante el incremento de los niveles del EGFRvIII, se favorece más la ruta de PI3K (Huang *et al.*, 2007). La activación diferencial de la ruta según tenga el wtEGFR o EGFRvIII sugiere que los tratamientos deben ser distintos según la variante que presente el tumor a tratar. Así en el caso de wtEGFR podría ser conveniente usar inhibidores de EGFR en combinación con inhibidores de MEK (Huang *et al.*, 2007).

Aunque algunos estudios muestran que los pacientes portadores del receptor mutante EGFRvIII presentan una peor supervivencia y una recurrencia del tumor más rápida que los no portadores (Halastch *et al.*, 2006), hay otros que concluyen que la presencia del receptor mutante no está relacionada con la supervivencia (Aldape *et al.*, 2004; Gan *et al.*, 2009). Además, también se ha publicado que la amplificación y/o sobreexpresión de EGFR tampoco tiene relación con la supervivencia de los pacientes de manera general, y esta asociación sólo se ve cuando el análisis se hace en grupos de población por edades. Mientras que la amplificación de EGFR en pacientes jóvenes (<35 años) augura un peor pronóstico, el pronóstico de los pacientes de edades más avanzadas (>65 años) portadores de EGFRvIII es más favorable (Hatanpaa *et al.*, 2010).

En otros tipos de cáncer, como en el cancer de pulmón, se han descrito mutaciones activadoras en el dominio intracitoplasmático del EGFR (L858R y delección del exon 19) que están asociadas a una mejor respuesta a inhibidores de tirosina kinasas (TKIs) (Costa *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007). Sin embargo,

ni estas mutaciones, ni las relacionadas con resistencia, se suelen dar en gliomas (Marie *et al.*, 2005; Omuro *et al.*, 2007; Toth *et al.*, 2009).

3.2.2 PTEN

Como se ha mencionado anteriormente, una de las alteraciones comunes en GBM, sobre todo en los primarios, es la pérdida de la actividad de PTEN, que produce un exceso de activación de la ruta EGFR. De este modo, la pérdida de PTEN favorece la proliferación e inhibe la apoptosis. Diversos estudios, recogidos en la revisión de Knobbe y colaboradores, demuestran que la re-expresión de *PTEN* en líneas celulares de GBM con delección del gen, causa detención del ciclo celular por parada en la fase G1, evita la migración, favorece la apoptosis y regula la angiogénesis (Knobbe *et al.*, 2002).

La pérdida de actividad de PTEN puede ocurrir por varios mecanismos. Uno de ellos es la pérdida del gen en homocigosis, que según estudios de análisis génico masivo puede darse en alrededor de un 10% de casos (Rao *et al.*, 2010). Sin embargo, el mecanismo más común, es la pérdida de una de las copias del gen detectada mediante pérdida de heterocigosidad (LOH) en 10q (que ocurre hasta en el 70% de los GBM) y la mutación de la copia restante (Ohgaki *et al.*, 2007; Riemenschneider *et al.*, 2010). Las mutaciones son frecuentes en el caso de GBM primarios, donde pueden llegar al 40% de los casos. Aunque estudios en gliomas han identificado mutaciones somáticas localizadas a lo largo de todo el gen *PTEN*, la mayor incidencia se da en el exón 5 y en el principio del exón 6 que es donde se localiza el dominio catalítico de la proteína (Knobbe *et al.*, 2002).

3.2.3 PI3K

Además de por la inactivación de PTEN, la ruta PI3K se puede desregular en cáncer por mutación puntual o amplificación génica de la PI3K. Esta proteína está formada por dos subunidades: la subunidad catalítica p110 α , codificada por el gen *PI3KCA*, y la subunidad reguladora p85 α , codificada por el gen *PIK3R1*. La mayoría de las alteraciones descritas en PI3K se localizan en el gen *PI3KCA*. Estas alteraciones pueden ser por la

amplificación de *PIK3CA* o por **mutaciones puntuales** que causan sobre-activación de la ruta PI3K (Karakas *et al.*, 2006; Kita *et al.*, 2007; Vogt *et al.*, 2006). Según el TCGA, se encuentran amplificaciones de *PI3KCA* en el 2% de los GBM y en el caso de mutaciones activadoras en *PI3KCA*, los porcentajes varían desde el 5 al 25% de los casos según distintos estudios (Broderick *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2008; Samuels *et al.*, 2004).

Por otra parte, el trabajo del TCGA también evidenció la presencia de mutaciones en *PIK3R1*, que se encuentran raramente en otros tipos de cáncer. Se encontraron mutaciones en *PIK3R1* en el 10% (9/91) de los GBM analizados, coincidiendo con los que no tenían alteraciones en *PI3KCA* (Chin *et al.*, 2008).

Además, se ha observado que las mutaciones en *PI3KCA* y *PTEN* son mutuamente excluyentes, lo que sugiere que la señalización aberrante de la ruta PI3K en cáncer, puede ocurrir por cualquiera de los dos mecanismos (Karakas *et al.*, 2006; Kita *et al.*, 2007; Samuels *et al.*, 2005).

4. TRATAMIENTO DE LOS GLIOBLASTOMAS

El tratamiento principal de los GBM, y también de los astrocitomas anaplásicos, consiste en la resección quirúrgica del tumor siempre que sea posible, seguido por radioterapia y un tratamiento adjuvante de quimioterapia, que usa principalmente compuestos intercalantes como la carmustina (BCNU) o la temozolomida (TMZ) (NCCN, 2010 ; Stupp *et al.*, 2007). Cabe mencionar en este punto, un marcador molecular de respuesta a terapia con agentes alquilantes, como es la **metilación** del promotor del gen *MGMT*. El gen *MGMT* codifica la enzima O6-metilguanina-ADN metiltransferasa responsable de la reparación del DNA, que elimina grupos alquilo de la posición O⁶ de la guanina, como los que introducen los agentes alquilantes. Si el promotor no está metilado, la *MGMT* se expresa normalmente y puede eliminar los grupos alquilo introducidos por los agentes alquilantes, por tanto la terapia con estos agentes no tendría efecto. En cambio, cuando su promotor está metilado no

hay expresión de la enzima, por tanto no hay reparación del DNA, por lo que la terapia con agentes alquilantes se verá favorecida (Esteller *et al.*, 2000).

Además, la presencia del promotor de *MGMT* metilado, indica un buen pronóstico y una mejor supervivencia en pacientes en tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia (Esteller *et al.*, 2000).

Sin embargo, también existen otras líneas secundarias de tratamiento en investigación (Karpel-Massler *et al.*, 2009; Krakstad *et al.*, 2010):

- **tratamiento con inhibidores de angiogénesis:** como el bevacizumab (Avastin®), que es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) secretado por los tumores para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Avastin atrapa el ligando VEGF impidiendo la formación de nuevos vasos y evitando así la progresión del tumor (Beal *et al.*, 2011). Fue aprobado en 2009 para el tratamiento de GBM recurrentes previamente tratados, basados en tres estudios de fase II (Friedman *et al.*, 2009; Vredenburgh *et al.*, 2007; Kreisl *et al.*, 2009).
- **anticuerpos contra el receptor EGFR:** impiden la unión externa del ligando al receptor, evitando su activación. Aunque en otros tumores, como el cáncer de colon, su uso está ya incluido en guías clínicas, el caso de los tumores del SNC es especial, debido a que se trata de macromoléculas que es complicado que atraviesen la barrera hematoencefálica y por tanto, su eficacia es limitada. Existen algunos ensayos clínicos en gliomas de alto grado que utilizan los siguientes anticuerpos: cetuximab (Erbixim®) (Combs *et al.*, 2006) y nimotuzumab (Theraloc®) (Ramos *et al.*, 2006).
- **inhibidores de tirosina quinasa (TKIs):** pequeñas moléculas que se intercalan en el dominio tirosina quinasa intracelular del receptor EGFR impidiendo su fosforilación y, por tanto, evitando su activación (Karpel-Massler *et al.*, 2009). Este tipo de inhibidores son los más ampliamente estudiados para el tratamiento de gliomas. En la Tabla 3 se recogen algunos de los TKIs utilizados actualmente en ensayos clínicos (Karpel-Massler *et al.*, 2009).

FÁRMACO	NOMBRE COMERCIAL	DIANA	COMPAÑÍA
Gefitinib	Iressa	EGFR	AstraZeneca Pharm.
Erlotinib	Tarceva	EGFR, EGFRvIII	Genentech Inc
Lapatinib	Tykerb	EGFR, HER2	GlaxoSmithKline
ZD6474	Zactima	EGFR, VEGFR	AstraZeneca Pharm.
AEE78		EGFR, HER2, VEGFR	Novartis Ph.Corp.
EKB569		EGFR	Wyeth Pharm.

Tabla 3. Inhibidores de tirosin-quinasa aplicados en ensayos clínicos para el tratamiento de gliomas de alto grado (adaptado de Karpel-Massler *et al.*, 2009)

4.1 ERLOTINIB

Erlotinib (Tarceva®, Genentech Inc, www.tarceva.com) es un pequeña molécula del grupo de TKIs (Figura 5) que se une al dominio intracelular del EGFR. De este modo, compite con el ATP e impide la autofosforilación y la activación del receptor (Figura 6). Además, también es capaz de actuar en el receptor mutante EGFRvIII. Su uso está aprobado para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) avanzado y para el cáncer de páncreas avanzado. Entre los efectos atribuidos a ERL se encuentran los siguientes: induce apoptosis; inhibe el ciclo celular; disminuye la expresión de *EGFR* y *EGFRvIII*, por disminución de su mRNA; inhibe genes que codifican para proteínas de invasividad tumoral (Krakstad *et al.*, 2010; Minitti *et al.*, 2009; Raizer *et al.*, 2005; Ramis *et al.*, 2012).

En la actualidad se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos con ERL tanto en monoterapia como asociado a otros tratamientos (Krastad *et al.*, 2010; www.clinicaltrials.gov). Salvando las diferencias entre estudios, la conclusión común que se obtiene es que la eficacia de ERL como agente terapéutico único es limitada en pacientes con GBM progresivo o recurrente. En general, se obtienen peores respuestas que en pacientes tratados con TMZ o BCNU (Raizer *et al.*, 2010; Van den Bent *et al.*, 2009; Yung *et al.*, 2010) y sólo algunos grupos de pacientes muestran beneficios con esta terapia (Preusser *et al.*, 2008). De aquí se sugiere que, para aumentar el beneficio

proporcionado por ERL, no se debe aplicar de forma general a todos los pacientes, sino que se deben seleccionar previamente aquellos individuos que previsiblemente vayan a responder mejor.

En cuanto al uso de ERL en combinación con TMZ y radioterapia en tratamiento de primera línea también existen controversias. Mientras que algunos trabajos encuentran que los pacientes tratados con ERL, TMZ y radioterapia presentan una mejor supervivencia media que los pacientes tratados sólo con la terapia convencional (19.3 meses vs 14.1 meses) (Prados MD *et al.*, 2009), otros demuestran que la adición de ERL a esa terapia, no sólo no reporta beneficio (Brown *et al.*, 2008), sino que además supone un aumento intolerable en la toxicidad (Peerboom *et al.*, 2010).

En cuanto a la predicción de la respuesta al tratamiento con ERL también existen controversias. Mientras que unos investigadores concluyen que la mejor respuesta al tratamiento se da en pacientes que coexpresan PTEN y EGFRvIII (Friedman *et al.*, 2005; Mellingohf *et al.*, 2005, 2007; Preusser *et al.*, 2008), otros no corroboran estos resultados e indican que no existe relación entre la amplificación de EGFR y una respuesta más favorable al ERL (Brown *et al.*, 2008; Raizer *et al.*, al 2010; Yung *et al.*, 2010; Van der Bent *et al.*; 2009).

4.2 GEFITINIB

Gefitinib (GEF; Iressa®, Astrazeneca Pharmaceuticals) es un pequeña molécula del grupo TKIs (Figura 5) que actúa de la misma manera que el ERL, pero en este caso, sólo es activo frente a wtEGFR y no frente al EGFRvIII (Figura 6). Se ha aprobado su uso como tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) avanzado y metastático, que sea portador de mutaciones activadoras en dominio tirosina quinasa, donde se han encontrado mejores resultados con GEF que usando quimioterapia con carboxiplatino/paclitaxel (www.iressa.com; www.gefitinib.org). Ha resultado menos efectivo que el ERL para el tratamiento de GBM, pudiendo deberse a que los gliomas carecen de las mutaciones en los exones 19 y 21 del dominio tirosina quinasa típicas del cáncer de pulmón que favorecen la respuesta a GEF en el cáncer de pulmón (Marie *et al.*, 2005).

Como agente antitumoral, gefitinib detiene el ciclo celular, causa apoptosis, inhibe la angiogénesis, produce la sensibilización *in vitro* de células de GBM a radioterapia, induce estabilización del tumor pero no regresión (Costa *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007; Guillamo *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 2006).

Los resultados de los ensayos clínicos en cuanto al uso de GEF en el tratamiento GBM no son notables, no encontrándose mejor supervivencia ni mejor supervivencia libre de progresión (Hegi *et al.*, 2011; Rich *et al.*, 2004; Uhm *et al.*, 2011). Curiosamente, en el trabajo de Uhm y colaboradores, sí que se observó que el grupo de pacientes que presentaba los efectos secundarios típicos del GEF (urticaria y diarrea) tenían una mejor supervivencia.

4.3 OTROS INHIBIDORES

LY294002 (LY) es un potente inhibidor reversible y específico de la PI3K, que compite con el ATP en su unión a la proteína, no afectando ni al EGFR, ni a la ruta MAPK (Figura 5,6). En líneas celulares de gliomas, LY causa apoptosis, inhibe la proliferación celular, mediante la represión de la ruta Wnt/ β -catenina y favorece el efecto citotóxico de la temozolomida por inhibición de la ruta PI3K/AKT (Chen *et al.*, 2012; Guillard *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010).

Temsirolimus (TEMS) es un inhibidor de mTOR, aprobado para el tratamiento del carcinoma de células renales (TORISEL, Pfizer Inc®, www.torisel.com). Este fármaco inhibe la proliferación celular e impide la formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura 5, 6). Aunque hasta ahora los resultados del uso de TEMS en monoterapia para el tratamiento de GBM mostraban resultados muy limitados (ciertas mejoras radiográficas y un aumento del tiempo libre de progresión) (Chang *et al.*, 2005; Cloughesy *et al.*, 2008; Galanis *et al.*, 2005), existen evidencias de beneficio en combinación con otros inhibidores de EGFR (Minitti *et al.*, 2009; Reardon *et al.*, 2006; Reardon *et al.*, 2010; Thaker *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha visto que TEMS disminuye la invasividad celular *in vitro* independientemente del estado de PTEN (Weiler *et al.*, 2013), reduciendo el efecto proinvasivo de la radioterapia. Como inconveniente, se ha descrito que el uso de TEMS en combinación con quimioterapia y radiación en GBM aumenta el riesgo de infecciones graves, por

lo que se necesita realizar un tratamiento antibióterápico profiláctico (Sarkaria *et al.*, 2010).

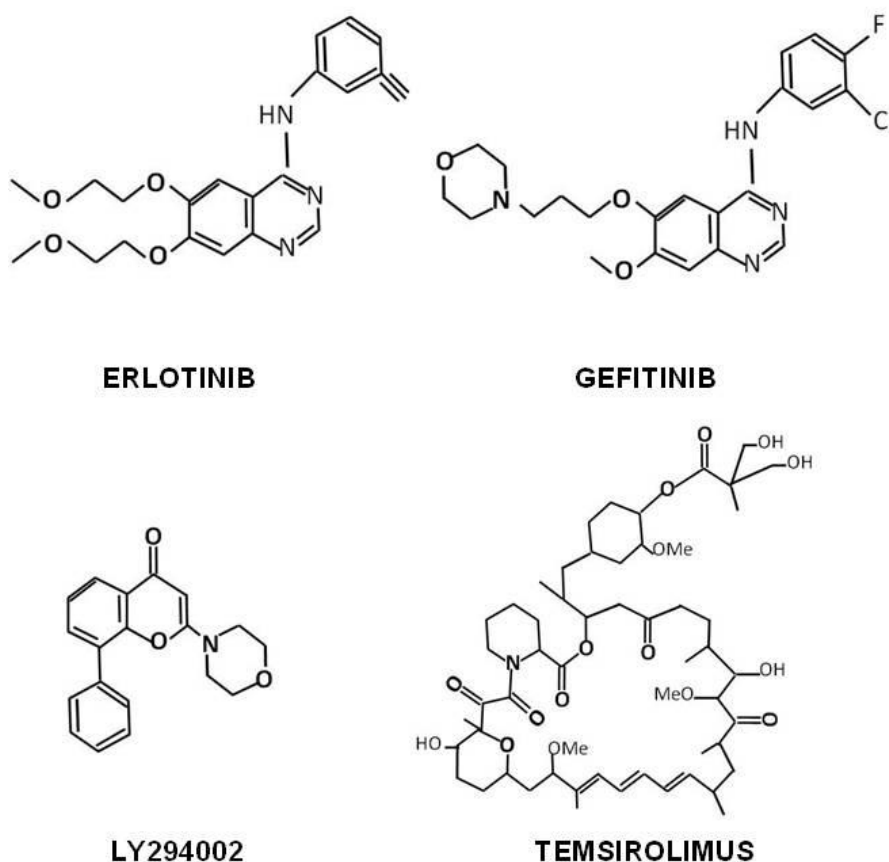


Figura 5 Estructuras moleculares de los inhibidores: erlotinib, gefitinib, LY294002, temsirolimus

4.4 TRATAMIENTOS COMBINADOS

Ante la baja eficacia en general de los TKIs en la terapia de GBM, se están diseñando nuevos estudios en los que estos inhibidores del EGFR se usen en combinación con otros agentes que potencien sus efectos. En la actualidad, existen diversos ensayos clínicos que analizan los efectos de la combinación de TKIs con otros inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT, como el inhibidor de mTOR, sirolimus. En estos trabajos, los GBM recurrentes eran tratados con una combinación de sirolimus y ERL (ensayo en fase II, Reardon *et al.*, 2010) o GEF (ensayo en fase I, Reardon *et al.*, 2006). Ambos estudios han demostrado una buena tolerancia (baja toxicidad) en los pacientes y unos mejores resultados de la terapia combinada frente a la terapia única, debido a

un efecto sinérgico de ambos agentes. Sin embargo, los resultados globales han sido poco notables, tal vez debido a que se trataba de pacientes con GBM recurrentes, con una historia clínica avanzada y un tratamiento previo agresivo.

Estos resultados no concluyentes conducen a la búsqueda de mejores marcadores moleculares que permitan predecir la respuesta y seleccionar aquellos grupos de pacientes, que por las características de sus tumores, puedan beneficiarse de esta terapia. La expresión de EGFRvIII, la amplificación de *EGFR* y la pérdida de *PTEN*, parecen tener gran importancia en la respuesta a TKIs, pero no de manera exclusiva, y resulta evidente que existen otros mecanismos genéticos que determinan esta respuesta. Por ello, resulta esencial por un lado, conocer bien cuáles son los mecanismos de acción de estos inhibidores y por otra parte, entender bien los complejos perfiles de los tumores que determinan las variaciones individuales de respuesta a los TKIs.

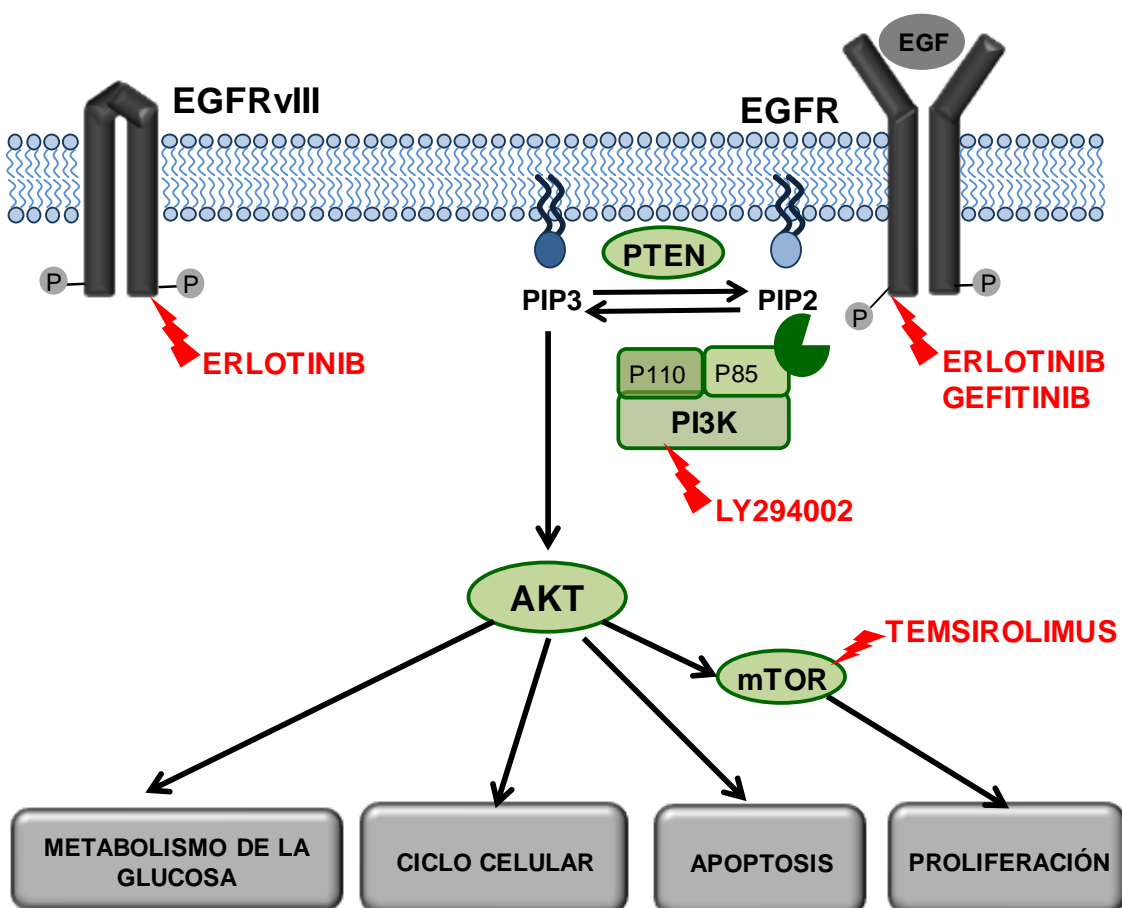


Figura 6. Ruta del EGFR y lugares de actuación de los inhibidores

4.5 USO DE *MICROARRAYS* PARA PREDICCIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TKIS EN GLIOBLASTOMAS

El análisis molecular masivo mediante *microarrays* tiene un interés especial en el estudio de la predicción de respuesta a los tratamientos, en dónde lo que se busca es conocer con antelación qué pacientes van o no a responder a dichos tratamientos para evitar una exposición y unas toxicidades innecesarias.

Los grupos liderados por Halatsch y Low han realizado trabajos de predicción de la respuesta al tratamiento con ERL en líneas celulares de GBM, basándose en técnica de *microarrays* de expresión. Estos trabajos muestran que líneas celulares de gliomas con distinto tipo de respuesta a ERL, tienen fenotipos distintos a nivel molecular. El análisis en concreto de genes pertenecientes a la ruta del EGFR o relacionados con proliferación o apoptosis, destaca algunos que parecen estar asociados a resistencia a ERL (*FKBP14*, *RAC1*, *MYC*, *PTGER4*, *IGF1*, *PIK3C2B*, *FGFR4*, *HSPA1B*, *HSPB1*, *NFATC1*, *NTRK1*, *RAC1*, *SMO*, *TGFB3*, *CACNG4*, *TCF7L1*), mientras que muestra otros asociados a sensibilidad a erlotinib (*STAT1*, *MYC*, *PTGER4*) (Halatsch *et al.*, 2008; Halatsch *et al.*, 2009; Löw *et al.*, 2008). En estos trabajos se propone una serie de genes candidatos a ser dianas moleculares para favorecer la respuesta al ERL. La mayoría de los genes que se correlacionaban con un fenotipo de células resistentes pertenecían a las rutas *MAPK*, *JNK* y *WNT*. Sin embargo, en este estudio no se encontró correlación con genes previamente asociados a respuesta a TKIs y patogenicidad en GBM, como *EGFR*, *PTEN* y *AKT* (Halatsch *et al.*, 2009).

De todo esto se deduce la gran importancia que tiene esclarecer los mecanismos de respuesta a TKIs y la caracterización molecular de aquellos tumores que más se benefician de estas terapias. Así, se podrán establecer unas pautas de aplicación específica de tratamientos con TKI a casos concretos, de forma que se aseguren unas mayores tasas de respuesta y se evite una exposición innecesaria a pacientes que no sean susceptibles de beneficiarse de esta terapia.

Objetivos

El objetivo de este trabajo se centra en la identificación de marcadores moleculares y de expresión génica característicos de la respuesta al tratamiento con inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT. Para alcanzar el objetivo principal y general del mismo se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterización molecular de 11 líneas celulares de glioma. Valoración de su uso como modelos celulares de gliomas.
2. Estudio de la respuesta (sensibilidad/ resistencia) de las líneas celulares de glioma frente a cuatro inhibidores de la ruta EGFR, mediante ensayos de viabilidad celular.
3. Estudio del efecto de ERL y GEF sobre las líneas celulares, en cuanto a inhibición de señalización, apoptosis y ciclo celular.
4. Análisis de los cambios en la expresión génica producidos por el tratamiento con ERL en líneas celulares de gliomas, mediante *microarrays*.
5. Identificación de genes y proteínas más relevantes en la respuesta al tratamiento con GEF y ERL
6. Identificación de dianas o marcadores moleculares de predicción de respuesta a ERL mediante análisis de expresión.

Material y Métodos

1. CULTIVOS CELULARES E INHIBIDORES

Las 11 líneas celulares derivadas de gliomas humanos utilizadas fueron cedidas por el Dr. G. Velasco (Universidad Complutense de Madrid) y por el Dr. F. Setién (Instituto Catalán de Oncología, Barcelona). Las líneas procedían de astrocitomas anaplásicos: U87MG (U87), SW1783, U118 MG (U118), SW1088, LN18, U373MG (U373) y SF767WL (SF767); de GBM: T98G (T98), A172, LN18; de un neuroglioma: H4 y de un oligoastrocitoma anaplásico: GOS3. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar (estufa con 5% de CO₂ y 37°C). El medio de cultivo utilizado fue RPMI1640 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0,1% de fungizona (Invitrogen) y 1 % de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich).

Los cultivos primarios de gliomas fueron obtenidos de biopsias de pacientes del Hospital Virgen de la Salud de Toledo tras su consentimiento informado. Las biopsias fueron disgregadas mecánicamente y sembradas en frascos de 25 cm², con medio de cultivo y un 20% FBS. Cuando fue posible, se realizaron los cariotipos de los cultivos primarios en el servicio de Genética del mismo hospital, tras dos o tres subcultivos, para asegurar su condición tumoral.

Para asegurar la activación de la ruta EGFR/PI3K/AKT en los cultivos se utilizó el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF; Sigma-Aldrich). Se diluyó a una concentración *stock* de 10 µg/ml, en una disolución de ácido acético 10mM y 0.1% de albúmina bovina sérica (BSA; Sigma-Aldrich).

Las concentraciones y tiempos de aplicación del EGF en las distintas técnicas fueron los siguientes:

- Para *western-blot* e *in-cell western*: 50 ng/ml durante 15 minutos previos a la extracción de proteínas.
- Para apoptosis y ciclo celular: 100 ng/ml durante todo el tratamiento con los inhibidores (48 y 24 horas respectivamente).
- Para los análisis de expresión: 50 ng/ml durante todo el tratamiento con los inhibidores (24 horas).

Los inhibidores erlotinib (ERL) y temsirolimus (TEMS) fueron cedidos por Genentech, Inc y Wyeth, respectivamente, y diluidos en DMSO (ERL) y etanol (TEMS), a una solución *stock* de 20mM. Los inhibidores gefitinib y LY294002 (Biaffin GmbH & Co) fueron diluidos en DMSO a una concentración *stock* de 30 y 20 mM, respectivamente.

2. VIABILIDAD CELULAR

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción de *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT; Sigma-Aldrich). Esta técnica se basa en que únicamente las células vivas son capaces de romper el anillo tetrazolio mediante enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias, generando unos cristales de formazán insolubles de color azul (Figura 7). La medición de la cantidad de cristales formados permite conocer la cantidad de células vivas, y por tanto del porcentaje de viabilidad celular.

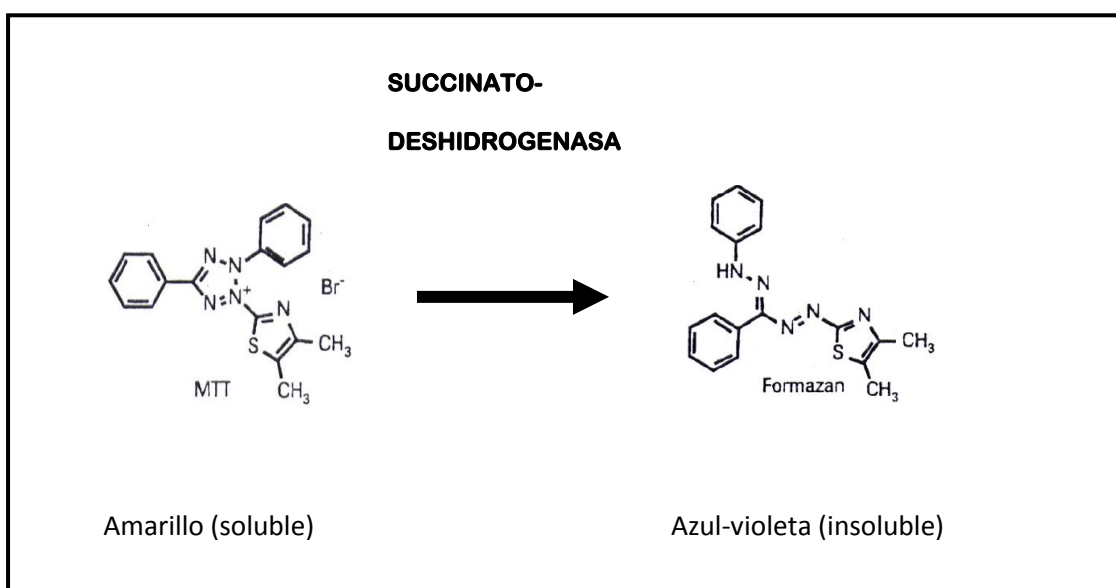


Figura 7. Formación de los cristales de formazán a partir del MTT, tras la actividad enzimática de la succinato-deshidrogenasa presente en células viables

El protocolo seguido fue el siguiente. Se sembraron 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos con medio con suero (10%), permitiendo su adhesión durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 μ l de medio sin suero por pocillo, que contenía las cantidades deseadas de cada inhibidor y una cantidad constante del disolvente orgánico utilizado (DMSO o etanol) para eliminar las alteraciones en la viabilidad debida a toxicidades por el disolvente. En ningún caso se superaron concentraciones de disolvente de 0,2% v/v. El tratamiento se mantuvo durante 72 horas en estufa. Pasado este tiempo, se añadieron 10 μ l de la solución de MTT (5 mg/ml) a los 100 μ l de cada pocillo, y se incubó en estufa a 37°C durante cuatro horas. A continuación, los cristales de formazán generados por las células vivas de cada pocillo se disolvieron con una disolución de isopropanol-HCl (0,1N). Midiendo la absorbancia de la solución violeta generada en un lector de placas de ELISA (Grifols) a 550 nm, se pudieron determinar los porcentajes de viabilidad para cada condición, considerando la absorbancia del pocillo sin inhibidor (inhibidor 0, sólo solvente orgánico) la viabilidad 100%.

Para el cálculo de la IC₅₀, que es la concentración de inhibidor que reduce la viabilidad celular al 50%, se utilizó el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software mediante un análisis de dosis-respuesta, ajustando los datos obtenidos por los ensayos de viabilidad celular con MTT a una curva sigmoidea.

Las dosis de inhibidores utilizadas fueron las siguientes:

- erlotinib: 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μ M
- gefitinib: 0, 25, 50, 100, 150 y 200 μ M
- LY294002: 0, 10, 25, 75, 150 y 200 μ M
- temsirolimus: 0, 0.01, 0.1, 1, 50 y 100 μ M

3. EXTRACCIÓN DE DNA Y RNA

Se extrajo el DNA total de los cultivos celulares usando técnicas estándares de extracción de ácidos nucleicos con fenol-cloroformo. El RNA total de las distintas muestra se extrajo con el reactivo TRIzol® (Invitrogen)

según las indicaciones del fabricante. La medida de la concentración y pureza del DNA y el RNA extraídos se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop-100 (NanoDrop Technologies). El RNA extraído se separó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para comprobar su integridad.

4. PCR Y SECUENCIACIÓN

A partir del DNA genómico extraído de las líneas celulares se amplificaron los exones 1 al 9 del gen *PTEN* y 18 al 21 del gen *EGFR*. Posteriormente, estos productos de amplificación se secuenciaron en un secuenciador ABI PRISM 310 DNA Analyzer (Life technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Los cebadores y las condiciones de PCR utilizadas para la **amplificación de EGFR** fueron las descritas por Hsieh *et al.*, 2006.

Exón	Cebador (Directo) 5'-3'	Cebador (reverso) 5'-3'	T (°C)
18	GCTCTGTAGAGAAGGCGT	CACAGGACCACTGATTAC	56
19	GATTCGTGGAGCCCAACA	CCAGTGCTGTCTCTAAGG	56
20	TTCACAGCCCTGCGTAAA	CAGGCACTGATTTGTGCA	56
21	CAGCAGCGGGTTACATCT	TCCTCATTCACTGTCCCA	56

Tabla 4. Cebadores y temperatura de anillamiento para *EGFR* (40 ciclos)

Las condiciones y cebadores para la **amplificación de *PTEN*** se recogen en la siguiente tabla.

Exón	Cebador (Directo) 5'-3'	Cebador (reverso) 5'-3'	T (°C)
1	TCCTCCTTTTTCTTCAGCCAC	GAAAGGTAAAGAGGAGCAGCC	56
2	GCTGCATATTTCAATCAAATAA	ACATCAATATTTGAAATAGAAAATC	54
3	TGTTAATGGTGGCTTTTTG	GCAAGCATACAAATAAGAAAAC	56
4	TTCCTAAGTGCAAAAGATAAC	TACAGTCTATCGGGTTTAAGT	56
5	TTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTAT	GAAGAGGAAAGGAAAAACATC	51
6	AGTGAAATAACTATAATGGAACA	GAAGGATGAGAATTTCAAGC	54
7	AATACTGGTATGTATTTAACCAT	TCTCCCAATGAAAGTAAAGTA	56
8	TTTTTAGGACAAAATGTTTCAC	CCCACAAAATGTTTAATTTAAC	54
9	GTTTTCATTTTAAATTTTCTTTC	TGGTGTTTTATCCCTCTTG	54

Tabla 5. Cebadores y temperatura de anillamiento para los 9 exones de *PTEN*

Posteriormente, los productos de amplificación fueron purificados con el *Minielute PCR Purification kit* (QUIAGEN) y visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Para la **secuenciación** de los productos de amplificación, se utilizaron los mismos cebadores que para la PCR (una reacción con el primer reverso y otra con el directo). En este paso, la cantidad de DNA inicial es limitante, y se incluirá mayor o menor cantidad de este DNA según el tamaño del fragmento a secuenciar (protocolo Applied Biosystem). Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life technologies), según las indicaciones del fabricante. Una vez realizada la reacción de secuenciación, se debe **precipitar** el producto obtenido con etanol e isopropanol, para eliminar restos de reactivos que interferirán en la lectura.

Por último, el producto a secuenciar se **disolvió en formamida** antes de inyectarlo en el secuenciador. Las secuencias se analizaron con el programa informático Sequencing Analysis 5.1.1 (Life technologies).

5. RT-PCR PARA DETECCIÓN DE *EGFRvIII*

La técnica de transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR) permite amplificar una cantidad pequeña de RNA diana con gran especificidad mediante transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado mediante PCR.

La transcripción reversa se realizó a partir de 1 µg de RNA para la obtención del cDNA utilizando el kit *Superscript System* (Gibco), según el siguiente protocolo:

- *Desnaturalización del RNA*. Se somete a 65°C durante 5 minutos una mezcla de reacción que contiene el RNA extraído (1 µg), dNTPs (1 µL de stock de 100 pmoles/µL), agua estéril (hasta un volumen final de 12 µL) y *random primers* (2 µL de un stock 10 mM) (oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla que se unen a secuencias al azar y sirven como cebadores para la elongación del cDNA).

- *Retrotranscripción y síntesis de cDNA*. A la mezcla anterior se añaden el buffer “*First Strand*” (4 μ L de *stock* 5x), específico para RT-PCR, ditioneitol (DTT; 2 μ L de 0.1 M), inhibidor de ribonucleasas (RNAsin; 1 μ L de 40 U/ μ L) y la polimerasa reversa *Super-Script II* (1 μ L; 200 u). El proceso de síntesis del cDNA se realiza a 42°C durante 50 minutos y al final se sube la temperatura para inactivar la retrotranscriptasa (10 min a 25°C; 50 min a 42°C; 3 min a 99°C).

Posteriormente el cDNA fue amplificado en las siguientes condiciones: *activación* de la polimerasa (5 min 95°C); seguida de 35 ciclos que constan de una *desnaturalización* (94°C 5s), *anillamiento* (60°C 10s), *extensión* (72°C 30s) y finalmente una *elongación* (10 min a 72°C).

Los primers utilizados para la amplificación de *EGFR* y se muestran en la Figura 8.

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

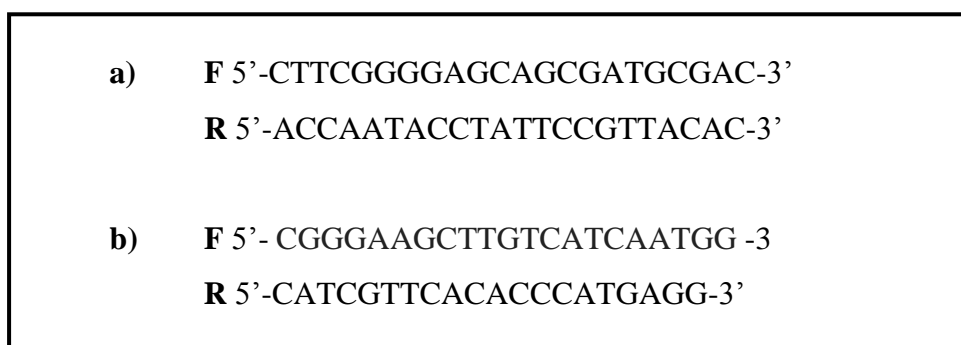


Figura 8. Primers para la detección de *EGFR* ó *EGFRVIII* (a) y para la del control interno *GAPDH* (b) (Lee *et al.*, 2006)

6. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (CGH)

La técnica de Hibridación Genómica Comparada basada en *microarrays* (CGH) es un método citogenético molecular que permite detectar anomalías cromosómicas analizando una gran cantidad de fragmentos génicos de una sola vez a partir de DNA genómico de las muestras problema. La técnica se basa en una hibridación competitiva donde el DNA problema se marca con una molécula fluorescente (Cy5) y el DNA de referencia con otra (Cy3). Ambos

DNAs marcados se hibridan con los distintos oligonucleótidos fijados en una superficie sólida, el *microarray*. El escaneado y análisis de las señales fluorescentes de los DNAs marcados que se hayan fijado, permitirá cuantificar la cantidad de cada oligonucleótido y por tanto la dosis génica que tiene la muestra problema en comparación con la de referencia (Figura 9).

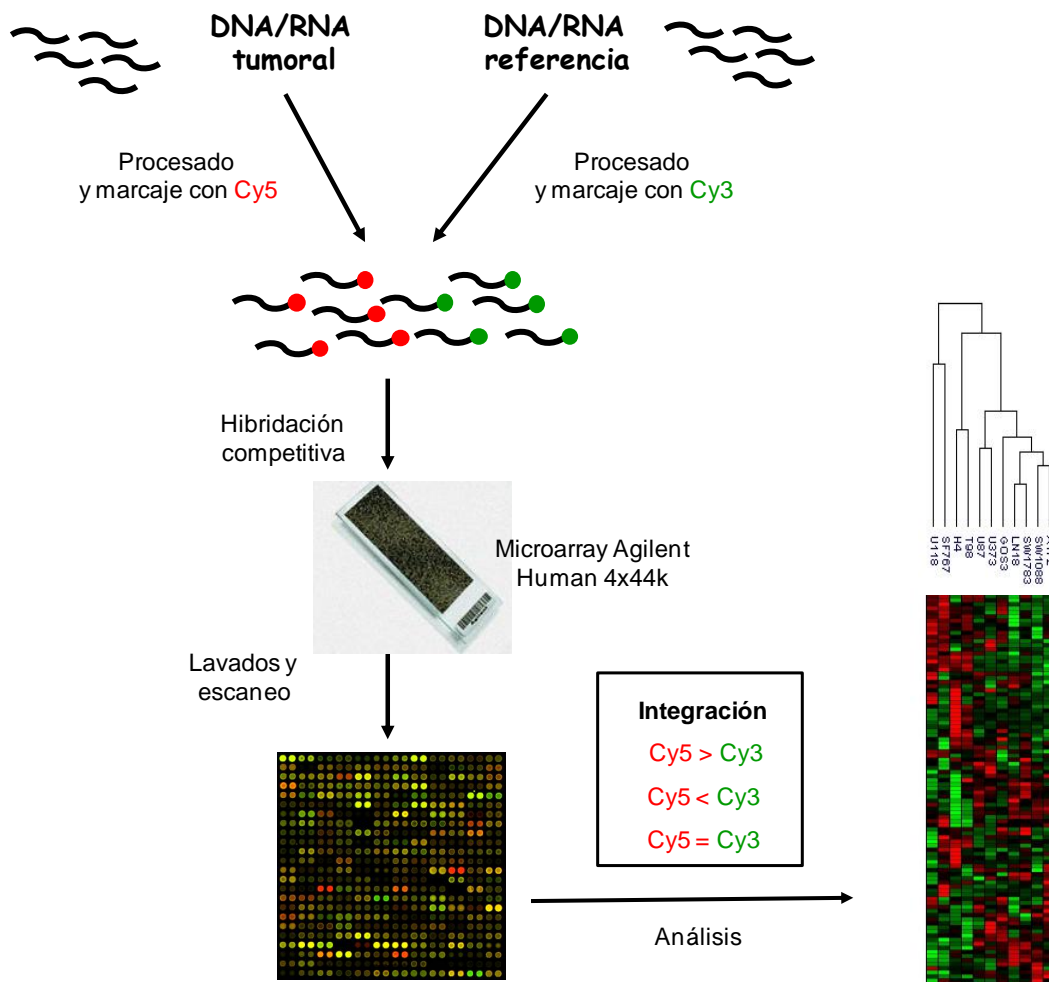


Figura 9. Esquema representativo de la técnica de hibridación con *microarrays*. En el caso del análisis de CGH la muestra de partida es DNA genómico y en el caso de los análisis de expresión, se parte de mRNA (adaptado de Barrero, 2005).

Se utilizó la técnica de CGH sobre *microarrays* para analizar el DNA genómico de cada una de las 11 líneas celulares y determinar las alteraciones en el número de copias en más de 40.000 genes. Esta técnica se desarrolló en el Servicio de Análisis de *Microarrays* del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

El **protocolo** para la obtención de DNA marcado fue el indicado por la casa comercial de los *arrays* “*Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis*” Version 4.0 (Agilent Technologies). El marcaje del DNA se realizó mediante el kit “*Agilent Genomic DNA labeling kit plus*” (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA marcado se hibridó en *microarrays* de 44 K (*Human Genome CGH Microarray 44 K*; Agilent). Los *microarrays* se escanearon en un escáner de *microarrays* de Agilent (Agilent G2565BA) y el análisis de datos se realizó utilizando el módulo *DNA Analytics 4.0 CGH Module* (Agilent Technologies).

Las **alteraciones genómicas** se detectaron usando un algoritmo ADM-2 con dos filtros distintos: uno menos estricto, que detectaba aquellas alteraciones que afectaban a 3 sondas consecutivas con un ratio superior o inferior a 0.25, el cual se usó para detectar alteraciones de bajo nivel; y el otro más estricto, que detecta 3 sondas consecutivas con un ratio superior o inferior a 1, que se usó para identificar amplificaciones de alto nivel y deleciones homocigotas.

7. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION

El **MLPA** (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) está basado en una reacción de amplificación múltiple por PCR, es decir, amplifica varias secuencias de genes en una misma reacción. Se trata de un método semicuantitativo que puede detectar números de copias anormales (amplificaciones o deleciones de un gen) de hasta 50 secuencias distintas.

La reacción de MLPA se basa en la utilización de dos sondas por cada fragmento a amplificar que hibridan en secuencias contiguas del DNA diana. Cada sonda del MLPA contiene una parte en común que servirá para realizar la PCR utilizando el mismo cebador para todas las sondas, otra parte complementaria a la secuencia del DNA a amplificar y un fragmento con distinto número de pares de bases, que permitirá distinguir cada producto de amplificación según la longitud, sabiendo a qué sonda y por tanto a qué fragmento de gen corresponde (Figura 10).



Figura 10. Estructura de las sondas de MLPA

La secuencia de la reacción del MLPA es la siguiente (Figura 11):

1. *Desnaturalización del DNA e hibridación de las sondas:* se desnaturaliza el DNA a 95°C y se incuba junto con las sondas diluidas en su correspondiente buffer a 60°C durante al menos 16 horas.
2. *Ligación:* Se añade la enzima ligasa que une las dos sondas de cada secuencia diana sólo si han hibridado por completo con el DNA problema.
3. *Amplificación por PCR:* La mezcla de PCR, añadida al producto de ligación, incluye un par de cebadores universales que hibridan con la zona común de cada sonda. Si se ha producido la ligación, se amplificará correctamente cada fragmento, generando productos que podrán ser separados e identificados por sus distintos tamaños (130-480 pb).
4. *Separación y análisis de los fragmentos:* Los fragmentos amplificados se separan mediante electroforesis capilar en un secuenciador. Se obtiene un electroferograma con distintos picos, correspondiente a cada fragmento génico identificado en el kit. Los picos obtenidos se comparan con una muestra de referencia, con una dosis génica normal (2n) y preferiblemente del mismo tejido que el tumor. Cuando hay mutación o delección de un determinado gen, desaparecerá el pico correspondiente en el gráfico. Si la delección es hemicigota, se reducirá el área del pico correspondiente, que aparecerá disminuida. En caso de duplicación de un gen, el pico correspondiente será mayor.

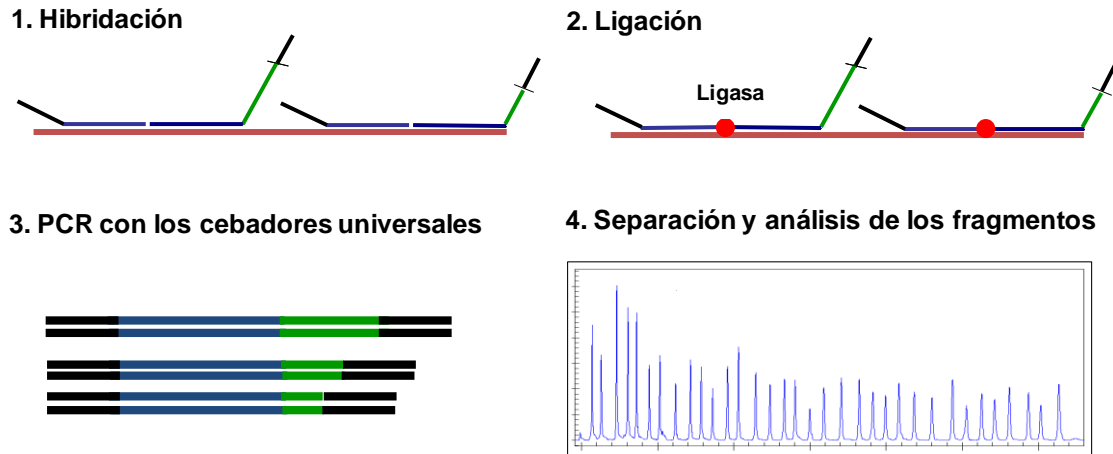


Figura 11. Esquema de la secuencia de reacción de análisis que se realiza en la técnica de MLPA.

El análisis del número de copias mediante MLPA se realizó para confirmar los resultados obtenidos de CGH en las líneas celulares o para comprobar que los cultivos de los tumores primarios mantenían el mismo perfil genético que aquel del tumor del que procedía. Se utilizaron los siguientes kits (MRC-Holland, www.mlpa.com):

- **SALSA MLPA kit P105 Glioma-2**, para el análisis de los genes *EGFR*, *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A* y *ERBB2*, frecuentemente alterados en gliomas.
- **SALSA MLPA kit P173 Gain-3**, para el análisis de diversos genes que se encuentran amplificados frecuentemente en tumores, como *BCL2L11* (*BIM*), *BIRC5*, *BRAF*, *ERBB4*, *JAK2*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3C2B*, *PIK3CA*.

En el caso de los cultivos primarios derivados de tumores, se compararon los perfiles de MLPA obtenidos con el kit p105 Glioma 2, generados a partir del DNA del cultivo y del DNA del tumor de origen para comprobar que se mantenían las características originales del tumor tras la generación del cultivo.

El análisis se llevó a cabo a partir de los DNAs genómicos de líneas y tumores siguiendo las instrucciones del fabricante (MRC-Holland) y los productos de reacción fueron separados y analizados en un secuenciador ABI PRISM 310 DNA Analyzer (Life technologies). En cada análisis se

incluyeron 3 muestras de DNA no tumorales como referencia. Los electroferogramas fueron analizados con el programa informático GeneMapper v.3.7 (Life technologies). El análisis de los datos se realizó con el programa informático Coffalyser (MRC-Holland).

8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN CON *MICROARRAYS*

8.1 MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis de expresión génica se utilizaron las siguientes muestras:

- **Cultivos celulares:** se crecieron 3 *flask* de 25 cm² de cada línea celular y de cada tumor primario, aplicando los siguientes tratamientos durante 24 horas (*flask* 1, sólo con los disolventes; *flask* 2, 10 µM ERL; *flask* 3: 10 µM ERL, 0.01 µM TEMS).
- Tres muestras de **RNA de cerebro normal**, usados como control (Stratagene, Clontech y RNA de una autopsia).
- **RNA referencia**, mezcla de RNA de varias líneas celulares (Stratagene).

8.2 *MICROARRAYS* DE EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Los análisis de expresión se realizaron usando *microarrays* de oligonucleótidos del genoma humano completo (*Human 44 K whole-genome oligonucleotide microarrays*; Agilent Technologies). El marcado, la hibridación y los lavados se realizaron conforme a las indicaciones del fabricante. Los *microarrays* se escanearon en un escáner *Axon GenePix 4100* (Axon Instruments Inc) y las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa informático *GenePix Pro 6.0* (Axon Instruments Inc.). Los ratios de fluorescencia Cy5/Cy3, siendo el Cy5 correspondiente al RNA problema y el Cy3 al RNA de referencia, se normalizaron y filtraron mediante el “*print-tip loess method and background subtraction*” con la herramienta de análisis de arrays “*Diagnosis and Normalization Array Data (DNMAD)*” (Vaquerizas *et al.*, 2004).

Los datos resultantes fueron analizados mediante el paquete informático “*Gene Expression Pattern Analysis Suite*” (GEPAS, version 3.1), utilizando el algoritmo UPGMA, que asume distancias euclídeas, para realizar un clúster jerarquizado no supervisado de todas las muestras (líneas celulares, tumores y cerebro normal). Para poder comparar muestras tan diferentes entre sí, se normalizaron los datos con respecto a la mediana de expresión de todas las muestras. Por otra parte, se realizaron *t-test* para identificar los genes más diferencialmente expresados. Aquellos genes que presentaban un FDR (*false discovery rate*) menor a 0.15 se seleccionaron para continuar con los análisis (Benjamini *et al.*, 2001). Para definir el cambio de expresión entre líneas resistentes y sensibles tras el tratamiento con ERL, se normalizó cada *array* tratado frente a su correspondiente no tratado, según trabajos previos en cáncer de mama (Korde *et al.*, 2010).

Los análisis funcionales y de sobre-expresión se llevaron a cabo mediante la herramienta informática “*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resource* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)” para generar clúster de términos de *Gene Ontology* (GO) (Dennis *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009).

Se utilizó el programa “**Get Set Enrichment Analysis (GSEA)**, v2.0 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index>)” para analizar los genes diferencialmente expresados entre líneas resistentes y sensibles y entre líneas con tratamiento o sin él. Este análisis evalúa los datos de los *microarrays* a nivel de lista de genes o “*gene sets*” (genes que se agrupan por función biológica o por pertenecer a una misma ruta de señalización intracelular). A partir de una lista de genes seleccionada para nuestro análisis y unos datos de expresión perteneciente a dos grupos o clases de muestras, el GSEA busca una correlación entre la expresión para esos genes en los dos grupos de muestras. El programa genera una lista, en la que cada gen tiene un dato asociado de probabilidad (ES, *enrichment score*) donde valora si un determinado gen está enriquecido en un grupo con respecto a otro. Cuanto más arriba o más debajo de la lista está un gen, mayor será la diferencia de expresión entre ambos grupos y menos probable es que esta diferencia sea

debida al azar, y no a la diferencia de fenotipo entre ambos grupos (Subramanian *et al.*, 2005).

La tabla con las listas de genes utilizadas para el análisis con GSEA se obtuvo de la Base de Datos de Firmas Moleculares (Molecular Signatures Database; MsigDB; <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>).

9. RT-PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

Se seleccionaron cuatro genes, *CTGF*, *HDAC3*, *HRAS* y *ERCC5*, para validar los datos obtenidos con el análisis de *microarrays*, estudiando sus niveles de expresión mediante el sistema de PCR a tiempo real ABI PRISM 7500 (Life Technologies). Los cebadores, las sondas y el control interno (*GAPDH*) se compraron en Applied Biosystems (ahora Life Technologies). A partir de 1 µg de RNA total se obtuvo el cDNA correspondiente usando el kit “*Superscript II reverse transcriptase*” (Invitrogen), según condiciones indicadas en el apartado 4.

Para cada gen se preparó una mezcla de reacción con la sonda Taqman® (Life technologies) correspondiente, según las especificaciones del fabricante. Todas las muestras se prepararon por triplicado y los niveles de expresión de cada gen se normalizaron con el control endógeno. Las sondas TAQMAN utilizadas fueron las siguientes: *CTGF* (Hs01026927_g1), *HRAS* (Hs00610483_m1), *ERCC5* (Hs00164482_m1), *HDAC3* (Hs00187320_m1), *GAPDH* (control; Hs02758991_g1).

Como referencia biológica de los experimentos, se utilizaron triplicados del RNA de referencia usado en los *microarrays*. Los resultados se normalizaron y se analizaron por el método de comparación de $Ct^{-\Delta\Delta Ct}$, con el sistema *Sequence-Detector 7500* (version 1.2.3f2; Life technologies).

10. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis del ciclo celular y la apoptosis, cada línea fue tratada durante 48 horas con 10 µM ERL, 10 µM ERL + 0.01 µM TEMS, o sólo con los disolventes orgánicos, DMSO y etanol en la misma proporción, en un medio de cultivo sin suero con 100 ng/ml de EGF. El análisis de la apoptosis en el

tratamiento con GEF se realizó tratando las células con 10 μM GEF o sólo con DMSO, de la misma manera y tiempo que para el caso del ERL.

Tras los tratamientos, los cultivos fueron levantados con tripsina, se marcaron con el kit correspondiente según se estudiara apoptosis o ciclo celular y fueron analizados mediante la técnica de citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (BD BioSciences). El análisis de los datos se realizó con el programa *Cell-Quest and Modifit* (BD Biosciences).

10.1 CICLO CELULAR

Para el estudio del ciclo celular se utilizó el marcaje con yoduro de propidio (PI) con el kit PI/RNase (Immunostep) siguiendo las indicaciones del fabricante. El PI es la tinción más común para el análisis del ciclo celular. El PI se intercala en la doble hebra del DNA. También se une al RNA, de ahí que se usen nucleasas para eliminar posibles interferencias y mejorar la resolución del DNA. La cantidad de PI unido es proporcional a la cantidad de DNA en las distintas poblaciones celulares. Las células de mamífero cuentan con tres tipos de poblaciones o regiones definidas según el ciclo celular: *fase G2/M*, doble contenido de DNA porque las células están preparada para la mitosis; *fase G0/G1*, contenido de DNA normal, y *fase S*, que es la proceso del paso de una fase a otra, durante el cual se produce la duplicación del DNA (Figura 12).

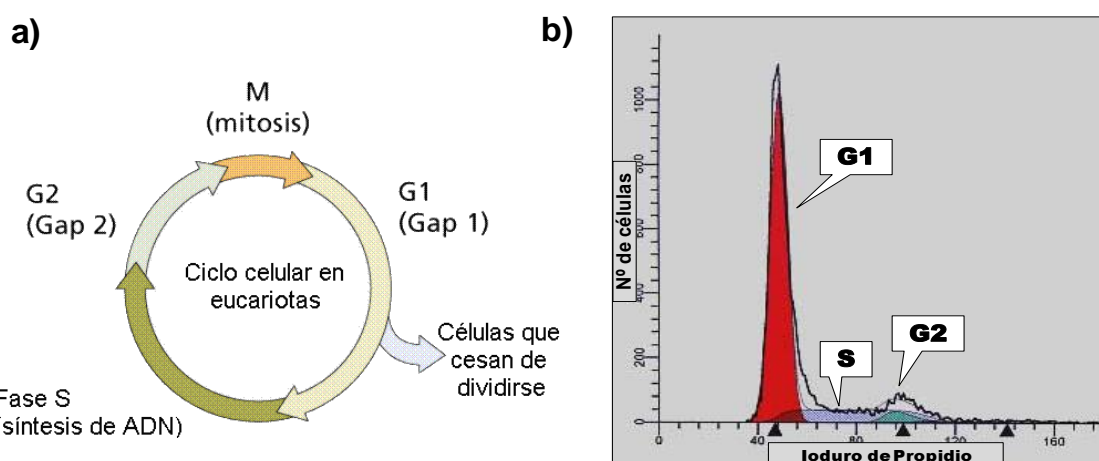


Figura 12. Esquema de las fases del ciclo celular (a) y su análisis por citometría de flujo (b)

10.2 APOPTOSIS

Para el análisis de la apoptosis el marcaje se realizó con PI y AnexinaV-FITC (Immunostep), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este análisis se basa en la exposición del fosfolípido, fosfatidilserina (PS), de presencia mayoritaria hacia el citosol celular, en la superficie externa de las membranas de aquellas células que están en proceso de apoptosis. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} con gran afinidad por la PS. Así las células se marcan con PI (rojo), para detectar el contenido en DNA, y con anexina V, marcada con FITC (verde) para ver la cantidad de células en apoptosis. Cuanto mayor cantidad de señal verde haya, indicará que hay más células con PS expuesta, es decir, más células en apoptosis en relación al total de células marcadas con PI (Figura 13)

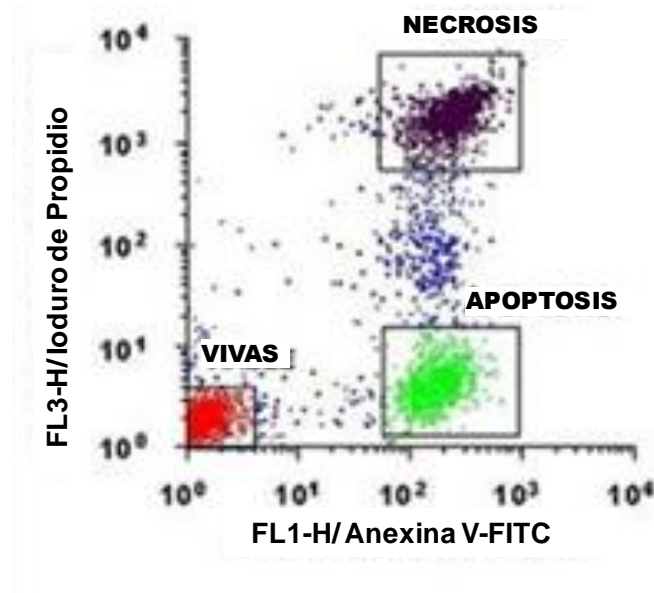


Figura 13. Esquema del análisis de la apoptosis por citometría de flujo

11. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Se han utilizado tres técnicas para analizar la expresión proteica de algunos marcadores moleculares en las líneas celulares: la inmunohistoquímica (IHC), el *western-blot* (WB) y el *In-cell western* (ICW).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- En IHC: anti-EGFR y anti-p53 (Novocastra Laboratories); anti-PTEN y anti-PGFA (DAKO). Este último anticuerpo se utiliza como marcador de células gliales.
- En WB: anti-phospho-AKT (Ser473) (587F11), anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (E10), anti-BIM y anti α -tubulin (Cell Signaling Technology); anti-PTEN (clone 6H2.1; DAKO).
- En ICW, además de los mismos que para WB: anti-Bad (Cell Signaling Technology) y anti-BIRC5 (R&D Systems Inc).

Los anticuerpos secundarios utilizados para WB e ICW fueron IRDye®800CW-labeled goat anti-mouse y anti-rabbit (LI-COR Biosciences), que emiten en verde. Para la normalización en cada pocillo en ICW, se utilizó un colorante vital, DRAQ5™ (BioStatus Limited) que tiñe el DNA en células fijadas y vivas.

11.1 INMUNOHISTOQUIMICA

Las técnicas de IHC permiten detectar antígenos directamente sobre células o tejidos, mediante el uso de anticuerpos específicos marcados.

El análisis inmunofenotípico de las líneas celulares se realizó a través de la inmunotinción de los citospin. Estos citospin se obtuvieron a partir de suspensiones en PBS de los cultivos celulares previamente crecidos en *flask* de 25 cm² por citocentrifugación directa sobre portaobjetos. El método de detección está basado en biotina-streptavidina marcado con peroxidasa en el sistema automático TechMate 500 (DAKO).

11.2 WESTERN-BLOT

Tras los tratamientos correspondientes, los cultivos celulares se recolectaron con tripsina, manteniéndolos siempre en frío hasta la lisis celular para evitar la defosforilación de proteínas.

Para la extracción de proteínas se utilizó un tampón de lisis celular (50 mM Tris HCl pH=7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoetanol, 1% Tritón X-100, 10 mM Sodium β -glycerolfosfato), al que se ha añadido el inhibidor de proteasas *Compleat Mini* (Roche Diagnostics) y los inhibidores de fosfatasas: 0.5 mM ortovanadato sódico, 50 mM fluoruro sódico y 50 nM de ácido ocadaico. Las proteínas extraídas fueron cuantificadas con el *kit* de análisis de proteínas de Bradford (Bio-Rad).

La separación de una fracción de muestra con 50 μ g de proteínas, se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; 10% de acrilamida (40% acrilamida – bisacrilamida; 29:1; AMRESCO®). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Immobilon-p PVDF membranes) por electrotransferencia húmeda.

EL revelado y la captura de imágenes se realizó en un sistema de detección de infrarrojo *Odyssey® Infrared Imaging system* (LI-COR Biosciences), por lo que se debió realizar el bloqueo de la membrana con su buffer específico, *Odyssey® Blocking Buffer*.

La incubación de la membrana con el anticuerpo primario correspondiente se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación y a las concentraciones indicadas por el fabricante. Tras los lavados de la membrana, la detección se realizó mediante la adición de anticuerpos secundarios marcados con moléculas que emiten en el infrarrojo.

11.3 IN-CELL WESTERN

El *In-Cell Western™* (ICW) es un ensayo inmunohistoquímico que se realiza directamente sobre cultivos vivos y fijados en microplaca. Esta detección directa de la proteína elimina posibles problemas con la extracción,

como pérdidas o artefactos procedentes de la lisis celular y elimina variabilidad entre ensayos al detectar la proteína directamente en su contexto biológico. Para el marcaje se necesita un anticuerpo primario específico de la proteína (como los que se utilizan en WB o IHC siempre que no den lugar a bandas inespecíficas) y un anticuerpo secundario marcado con una molécula que emita señal en el infrarrojo, para poder detectar y cuantificar la señal (Chen *et al.*, 2005).

Para el análisis por ICW, se añadieron 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Tras la adhesión durante 24 horas en medio de cultivo con 10% FCS, se añadieron los siguientes tratamientos diluidos en 100 μ l de medio sin suero: a) sólo los disolventes DMSO y etanol en las mismas concentraciones finales que el resto de pocillos, b) 1 μ M ERL, c) 10 μ M ERL, d) 1 μ M ERL+0.01 μ M TEMS, e) 10 μ M ERL+0.01 μ M TEMS.

Tras 24 horas con el tratamiento, se siguió el protocolo para la detección por ICW (adaptado del libro *In Cell Western™ Protocol*) que consta de los siguientes pasos:

- *Fijado de las células* al pocillo.
- *Permeabilización de la membrana celular* para solubilizar la membrana plasmática y facilitar el paso de los anticuerpos al interior celular.
- *Bloqueo* con una solución rica en proteínas.
- *Incubación con el anticuerpo primario* frente a la proteína que se desee detectar en todos los pocillos excepto en algunos pocillos que servirán de control (que sólo se marcarán con el anticuerpo secundario y servirán como medida del *background* o absorción inespecífica).
- *Incubación con el anticuerpo secundario y la solución de normalización para su detección en el sistema de infrarrojo.*
- *Escaneo y análisis de la imagen.*

12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han expresado como medias \pm desviación estándar. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $P < 0,05$, indicándose también cuando se cumple que $P < 0,01$ o $P < 0,001$. Los datos han sido analizados con el programa SPSS para *Windows* v17.0.

Para el análisis de expresión génica mediante *microarrays* se consideró que los genes estaban diferencialmente expresados si tenían una $FDR < 0.15$ (Benjamini *et al.*, 2001). Como se mencionó también en el apartado 8.2, el estudio de rutas diferencialmente expresadas se realizó con el programa GSEA. Este programa genera una lista ordenada de genes, a partir del “gene set” estudiado asignado un índice de probabilidad, el *ES* (*enrichment score*) que combina a la vez los valores estadísticos de P y FDR .

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES DE GLIOMA

La caracterización molecular de las líneas celulares de glioma se ha realizado mediante el análisis de las alteraciones en el número de copias de los genes utilizando la técnica de Hibridación Genómica Comparada (CGH) basada en *microarrays*. El estudio se ha completado y validado en genes relevantes para la biología de los gliomas utilizando otras técnicas como el MLPA, *western-blot* o la secuenciación directa. Además, en los casos en los que ha sido posible, se han recogido los datos procedentes de las siguientes bases de datos:

- Proyecto Genoma del Cáncer (CGP) del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines/>), cuyo objetivo es lograr la máxima caracterización de las líneas celulares más utilizadas en estudios de biología del cáncer y de ensayos con fármacos anti-tumorales, y que recoge datos de CGH, secuenciación directa y pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*, LOH).
- COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>; Forbes *et al.*, 2011), que recoge datos de secuenciación directa o detección de puntos calientes en determinados genes (*hot spots*).

1.1. ALTERACIONES EN LA DOSIS GÉNICA

El análisis mediante CGH reveló que las líneas celulares de gliomas presentaban **más pérdidas que ganancias** de material genético. Mientras que el **22,15%** de las sondas analizadas (100.079 de 451.879 sondas) estaban **perdidas**, solo el **12,5%** (55.795 de 451.891) estaban **ganadas**.

Los cromosomas que más frecuentemente presentaban ganancias en estas líneas celulares fueron el 7, 16, 17, 19 y 20. De manera similar, los cromosomas que contenían mayor frecuencia de pérdidas fueron el 4, 6, 10, 13, 14 y el 18. (Figura 14 a y b).

Resultados

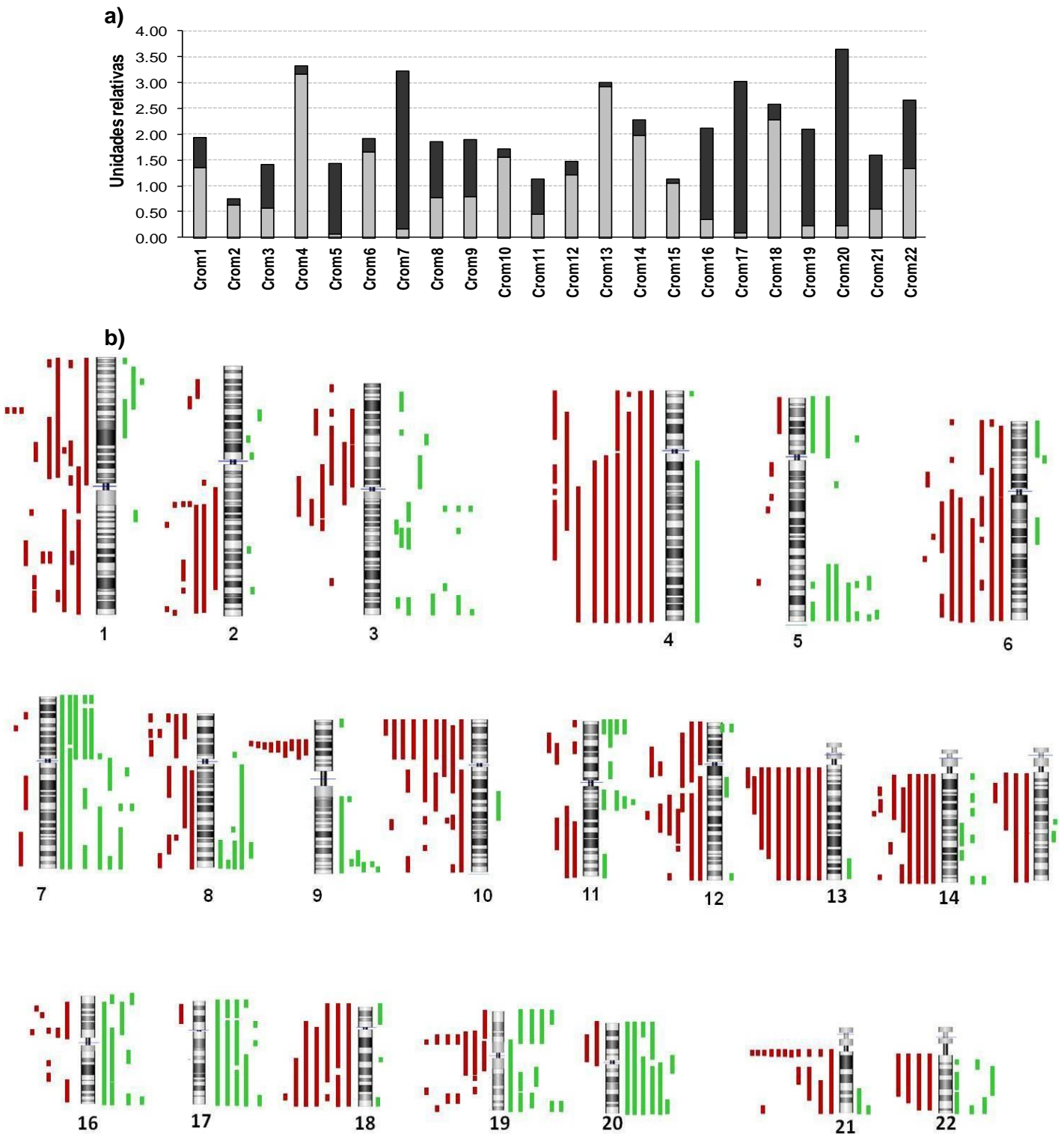


Figura 14. a) Porcentaje relativo de ganancias (negro) y pérdidas (gris) en relación al número de sondas ganadas o perdidas en cada cromosoma, en todas las líneas celulares y normalizado respecto al total de sondas analizadas. b) Representación de las regiones ganadas y perdidas en los cromosomas en todas las líneas celulares. Las líneas rojas a la izquierda del cromosoma representan pérdidas y las verdes a la derecha, ganancias.

Cabe destacar que, aunque **el cromosoma 9** contiene el locus *CDKN2A/CDKN2B* que está perdido en la mayoría de las líneas (9 de 11), dicho cromosoma presentaba un porcentaje similar de sondas ganadas y perdidas (**Figura 14**). Este resultado se puede explicar ya que la región de pérdida es relativamente pequeña en la mayoría de las líneas celulares y la ganancia de bajo nivel corresponde en su mayoría a la ganancia de la mayoría del cromosoma 9 en la línea celular SF767 (**Figura 15**).

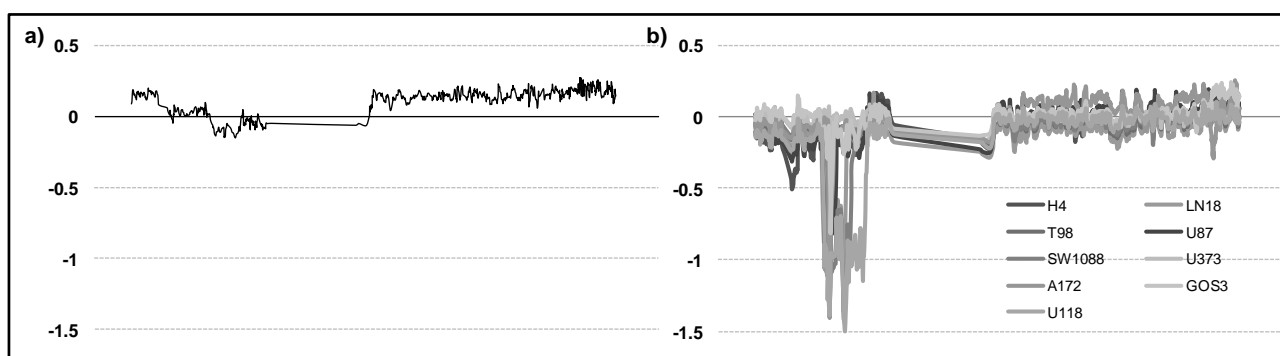


Figura 15. Representación de resultados de CGH para el cromosoma 9. Se observa la ganancia de bajo nivel del cromosoma 9 en la línea SF767 (**a**), mientras que en las 9 líneas este cromosoma presenta regiones de pérdida pequeñas de pérdida en el locus *CDKN2A/CDKN2B* (**b**). Las líneas representan la media de los cinco valores (\log_2) de genes consecutivos localizados en el cromosoma 9.

1.1.1. Deleciones

Para el análisis de las pérdidas por CGH se aplicó un filtro estricto para detectar sólo las deleciones en homocigosis, es decir, aquellas en las que ambas copias de un gen estuvieran perdidas. Se detectaron pérdidas de este tipo en **1p, 1q, 2q, 3p, 4q, 5q, 6q, 7p, 9p, 10p, 10q y 21p** (Tabla 6). En concreto, se encontraron pérdidas afectando a dos o más líneas celulares a la vez en **1p33, 9p21.3-21.1, 10q23.2-23.3 y 21p11.1** (**Figura 16**). Los principales genes localizados en estas regiones fueron ***CDKN2C*** ($p18^{\text{INK4c}}$) en el cromosoma 1, ***CDKN2A*** ($p16^{\text{INK4a}}$) y ***CDKN2B*** ($p15^{\text{INK4b}}$) en el cromosoma 9 y ***PTEN*** en el cromosoma 10. Las deleciones en homocigosis más frecuentes fueron las de ***CDKN2A*** y ***CDKN2B***, encontrada en 9 y 8 de las 11 líneas celulares de gliomas analizadas, respectivamente (**Figura 17**).

Resultados

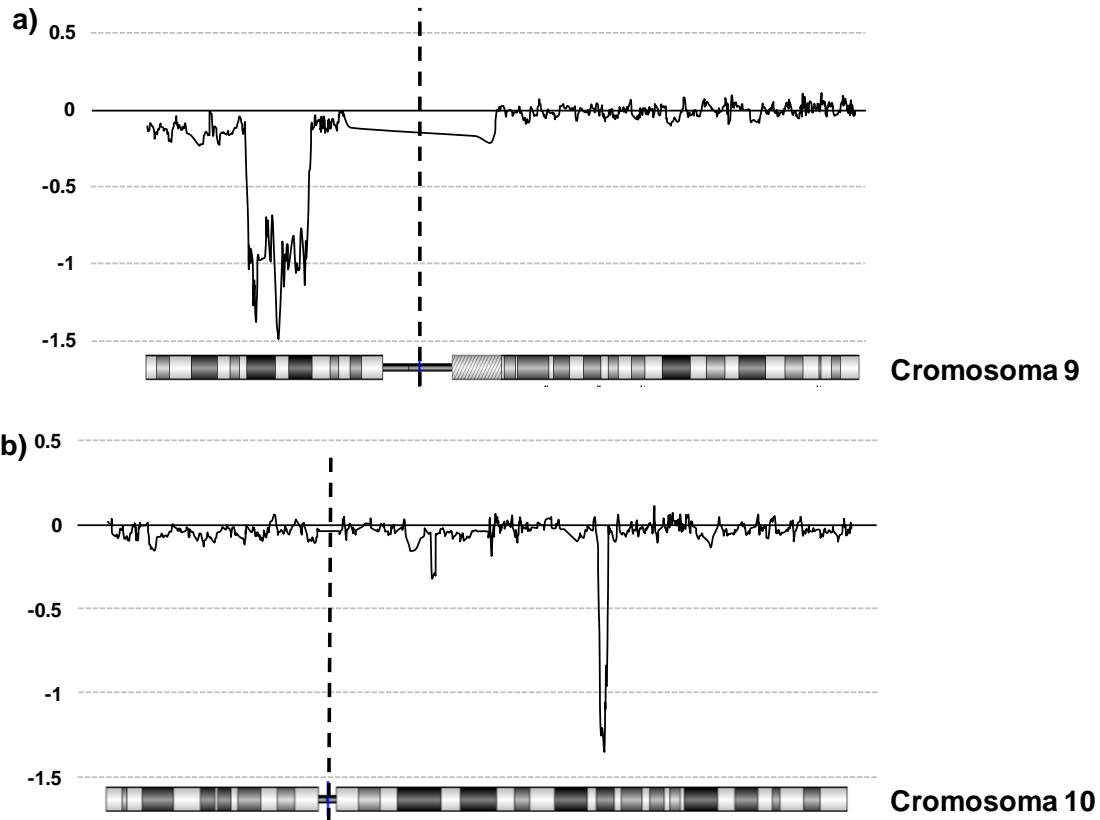


Figura 16. Representación de dos de las deleciones homocigotas más frecuentes detectadas por CGH en dos líneas representativas: a) la región 9p21.3-21.1 en la línea U118, b) la región 10q23.2-23.3 en la línea SW1088. Las líneas representan el promedio del valor (\log_2) de cinco genes consecutivos de los datos obtenidos en el *microarray*.

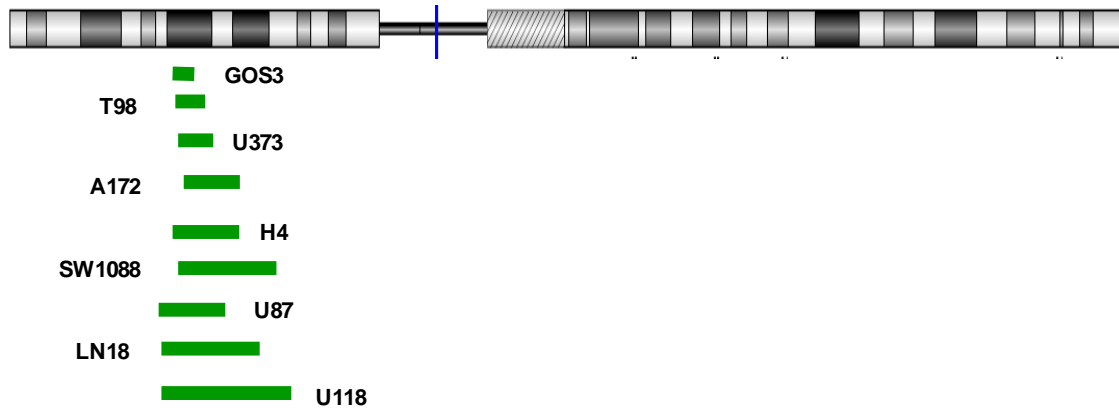


Figura 17. Representación esquemática de las regiones de pérdida en el cromosoma 9 observadas en las líneas celulares de gliomas

Resultados

CROMOSOMA	GENES	LÍNEA CELULAR
1p33	<i>FAF1, CDKN2C</i>	U87 (0.17), T98 (0.07), U373 (0.23)
1p31.1	<i>LRRC44, FPGT, TNNI3K, CRYZ, TYW3</i>	U118
1q42.2	<i>DISC1, SIPA1L2, PCNXL2</i>	GOS3 (1.33)
2q42.2	<i>BAZ2B</i>	GOS3 (0.12)
3p24.3	<i>TBC1D5, SATB1, KCNH8, EFHB, RAB5A, SGOL1, PCAF</i>	H4 (4.63)
3p24.1	<i>TGFB2</i>	SF767 (0.23)
3p12.2-p11.2	<i>IGSF4D, VGLL3, CHMP2B, POU1F1, HTR1F, CGGBP1</i>	LN18 (6.32)
4q34.1	<i>FBXO8, HPGD, GLRA3</i>	U118 (0.40)
5q14.1	<i>THBS4, SERINC5</i>	SF767 (0.13)
6q22.2	<i>ROS1, DCBLD1</i>	U118 (0.17)
7p21.2-p21.1	<i>ETV1, DGKB, MEOX2, SOSTDC1, ANKMY2, BZW2, TSPAN13, AGR2, BCMP11, AHR, SNX13, HDAC9</i>	SF767 (5.09)
9p22.1-p21.1	<i>SLC24A2</i>	LN18 (6.37)
9p21.3-p21.1	<i>MLLT3, IFNB1</i>	U118 (10.86), U87 (3.52), LN18
	<i>IFNW1</i>	U118, U87, LN18, H4 (1.22)
	<i>KLHL9, IFNA2, IFNA8</i>	U118, U87, LN18, H4, SW1088 (7.22)
	<i>IFNE1, MTAP</i>	U118, U87, LN18, H4, SW1088, A172 (0.71)
	<i>CDKN2A</i>	U118, U87, LN18, H4, SW1088, T98, U373 (0.18), A172, GOS3 (0.04)
	<i>CDKN2B</i>	U118, U87, LN18, H4, SW1088, U373, A172, GOS3
	<i>ELAVL2</i>	U118, LN18, SW1088
	<i>hel-N1</i>	U118, LN18
	<i>PLAA, IFT74, LNG01784, TEK, MOBKL2B, LRRN6C</i>	U118, SW1088
	<i>LINGO2</i>	U118
10p11.21	<i>PARD3</i>	T98 (0.11)
10q23.2 - q23.31	<i>MINPP1</i>	H4 (0.73)
	<i>PAPSS2, ATAD1, PTEN</i>	H4, SW1088
	<i>LIPF, ANKRD22, STAMBPL1, ACTA2, FAS, CH25H, LIPA</i>	SW1088 (1.50)
10q25.2	<i>TCF7L2</i>	T98 (0.16)
12q21.2	<i>PAWR</i>	GOS3 (0.14)
21p11.1	<i>BAGE4, BAGE5, BAGE3, BAGE2, BAGE</i>	H4, A172, U118, GOS3 (0.04)

Tabla 6. Deleciones homocigotas encontradas en las líneas celulares mediante CGH. El tamaño de la región de pérdida se indica entre paréntesis (Mb).

Resultados

Los resultados de CGH fueron validados mediante la técnica de MLPA. En la Tabla 7 se recoge un resumen de los resultados obtenidos mediante esta técnica. En concreto, se confirmó que 9 de las 11 líneas celulares de gliomas de nuestro estudio presentaban delección homocigota del gen *CDKN2A* y que sólo dos líneas carecían de delección, SW1783 y SF767 (Figura 18).

	CROMOSOMA	GEN	LÍNEA CELULAR
HOM	9p21	<i>CDKN2A</i>	U373, U118, SW1088, GOS3, A172, H4, T98, U87, N18
	10q23	<i>PTEN</i>	A172, SW1088, H4
HEMI	1p13.2	<i>NRAS</i>	A172, H4
	10q23	<i>PTEN</i>	SF767, GOS3

Tabla 7. Resumen de las delecciones en genes específicos validadas por MLPA
(HOM: pérdida en homocigosis; HEMI: pérdida en hemicigosis)

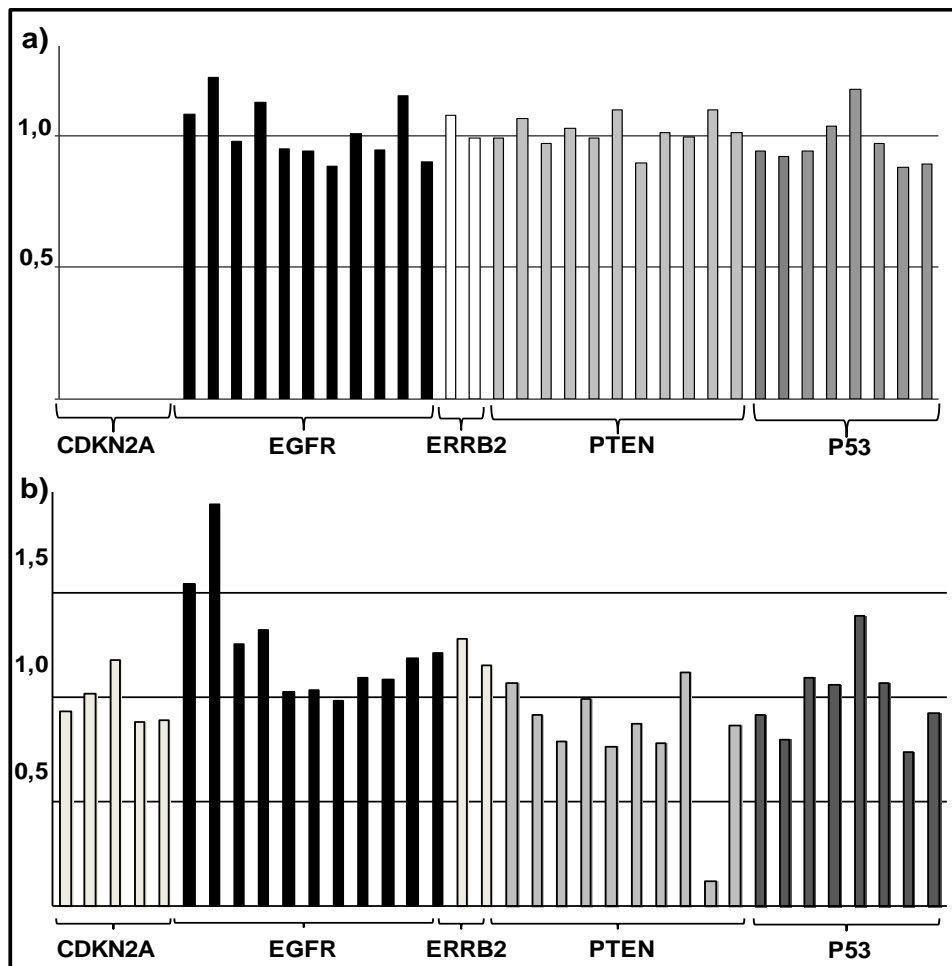


Figura 18. Gráfica con resultados representativos del análisis mediante MLPA donde se observa una línea con delección homocigota de *CDKN2A*, LN18 (a) y otra sin delección, SW1783 (b). Cada barra representa una de las sondas contenidas en el *kit* de MLPA utilizado. El valor que representa cada barra es la dosis génica para esa sonda en el DNA de la línea celular en relación a la dosis génica del promedio de tres DNAs no tumorales analizados a la vez que las muestras problema.

Por otra parte, la información contenida en la base de datos del CGP también permitió confirmar que las líneas A172, H4, SW1088, T98, U118 y U87 presentaban delección en homocigosis de *CDKN2A* (9q21.3), mientras que la línea SW1783 no la presentaba, validando los resultados de CGH previamente obtenidos. Por otra parte, aunque la línea U373 no está representada en esta base de datos, sí se recoge la línea U251, que tiene el mismo origen que ésta, y en ella se recoge la pérdida en homocigosis de *CDKN2A*, de forma similar a lo encontrado en la línea U373. Además, con esta base de datos confirmamos las delecciones homocigotas de *CDKN2C* (1p33) para las líneas T98 y U87, identificadas en el análisis por CGH. Las líneas GOS3, LN18 y U373 no estaban recogidas en la base de datos del CGP.

El análisis de CGH también demostró que dos líneas eran portadoras de una delección homocigota para el gen *PTEN*, SW1088 y H4, lo cual fue confirmado mediante MLPA y en la base de datos de CGP. Mediante el análisis MLPA también se hallaron delecciones hemocigotas (pérdida de una de las copias del gen) en SF767 y GOS3 (Figura 19). Curiosamente, el MLPA demostró que la línea A172, presentaba delección en homocigosis de todas las sondas de *PTEN*, excepto para aquellas localizadas en los exones 1 y 2 que estaban conservados. Esta pérdida no pudo ser detectada por CGH porque sólo dos de las tres sondas correspondientes a este gen en el *microarray* se localizaban en la zona de pérdida. El filtro aplicado para el análisis consideraba que había pérdida homocigota cuando tres sondas consecutivas presentaban un umbral de señal por debajo de -1.0 (Figura 20).

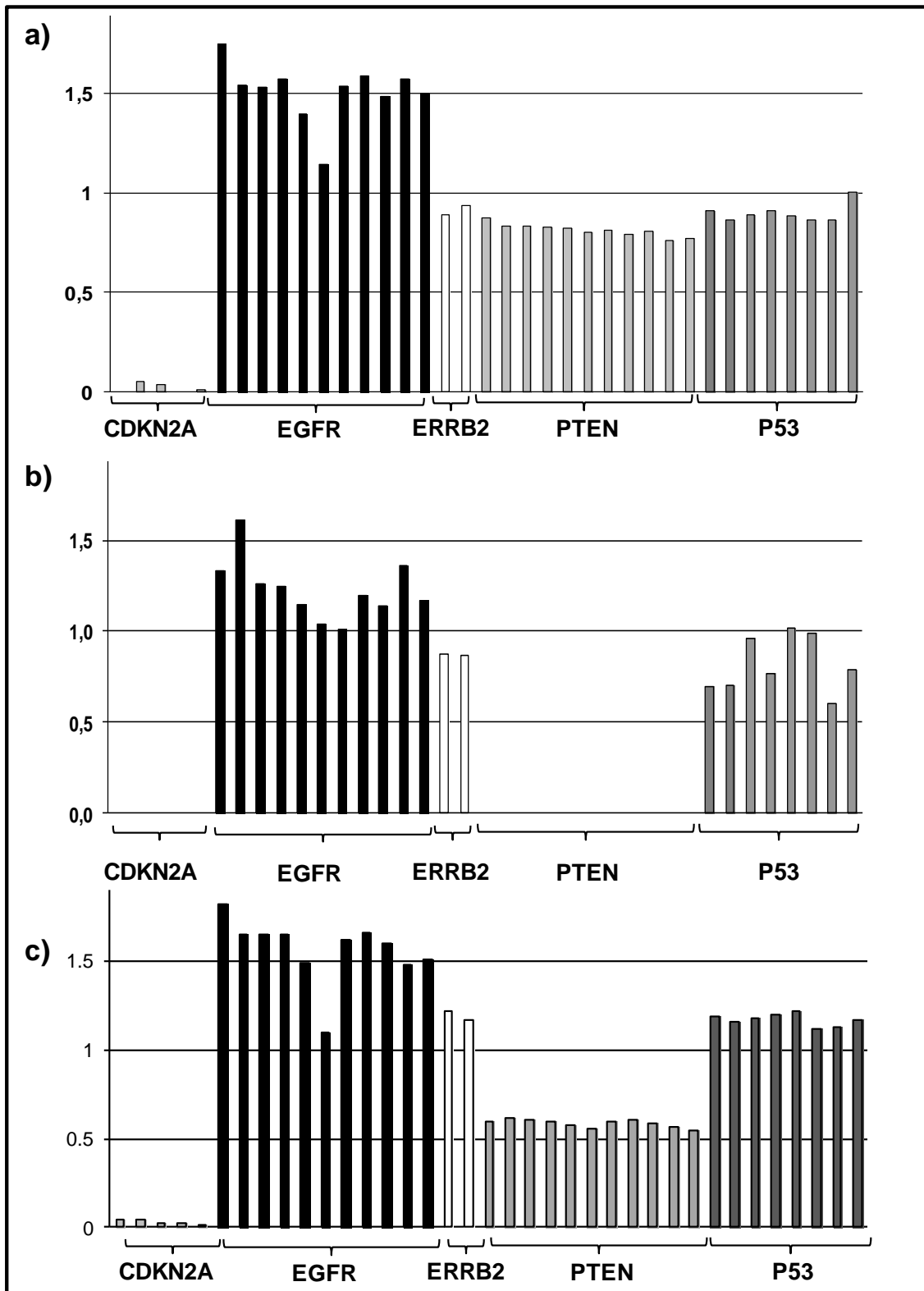


Figura 19. Gráfica con los resultados de MLPA para tres líneas celulares con delección homocigota de *CDKN2A*. Una de ellas tiene *PTEN* conservado, U118 (a) y las otras presentan delección en homocigosis, SW1088 (b), y en hemicigosis, GOS3 (c).

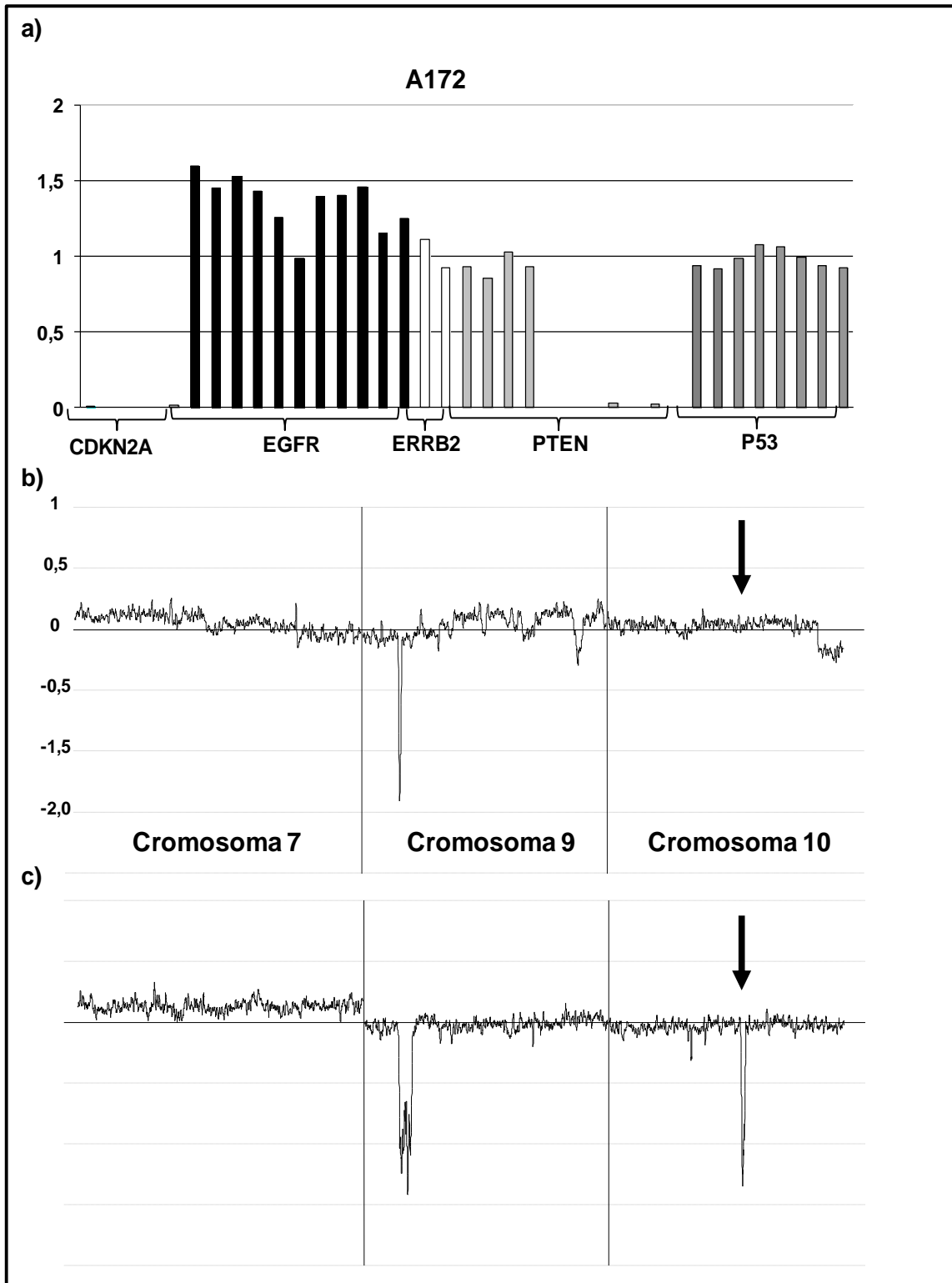


Figura 20. Análisis genómico de las líneas A172 y SW1088. (a) Resultados de MLPA para la línea A172 mostrando ganancia de *EGFR*, delección homocigota de *CDKN2A* y delección homocigota de *PTEN* excepto en los exones 1 y 2. Se muestran los resultados de CGH para los cromosomas 7, 9 y 10 de las líneas A172 (b) y SW1088 (c). La flecha indica la zona donde se encuentra *PTEN* en 10q23. Se observa que la línea SW1088 tiene perdida esa región mientras que en A172 no se detecta dicha pérdida.

1.1.2 Ganancias

Aplicando un filtro estricto en el análisis por CGH, con el que sólo se detectarían las **amplificaciones** o **ganancias de alto nivel**, éstas se detectaron en **4q**, **10q** y **19q** en dos de las líneas celulares: SW1783 (4q12) y SF767 (10q21.2-q23.1 y 19p12) (Figura 21, Tabla 7). La amplificación detectada de *PDGFRA* (4q12) en la línea SW1783 pudo confirmarse mediante MLPA (Tabla 8).

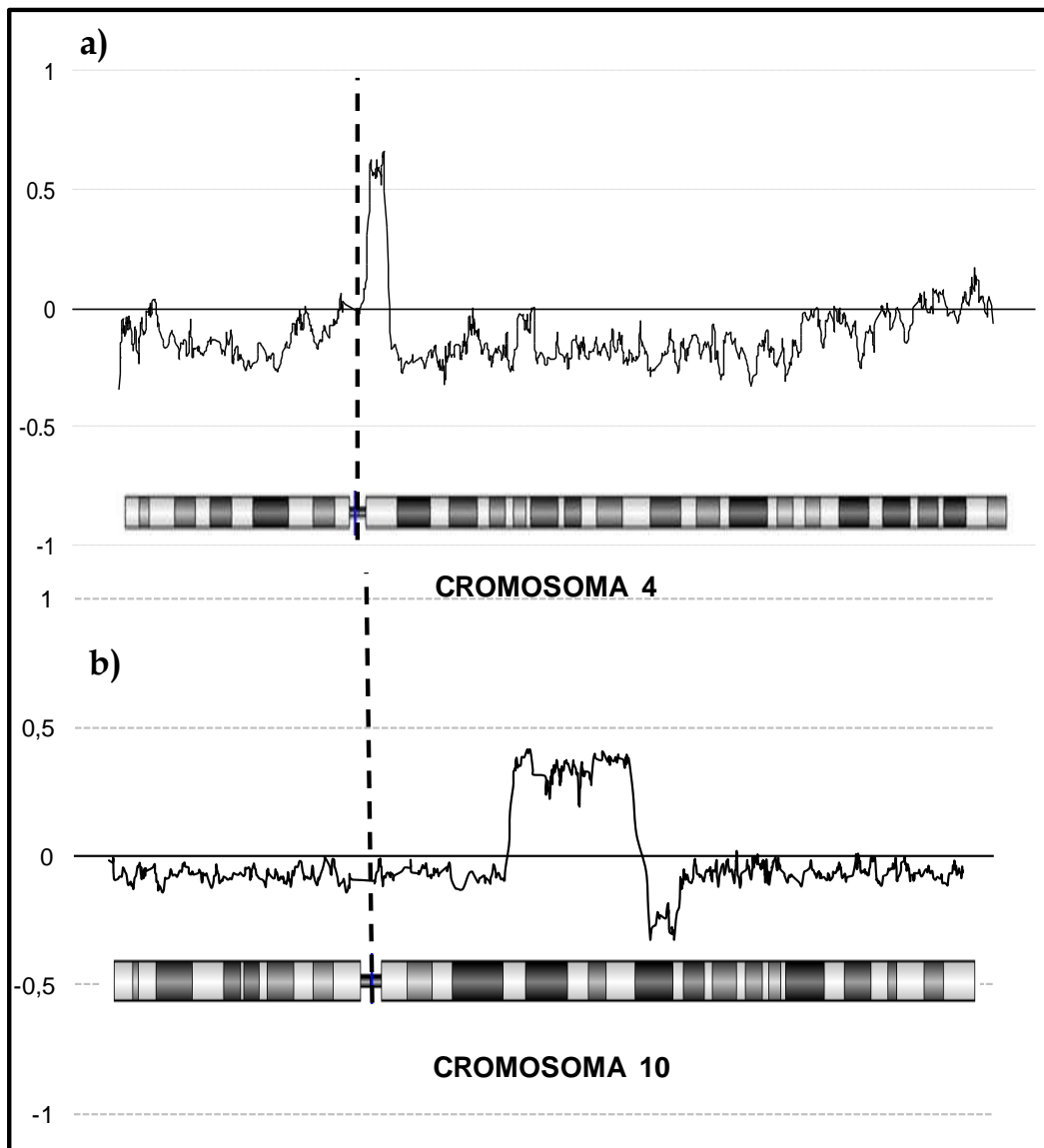


Figura 21. Representación de las ganancias de alto nivel detectadas mediante CGH en el cromosoma 4 (a) en la línea SW1783, donde se observa ganancia en 4q12; y (b) en el cromosoma 10 en la línea SF767, observándose la ganancia en 10q21.2-q23.1. La línea representa la media de 5 genes contiguos, donde el dato para cada sonda se obtiene del logaritmo (\log_2) del ratio de la señal obtenida para la muestra problema con la señal obtenida para la referencia.

Resultados

REGIÓN	GENES	LÍNEA CELULAR
4q12	<i>CHIC2, GSH2, PDGFRA, KIT, KDR, SRD5A2L, TMEM165, CLOCK, PDCL2, NMU, EXOC1, CEP135, AASDH, PPAT, PAICS, SRP72, HOP, SPINK2, REST, OLR2B, IGFBP7</i>	SW1783 (3.57)
10q21.2 - q23.1	<i>COL13A1, H2AFY2, AIFM2, TYSND1, SAR1A, PPA1, NPFFR1, LRRC20, EIF4EBP2, NODAL, PRF1, ADAMTS14, SGPL1, PCBD1, UNC5B, SLC29A3, CDH23, PSAP, CHST3, SPOCK2, ASCC1, DNAJB12, CBARA1, CCDC109A, OIT3, PLA2G12B, P4HA1, NUDT13, ECD, DNAJC9, MRPS16, TTC18, ANXA7, ZMYND17, PPP3CB, USP54, MYOZ1, SYNPO2L, SEC24C, FUT11, NDST2, CAMK2G, PLAU, VCL, AP3M1, ADK, MYST4, DUSP13, SAMD8, VDAC2, KCNMA1, DLG5, NAG13, POLR3A, RPS24, ZMIZ1, PPIF, SFTPD, ANXA11, MAT1A, DYDC1, DYDC2, TSPAN14, NRG3</i>	SF767 (13.37)
19p12	<i>ZNF43, SINE-R, ZNF208, ZNF257</i>	SF767 (0.28)

Tabla 8. Resumen de las ganancias de alto nivel (amplificaciones) detectadas mediante CGH en las líneas celulares de gliomas. El tamaño de la región se indica entre paréntesis (Mb).

Respecto a las **ganancias de bajo nivel**, el **cromosoma 7** fue uno de los más ganados, con una ganancia completa o casi completa en SW1088 y GOS3, o con regiones de ganancia relativa en H4, U373, U118 o A172 (Tabla 9). En la Figura 22 se muestran dos líneas representativas que muestran estos resultados.

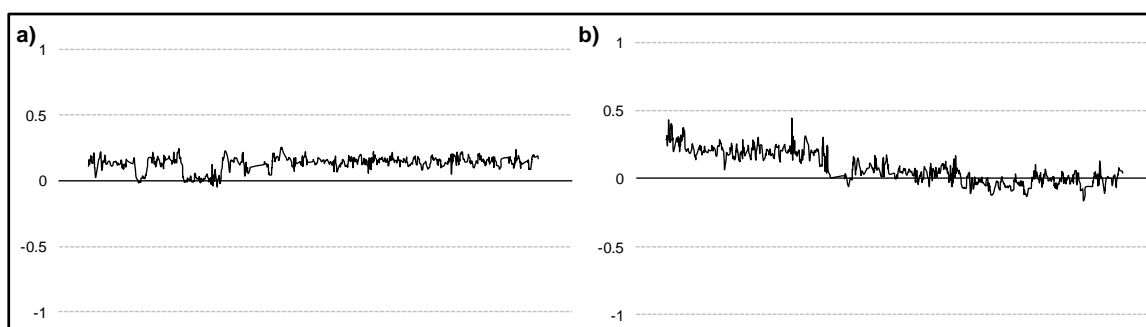


Figura 22. Representación de resultados de CGH para el cromosoma 7. **a)** Se observa ganancia total del cromosoma 7 para GOS3. **b)** Se observa ganancia parcial (7p) para H4.

Resultados

Además del cromosoma 7, otros cromosomas que demostraron ganancias de bajo nivel en estas líneas fueron: el 16, 17, 19 y 20 (Tabla 9).

CR.	BRAZO p	BRAZO q
7	<p>p22.3 - p11.2 p22.3 - p14.3 p22.3 - p22.1 p21.3 - p11.2 p21.2 - p21.1</p> <p>p21.1 p15.1 p12.3 - p11.2 p11.2</p>	<p>q11.21 - q11.22 q11.21 - q21.11 q11.21 - q22.1 q11.21 - q36.3 q11.22 q11.23 q11.23 - q22.1 q21.11 q21.11 - q21.2 q21.2 - q21.3</p> <p>q21.3 q21.3 - q22.1 q22.1 q22.1 - q31.33 q22.1 - q36.3 q31.32 - q36.3 q31.33 - q34 q34 - q36.3 q36.1 q36.1 - q36.3</p>
16	<p>p13.3 p13.3 - p11.2 p13.3 - q21 p13.12 - p13.11</p> <p>p12.1 - p11.2 p12.1 p11.2 p11.1 - q11.2</p>	<p>q11.2 - q12.2 q12.1 - q22.1 q12.2 - q21 q12.2 - q13 q21 q21 - q22.3 q21 - q24.3</p> <p>q22.1 q22.3 - q24.3 q22.3 q22.3 - q23.1 q23.1 - q24.1 q24.1 - q24.2 q24.2 - q24.3</p>
17	<p>p13.3 - q25.3 p13.3 - p13.1 p13.3 - p12 p12 - q25.3</p> <p>p12 - p11.2 p11.2 - q21.33 p11.2</p>	<p>q11.2 q12 - q21.31 q21.31 - q21.33 q21.31 - q25.3</p> <p>q21.33 - q25.3 q22 - q25.3 q25.3</p>
19	<p>p13.3 p13.3 - p13.2 p13.3 - p13.11 p13.2 - p13.12 p13.13 - p13.12</p> <p>p13.12 - p13.11 p13.11 - p12 p13.11 - q12 p12 p12 - q13.43</p>	<p>q12 - q13.11 q12 - q13.12 q13.11 - q13.12 q13.12 q13.12 - q13.2 q13.2 q13.31 q13.31 - q13.32 q13.31 - q13.33</p> <p>q13.32 q13.32 - q13.33 q13.33 q13.33 - q13.41 q13.33 - q13.42 q13.41 - q13.43 q13.42 q13.42 - q13.43 q13.43</p>
20	<p>p13 - q13.33 p13 - q11.1 p13 - q13.12</p> <p>p13 - p12.3 p13 - p11.21 p11.21 - q13.33</p>	<p>q11.21 - q13.33</p> <p>q13.12 - q13.33</p>

Tabla 9. Resumen de las regiones que con más frecuencia presentaban ganancias de bajo nivel en líneas celulares de gliomas. (CR: Cromosoma)

Resultados

En general, las ganancias de bajo nivel detectadas afectan a gran cantidad de genes. Sin embargo, algunas de estas ganancias pudieron comprobarse a través del análisis mediante MLPA. En concreto, la ganancia del gen *EGFR* (localizada en 7p12) fue evaluada por MLPA, demostrando que 8 de las 11 líneas celulares presentaban ganancias de bajo nivel para dicho gen (Tabla 10, Figura 19, 20). La ganancia en otros genes también fue comprobada mediante el análisis de MLPA, *PIK3CA*, *BRAF* y *BIRC5* (Tabla 10): dos de las líneas celulares presentaban una ganancia en ***PIK3CA* (3q)** (A172, SW1783; Figura 23); el **oncogén *BRAF* (7q34)** estaba ganado en 6 líneas (U87, U373, SW1088, GOS3, T98, SW1783) y el **gen *BIRC5* (17q)** que codifica para la proteína **survivina**, estaba ganado en 5 de las líneas celulares (H4, LN18, T98, U373, A172) (Figura 23). La ganancia detectada mediante MLPA del gen *BRAF*, localizado en el cromosoma 7, es concordante con el resultado obtenido mediante CGH en el que se detectó la ganancia completa o parcial de este cromosoma.

	CROMOSOMA	GEN	LÍNEA CELULAR
GANANCIA	1p13.2	<i>NRAS</i>	U373
	1q32	<i>PI3KC2B</i>	A172
	2q35	<i>IGFBP2</i>	SW1088
	3q26.3	<i>PIK3CA</i>	A172, SW1783
	7p12	<i>EGFR</i>	U373, U118, SW1088, GOS3, A172, H4, T98, SF767
	7q34	<i>BRAF</i>	U87, U373, SW1088, GOS3, T98, SW1783
	17p11.2	<i>TOM1L2</i>	LN18
	17q25	<i>BIRC5</i>	H4, LN18, T98, U373, A172
	21q22.3	<i>RUNX1</i>	H4, A172, T98
A	4q11	<i>PDGFRA</i>	SW1783

Tabla 10. Resumen de las ganancias validadas mediante MLPA. (A: amplificación)

Mientras que nuestros resultados mediante MLPA muestran que dos de las líneas celulares (A172, SW1783; Tabla 10) presentaban una ganancia en *PI3KCA*, estudios previos de otros autores realizados mediante PCR cuantitativa demostraron que tres líneas incluidas en nuestro presentaban una ganancia de más de tres copias (LN18, A172 y U373) (Kita *et al.*, 2007). Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados y los de otros autores, 4 de las

11 líneas celulares de gliomas utilizadas en este estudio presentaban ganancia de *PIK3CA* (LN18, A172, U373 y SW1783).

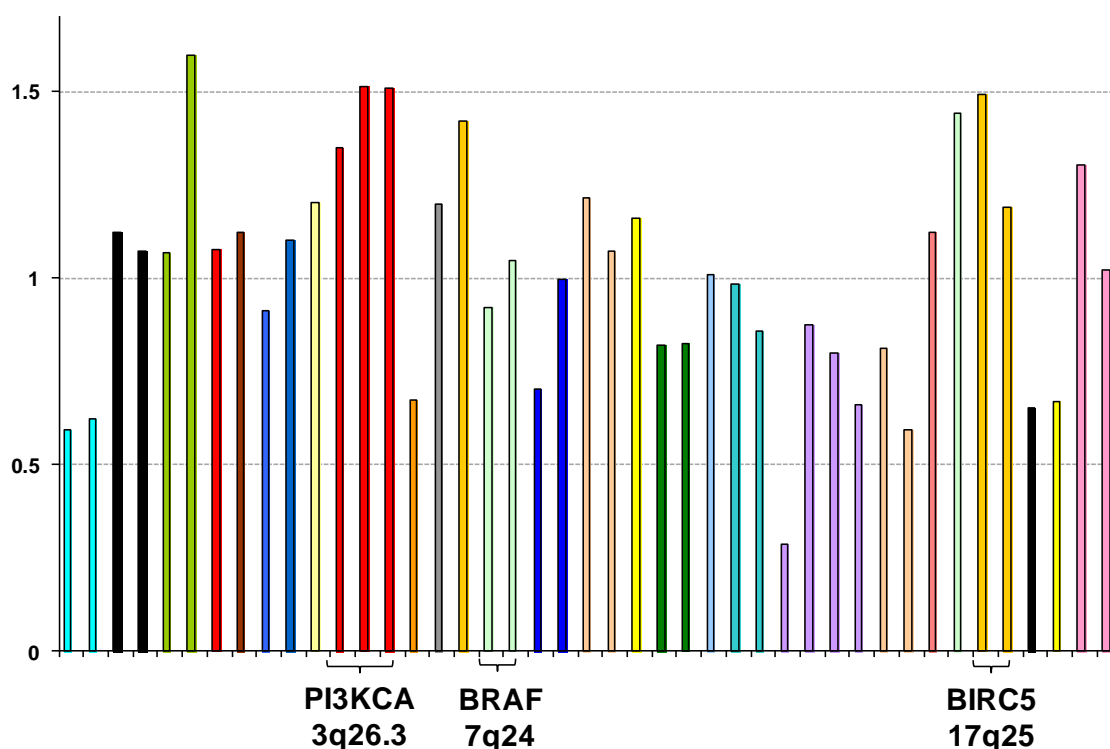


Figura 23. Análisis de ganancias génicas en la línea celular A172 mediante MLPA. Cada barra muestra una de las sondas del kit. En la gráfica se señalan *PI3KCA* y *BIRC5*, que muestran ganancias, mientras que *BRAF*, no muestra ni ganancia ni pérdida. Los genes que se detectan con este kit son (de izquierda a derecha en la gráfica y por colores): *NRAS*, *NTRK1*, *PIK3C2B*, *BCL2L11*, *ERBB4*, *IGFBP2*, *IGFBP5*, *PIK3CA*, *PDGFRA*, *SERPINB9*, *NFKBIE*, *BRAF*, *JAK2*, *NTRK2*, *FGF4*, *CYP27B1*, *IRS2*, *NTRK3*, *IGF1R*, *TOM1L2*, *IGFBP4*, *PPM1D*, *BIRC5*, *SERPINB7*, *SERPINB2*, *RUNX1*.

1.2 ANÁLISIS DE MOLÉCULAS RELEVANTES PARA LA BIOLOGÍA TUMORAL DE LOS GLIOMAS

1.2.1. PTEN

La proteína codificada por el gen *PTEN* fue caracterizada en las líneas celulares mediante WB (Figura 24). Cuatro de las once líneas celulares de gliomas estudiadas expresaban la proteína (T98, LN18, GOS3 y SF767), mientras que 7 de ellas no la expresaban, presentando tres de estas últimas una delección homocigota, en concordancia con los resultados genómicos obtenidos previamente (SW1088, H4, A172) (Tablas 6, 7).

Resultados

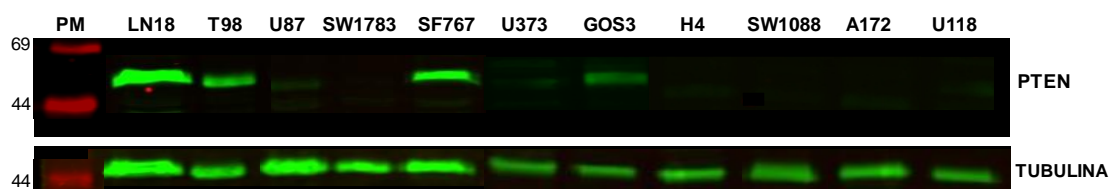


Figura 24. Western-blot donde se muestra la expresión de la proteína PTEN en las líneas celulares de glioma. Cuatro de las once líneas celulares expresan la proteína: LN18, T98, SF767 y GOS3. PM: peso molecular. Se utilizó el marcaje de la tubulina como control de carga de la membrana.

En las cuatro líneas restantes que no expresaban la proteína PTEN ni presentaban delección en homocigosis (U118, U87, U373 y SW1783), se secuenciaron los 9 exones del gen para hallar posibles mutaciones. Se encontró que U118 y U87 presentaban mutaciones de sustitución (G>T) en el sitio de *splicing* del exón 8 (c.1026+1G>T) y del exón 3 (c.209+1G>T), respectivamente. Se demostró que la línea U373 era portadora de una inserción en homocigosis de dos timinas en el exón 7 que causaban un cambio en el marco de lectura (c.723_724insTT) (Figura 25 a,b). La línea SW1783 contenía una sustitución en el exón 7 (c.691C>T) que generaba un codón stop (CGA>TGA) (Figura 25 c,d). Esta última mutación se confirmó con los resultados recogidos en el CGP. En esta base de datos, aunque no hay datos para U373, sí que se recoge la misma inserción para la línea celular U251 que comparte el mismo origen que U373. Esta mutación, además, se confirma en el trabajo de Kita *et al.*, 2007.

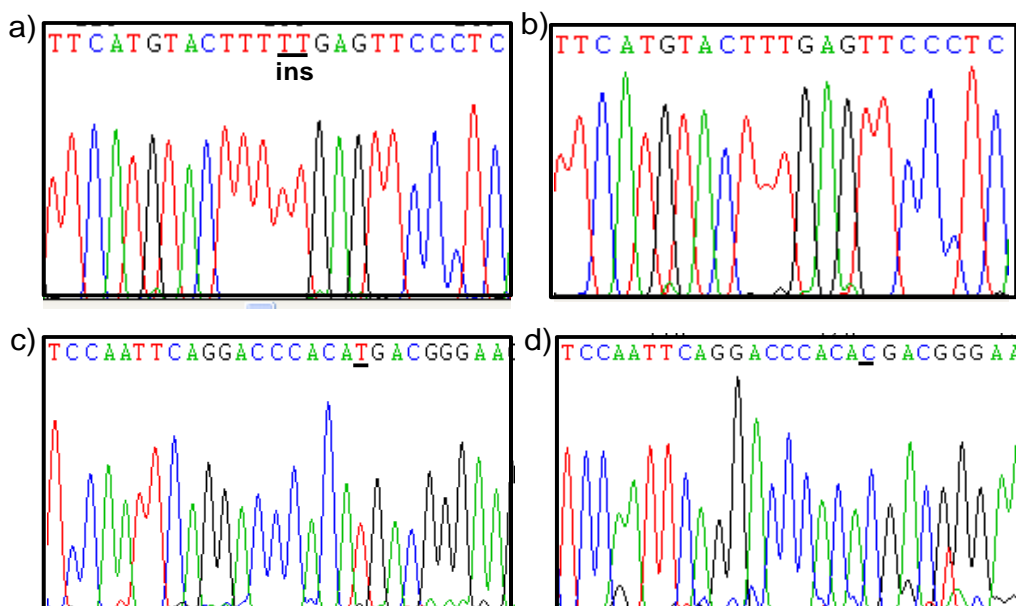


Figura 25. Mutaciones puntuales de PTEN. a) Inserción de TT en el exón 7 de U373 b) Misma secuencia no mutada c) Sustitución C>T en exón 7 de SW1783 d) Misma secuencia no mutada.

1.2.2 EGFR

Se utilizó IHC para comprobar la expresión de EGFR. Esta inmunotinción demostró que las once líneas celulares expresaban, en mayor o menor medida, el receptor en la membrana celular (Figura 26).

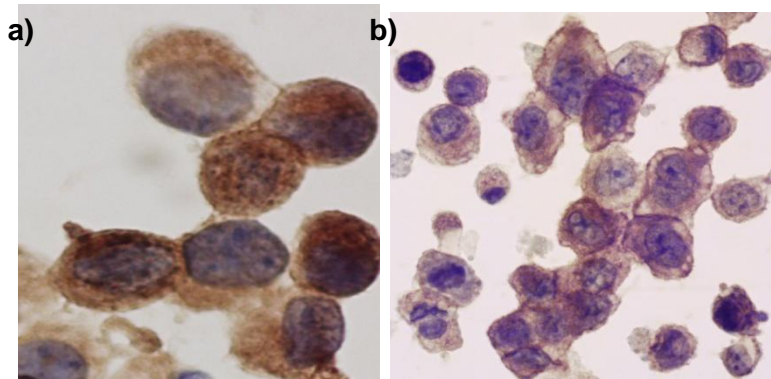


Figura 26. Resultados de IHC para el marcaje con anti-EGFR: a) T98, muestra positividad en la membrana. **b)** GOS3, muestra positividad en la membrana, pero con menos intensidad que la anterior.

Por otro lado, el análisis de la presencia de la forma mutante *EGFRvIII* se realizó mediante RT-PCR, comprobándose que ninguna de las células de este estudio expresaba dicha forma mutante (Figura 27).

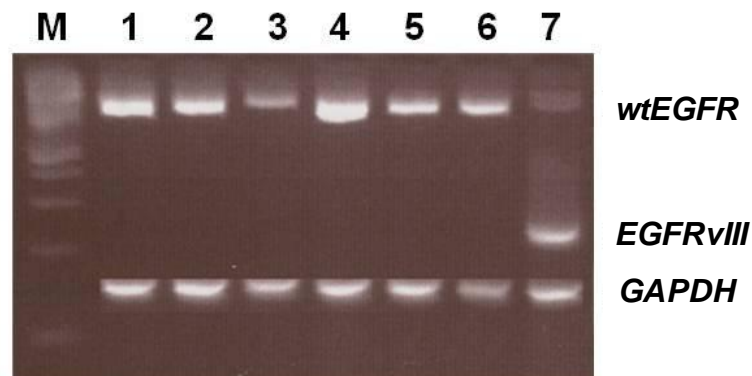


Figura 27. Detección de EGFR nativo (*wtEGFR*) y *EGFRvIII* mediante RT-PCR. Se muestra también el resultado para el gen *GAPDH* usado como control de la reacción. Línea 1: GOS3, 2: A172, 3: U118, 4: SF767, 5: T98, 6: *wtEGFR* control, 7: *EGFRvIII* control; M: marcador molecular.

Además en las líneas del estudio también se secuenciaron los exones 18 al 21 del gen de *EGFR*, correspondientes al dominio tirosina quinasa, ya que en estos exones se encuentra la mayor frecuencia de mutaciones en cáncer de pulmón que se relacionan con la respuestas a TKIs. No se

encontraron mutaciones en ninguno de estos exones para ninguna de las líneas. En concreto, ninguna de las líneas celulares presentaba la mutación T790M que está asociada a resistencia adquirida al ERL, ni la mutación L858R o deleción del exón 19, que están asociadas a una mejor respuesta a los TKIs, en cáncer de pulmón.

1.2.3 TP53

Se analizó la expresión de la proteína TP53 mediante el marcaje por IHC. Se sabe que las mutaciones en este gen habitualmente producen una proteína anómala, más estable de lo normal, que la hace detectable mediante IHC, lo que ha llevado a asociar la detección TP53 por IHC con la mutación del gen (Pardo *et al.*, 2004). Se ha observado que diversos tumores que muestran positividad para TP53 mediante IHC, presentan mutaciones en el gen (Ruano *et al.*, 2009; Yemelyanova *et al.*, 2011). Con esta técnica, se detectó positividad para las 6 líneas que tenían mutaciones recogidas en las bases de datos del CGP y del ATCC (T98, LN18, U118, SW1088, SW1783, U373). Del resto de las líneas que no aparecen en la base de datos, encontramos que GOS3 tenía marcaje de TP53 y por tanto puede presentar mutación del gen. Se observó ausencia de marcaje para A172, U87, SF767 y H4 (Figura 28). De éstas, U87 y SF767 presentan la forma nativa de TP53 según la bibliografía (Data *et al.*, 2004; Blough *et al.*, 2011).

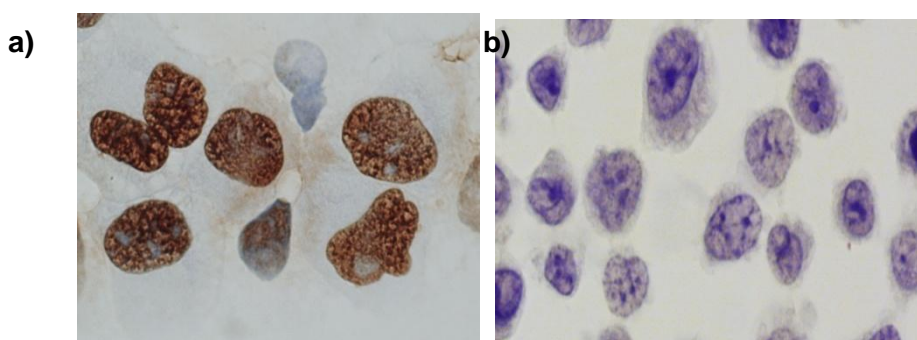


Figura 28. Resultados de IHC para TP53 en dos líneas representativas. a) Se muestra el marcaje positivo nuclear de TP53 en la línea T98. **b)** La ausencia de marcaje para la inmunotinción de TP53 indicaría ausencia de mutación en la línea H4.

1.3. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOMAS

Como se ha indicado en la introducción, las tres rutas más frecuentemente alteradas en GBM son la ruta **TP53** (87% de los tumores afectados), la ruta **RB1** (78%) y la ruta **RTK/PI3K/PTEN** (88%) (Chin et al, 2008).

Respecto a la ruta PI3K, las alteraciones en EGFR, PTEN y PIK3CA suelen ser mutuamente excluyentes en GBM, ya que forman parte de una misma ruta de señalización intracelular (Karakas *et al.*, 2006; Kita *et al.*, 2007; Samuels *et al.*, 2005). Sin embargo, en las líneas celulares de gliomas hemos visto que pueden contener alteraciones en los tres componentes de la ruta simultáneamente (Tablas 11). En resumen, todas las líneas celulares de gliomas de nuestro estudio, tienen alterada la ruta del EGFR/PI3K/PTEN en algún punto (Tabla 12).

	RUTA RB		RUTA PI3K				RUTA TP53	
	CDKN2A	PTEN	PTEN sec	EGFR	EGFRvIII	PIK3CA ¹	TP53	TP53 ²
T98	del HOMO	N	-	G	No	N	Pos	p.M237I
LN18	del HOMO	N	-	N	No	G	Pos	p.C238S
SF767	N	del HEMI	-	G	No	N	Neg	No
U373	del HOMO	N*	c.723_724insTT	G	No	G	Pos	p.273C
U87MG	del HOMO	N*	c.209+1G>T	G	No	N	Neg	No
SW1088	del HOMO	del HOMO*	-	G	No	N	Pos	p.R273C
H4	del HOMO	del HOMO*	-	G	No	N	Neg	nd
SW1783	N	N*	c.691C>T	N	No	G	Pos	p.R273C
U118	del HOMO	N*	c.1026+1G>T	G	No	N	Pos	p.R213Q
GOS3	del HOMO	del HEMI	-	G	No	N	Pos	nd
A172	del HOMO	del HOMO*#	-	G	No	G	Neg	nd

Tabla 11. Resumen de las alteraciones encontradas en las rutas RB, TP53 y PI3K

del HOMO: deleción homocigota; **del HEMI:** deleción hemocigota; *No detectada expresión proteica de PTEN mediante *western-blot*; #deleción de *PTEN* excepto para los exones 1 y 2; **G:** ganancia; **N:** no cambio en el número de copias; **No:** no mutación detectada; ¹**PIK3CA:** datos obtenidos de Kita *et al.*, 2007 y de MLPA **TP53:** **Pos:** Inmunotinción positiva **Neg:** Inmunotinción negativa; ²**TP53:** datos obtenidos del CGP y ATCC, Data *et al.*, 2004, Blough *et al.*, 2011; **nd:** datos no disponibles.

	RUTA RB	RUTA PI3K	RUTA TP53
T98			
LN18			
SF767			
U373			
U87MG			
SW1088			
H4			
SW1783			
U118			
GOS3			
A172			

Tabla 12 Resumen global de las alteraciones encontradas en las rutas RB, TP53 y PI3K. El cuadro negro indica alteración en la ruta, mientras que el cuadro en blanco indica que no hay alteración identificada en este trabajo o descrita en la bibliografía previa.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA RUTA EGFR/PI3K/AKT EN LAS LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE GLIOMAS

ERLOTINIB

En este apartado se va a analizar el efecto del tratamiento con erlotinib en las líneas celulares de gliomas, desde el punto de vista de la viabilidad celular, el ciclo celular y la señalización intracelular, además de analizar los perfiles de expresión génica de estas líneas y el efecto del tratamiento sobre la expresión molecular.

2.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ERLOTINIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Los ensayos de viabilidad celular con MTT permitieron realizar el cálculo de IC_{50} y clasificar las líneas celulares de glioma según la respuesta al tratamiento con ERL. La gráfica de viabilidad celular obtenida tras el tratamiento nos muestra dos grupos de líneas celulares (Figura 29): aquellas que tienen un valor **de $IC_{50} < 20 \mu M$** , que clasificamos como **sensibles a ERL** (H4, SF767, T98) y las que tienen un **$IC_{50} > 100 \mu M$** , que consideramos **resistentes a ERL** (U87, U118, SW1783, SW1088, LN18, GOS3, U373, A172). No obstante, en esta gráfica se observa que la concentración mínima de ERL que diferencia ambos grupos es $10 \mu M$. De acuerdo con estos resultados y con la bibliografía previa sobre el uso de este inhibidor en líneas celulares de gliomas (Mellinghoff *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006) se eligió esta concentración de ERL ($10 \mu M$) para estudios posteriores.

Resultados

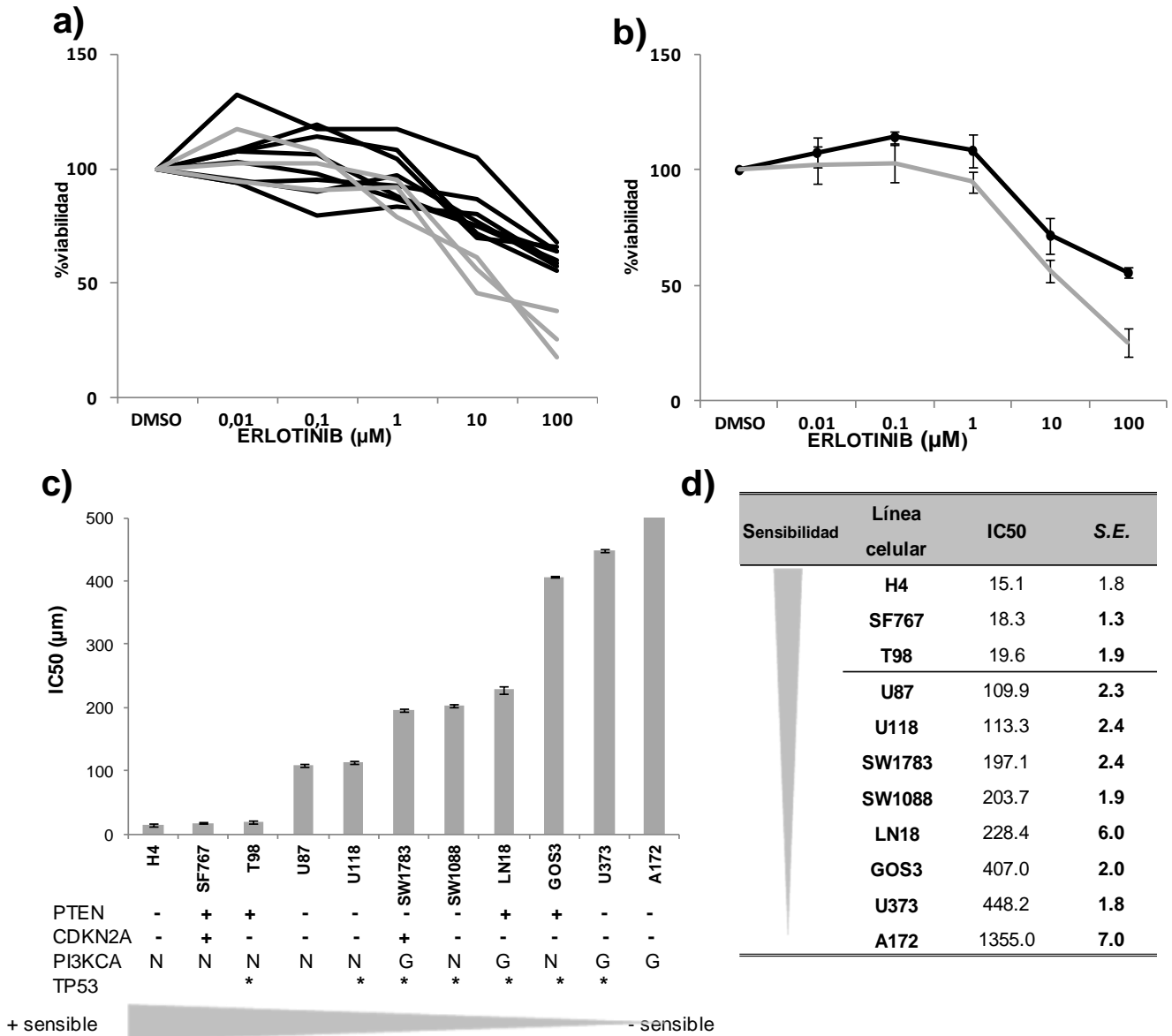


Figura 29. Resultados de los ensayos de viabilidad celular para Erlotinib. a) Gráfica de viabilidad celular. En negro se representan los datos de las líneas resistentes y en gris las sensibles, según los datos de IC₅₀. **b) Gráfica de viabilidad celular con barras de error para dos líneas representativas: U373** (resistente; negro) y **SF767** (sensible; gris) (media±error estándar; n=3) **c) Representación de los valores de IC₅₀** ordenados de menor (más sensible) a mayor (menos sensible). Se representan debajo los marcadores más importantes: PTEN (+: expresión de la proteína; -: no expresión de la proteína); CDKN2A (+: expresión del gen; -: no expresión del gen); PI3KCA (G: ganancia génica); TP53 (*: mutación) **d) Tabla con los valores de IC₅₀ (μm) de erlotinib**, incluyendo datos de error estándar (SE). Las líneas celulares con un valor de IC₅₀<20 μm se consideraron sensibles a ERL y aquellas con IC₅₀>100 μm se consideraron resistentes.

El análisis de los resultados de viabilidad en combinación con los datos moleculares obtenidos mostraron que la mayoría de **las líneas celulares resistentes** a ERL **no expresaban PTEN** (6/8), mientras que la mayoría de **las sensibles** (2/3) **sí lo expresaban** (Figura 29). También se observó que las líneas que tenían ganancia en *PI3KCA* se encontraban entre las que peor respuesta a ERL presentaban. Asimismo, la mayoría de las líneas celulares resistentes tenían mutación en *TP53* (6/8). Por otra parte, no se observó asociación con otros marcadores moleculares tales como la expresión de EGFR, delección de *CDKN2A* o *CDKN2C*, y la respuesta a ERL.

2.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON ERLOTINIB Y TEMSIROLIMUS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Los ensayos clínicos previos han determinado que la eficacia de ERL como agente terapéutico único es limitada en pacientes con GBM progresivo o recurrente, obteniéndose respuestas que no son mejores que las de la terapia convencional (Raizer *et al.*, 2010; Van der Bent *et al.*, 2009; Yung *et al.*, 2010). Por esto, una de las tendencias actuales es utilizar el ERL en combinación con otros inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT, como el temsirolimus, que puedan potenciar su efecto (Minitti *et al.*, 2009; Reardon *et al.*, 2006; Reardon *et al.* 2010; Thaker *et al.*, 2009).

En nuestro caso, estudiamos el efecto del tratamiento combinado de erlotinib y temsirolimus (TEMS) sobre las líneas celulares de gliomas, para lo que en primer lugar caracterizamos el efecto del temsirolimus sobre la viabilidad celular en monoterapia.

2.2.1 Estudios de viabilidad celular tras el tratamiento con temsirolimus

Los resultados de viabilidad celular con TEMS en las líneas celulares de gliomas mostraron que existen **cinco líneas sensibles con una $IC_{50} < 1 \mu M$** (H4, SW1088, U87, GOS3, LN18) **y seis líneas resistentes con una $IC_{50} > 1 \mu M$** (SW1783, T98, A172, U118, SF767, U373) (Figura 30). Además, a la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que la expresión de PTEN no condiciona la respuesta de las líneas celulares de gliomas al inhibidor mTOR,

Resultados

ya que la proporción de líneas celulares que expresan o no PTEN es similar entre las líneas sensibles (2/5) y resistentes (2/6) a TEMS (Figura 30c).

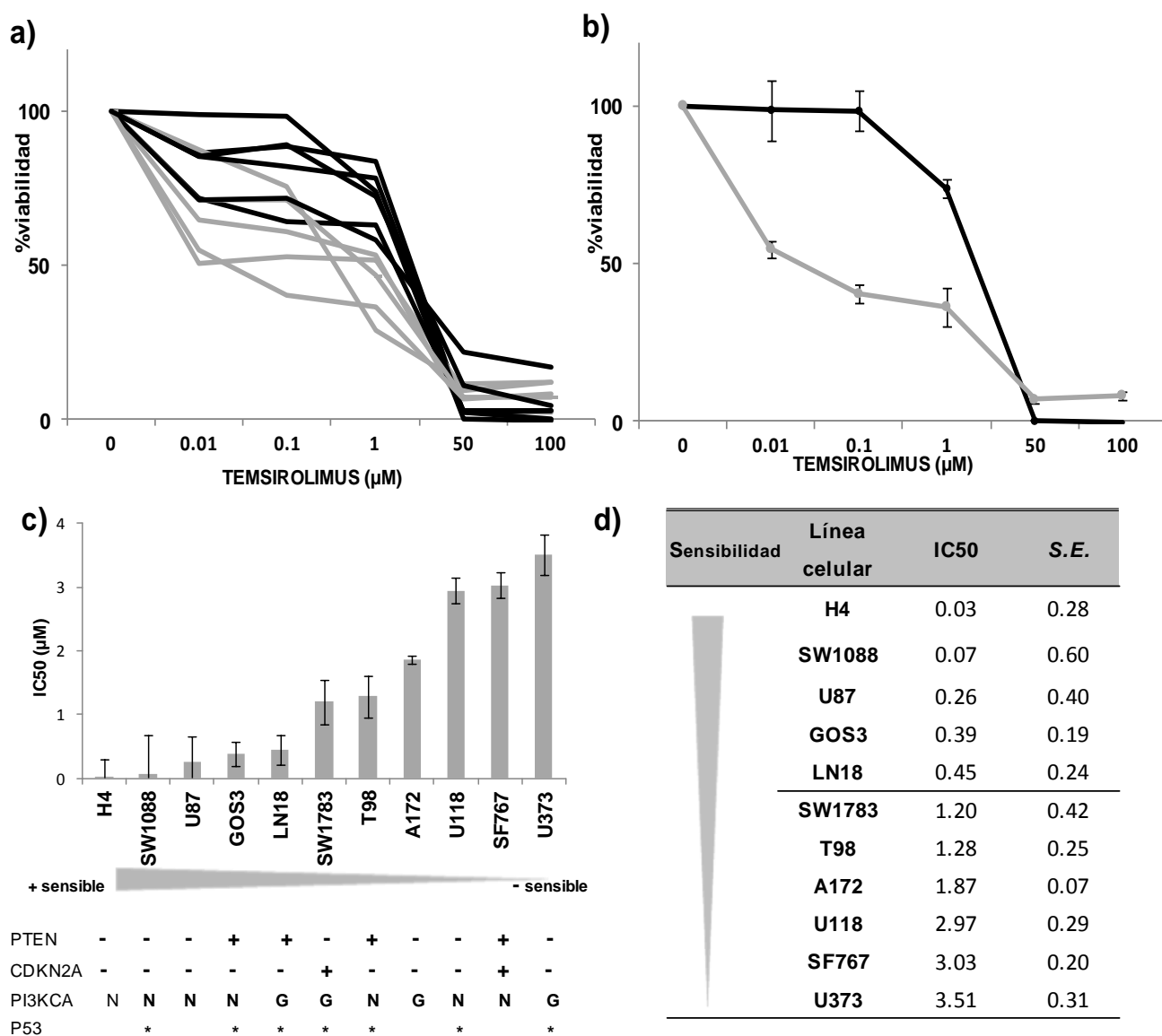


Figura 30 Resultados de los ensayos de viabilidad celular para Temsirolimus. **a)** Gráfica de viabilidad celular. En negro se representan los datos de las líneas consideradas resistentes al tratamiento con TEMS y en gris las sensibles según los datos de IC₅₀. **b)** Gráfica de viabilidad celular para dos líneas representativas: A172 (resistente; negro) y H4 (sensible; gris) (media±error estándar; n=3). **c)** Representación de los valores de IC₅₀ ordenados de menor (más sensible) a mayor (menos sensible), junto con los datos de algunos marcadores moleculares: PTEN y CDKN2A (+: expresión de la proteína; -: no expresión de la proteína); PI3KCA (G: ganancia génica), TP53 (*: mutación) **d)** Tabla con los valores de IC₅₀ (μM) de TEMS, incluyendo datos de error estándar (SE). Las líneas celulares con un valor de IC₅₀<1 μM se consideraron sensibles a TEMS y aquellas con IC₅₀>1 μM se consideraron resistentes.

Cabe destacar que ninguna de las cinco líneas sensibles expresaban *CDKN2A*. Sin embargo, el hecho de que sólo dos líneas de 11 mantengan la proteína y que no haya otros estudios que apoyen este hallazgo, impiden que se puedan sacar más conclusiones. También se observó que más de la mitad de las líneas con mutaciones en *TP53* (4/7) y que la mayoría de líneas con ganancias en *PI3KCA* (3/4) eran resistentes a TEMS (Tabla 11, Figura 30). Por otra parte, no se observó relación con otros marcadores moleculares estudiados (*EGFR*, *CDKN2C*) y la respuesta a TEMS.

2.2.2 Efecto del tratamiento combinado sobre la viabilidad celular

Las ocho líneas clasificadas como resistentes a ERL fueron sometidas a un tratamiento en el que se administraron distintas cantidades de ERL junto con una cantidad constante de TEMS (0,01 μ M). Se eligió esta concentración de TEMS ya que estaba por debajo de la IC_{50} obtenida con el tratamiento en monoterapia, evitando así que la disminución en la viabilidad celular se deba solamente al efecto del inhibidor de mTOR. Para cuatro de estas líneas, el tratamiento combinado mostró una respuesta mejor que el tratamiento en terapia única: LN18, U87, SW1088, U118 (Figura 31). De estas cuatro líneas que respondieron al tratamiento combinado, 3 no expresaban PTEN, sugiriendo que la terapia combinada de ERL y TEMS puede revertir la resistencia a ERL en monoterapia a pesar de que la expresión de PTEN esté alterada.

Resultados

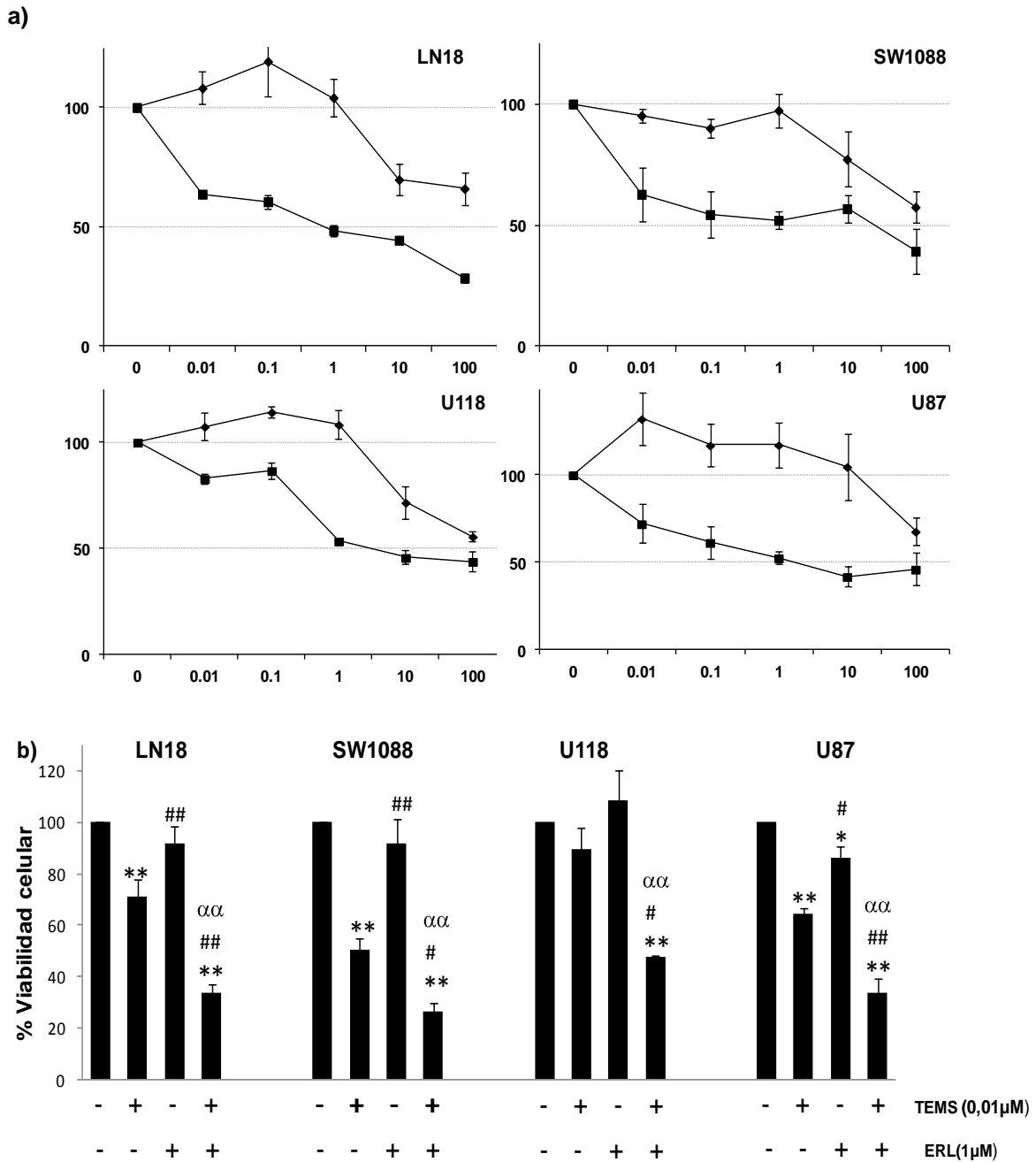


Figura 31. Gráfica de viabilidad celular para las cuatro líneas resistentes a ERL que responden al tratamiento combinado. a) Se representa la viabilidad celular (%; eje y) frente a la concentración ERL (μM ; eje x). La línea con marcador pequeño indica el tratamiento con ERL y la línea con marcador grande representa el tratamiento con ERL a distintas concentraciones combinando con una cantidad constante ($0,01\mu\text{M}$) de TEMS. **b)** Análisis estadístico de la terapia individual o combinada en las líneas celulares de gliomas.

*: significatividad respecto al solvente ($P < 0.05$); #: significatividad respecto a TEMS ($P < 0.05$); significatividad respecto a ERL ($P < 0.05$). Doble símbolo ($P < 0,01$).

Resultados

2.2.3 Comparación de la sensibilidad a erlotinib y temsirolimus con la de otros inhibidores

Comparando nuestros resultados con los obtenidos para otros agentes terapéuticos en uso o en estudio para el tratamiento de gliomas, observamos que no existía ninguna correlación entre la sensibilidad de estas líneas celulares frente a ERL con las encontradas para carmustina (bis-cloroetilnitrosourea, BCNU), temozolomida (TMZ) o 9-Tetrahidrocannabinol (THC) obtenidos por Lorente y colaboradores (Lorente *et al.*, 2011) (Figura 32). Esto sugiere que los mecanismos de resistencia para ERL son específicos y no están asociados con las presencia de mutaciones inductoras de resistencia en el EGFR y que son distintas de otras formas de resistencia existentes para otros agentes terapéuticos.

	+ sensible				- sensible			
ERL	T98	U87	U118	SW1783	SW1088	GOS3	U373	A172
BCNU	GOS3	SW1783	U118	U373	U87	SW1088	A172	T98
TMZ	SW1783	GOS3	SW1088	U87	U118	T98	A172	U373
THC	GOS3	U87	A172	SW1783	U118	U373	T98	SW1088
TEMS	SW1088	U87	GOS3	SW1783	T98	A172	U118	U373

Figura 32. Diferencias en la sensibilidad de las líneas celulares de gliomas entre ERL y distintos agentes terapéuticos usados en glioma. El gráfico representa 8 de las 11 líneas de nuestro estudio en relación a su sensibilidad a erlotinib (ERL), carmustina (BCNU), temozolomida (TMZ), D9-Tetrahidrocannabinol (THC) y temsirolimus (TEMS).

2.3 EFECTO DEL ERLOTINIB SOBRE EL CICLO CELULAR

El tratamiento de las líneas celulares con 10 μ M ERL demostró una **detención del ciclo celular en la fase G1**. El análisis mediante citometría de flujo reveló un aumento del porcentaje de población celular en fase G1 en las células tratadas respecto a las células sin tratar. Este efecto es independiente de la respuesta a ERL determinada por MTT, es decir, que no se observan diferencias en la parada del ciclo celular con el tratamiento entre líneas resistentes y sensibles (Figura 33).

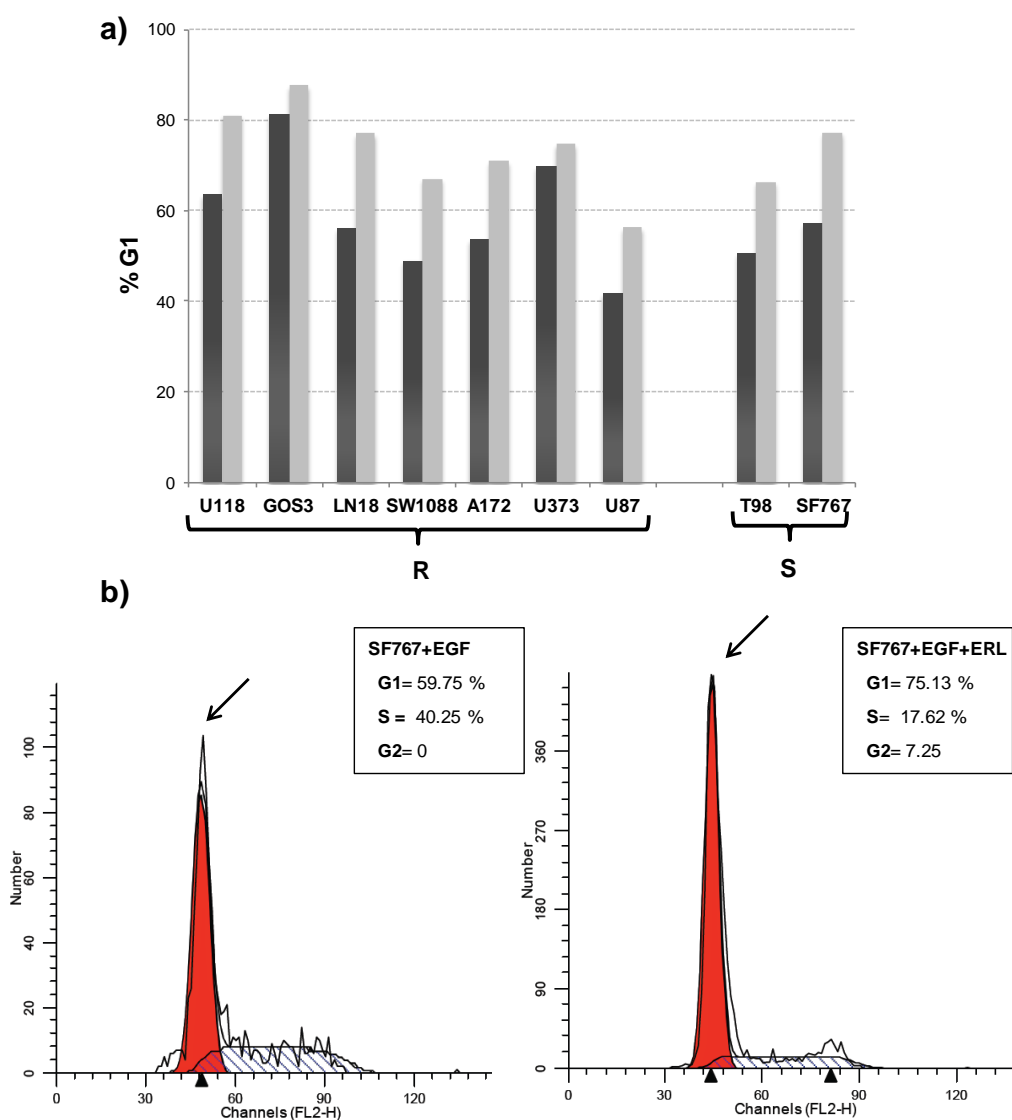


Figura 33. Resultados del estudio del ciclo celular analizado por citometría de flujo. **a)** En la gráfica se representan los porcentajes de células en fase G1 del ciclo para 9 de las líneas celulares analizadas tras tratamiento con ERL (barras gris claro) o sin tratamiento (barras gris oscuro), en ambos casos, tras la estimulación de la ruta de EGFR. **b)** Imagen representativa del análisis de ciclo celular para la línea SF767. Se muestra un aumento en el porcentaje de células en fase G1 (zona de la gráfica en rojo, marcado con flecha) tras el tratamiento con ERL. En la gráfica se muestran los porcentajes de células en cada fase del ciclo antes (SF767+EGF) y después del tratamiento (SF767+EGF+ERL).

2.4 EFECTO DEL ERLOTINIB SOBRE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

También se estudiaron los efectos del tratamiento con ERL en las rutas EGFR/PI3K/AKT y MAPK/ERK, basándonos en el conocido papel que tienen como promotoras de progresión tumoral, tanto en gliomas como en otro tipo de cánceres. Para estudiar la activación de estas dos rutas se analizaron los niveles de AKT y ERK fosforilados antes y después del tratamiento con ERL.

La cuantificación de P-AKT y de P-ERK se realizó mediante ICW en 8 de las 11 líneas celulares del estudio. Se observó que ERL inhibía la señalización en ambas rutas debido a la disminución de los niveles de P-AKT y de P-ERK por debajo del nivel basal, es decir, por debajo de los niveles de proteínas fosforiladas previos a estimular la ruta con EGF en las dos líneas sensibles estudiadas (T98 y SF767), mientras que no se inhibía la señalización en la mayoría de las resistentes (4/6) estudiadas. Dos de las líneas resistentes (GOS3 y U118) sí experimentaban la inhibición de estas rutas tras el tratamiento con ERL (Tabla 13, Figura 34).

	P-AKT	P-ERK	ERL	PTEN
T98	▼	▼	S	+
SF767	▼	▼	S	+
GOS3	▼	▼	R	+
U118	▼	▼	R	-
SW1088	=	=	R	-
U87	=	=	R	-
A172	=	=	R	-
LN18	=	=	R	+

Tabla 13. Resumen del efecto del tratamiento con ERL en la fosforilación de P-AKT y P-ERK en líneas celulares de gliomas. S: sensible R: resistente; +: expresión de PTEN; -: no expresión de PTEN; ▼: disminución de proteína fosforilada; = : no disminución.

Por otro lado, cabe destacar que en la mayoría de las líneas celulares que conservaban la expresión de PTEN (3/4), el tratamiento con ERL producía la inhibición de las rutas AKT y ERK, pero esto no ocurría en la mayoría de las líneas celulares que no expresaban PTEN (3/4). Estos resultados sugieren

Resultados

que la expresión de PTEN, que es un conocido modulador de la ruta del EGFR, favorece el efecto de ERL en las líneas celulares de gliomas (Tabla 13, Figura 34).

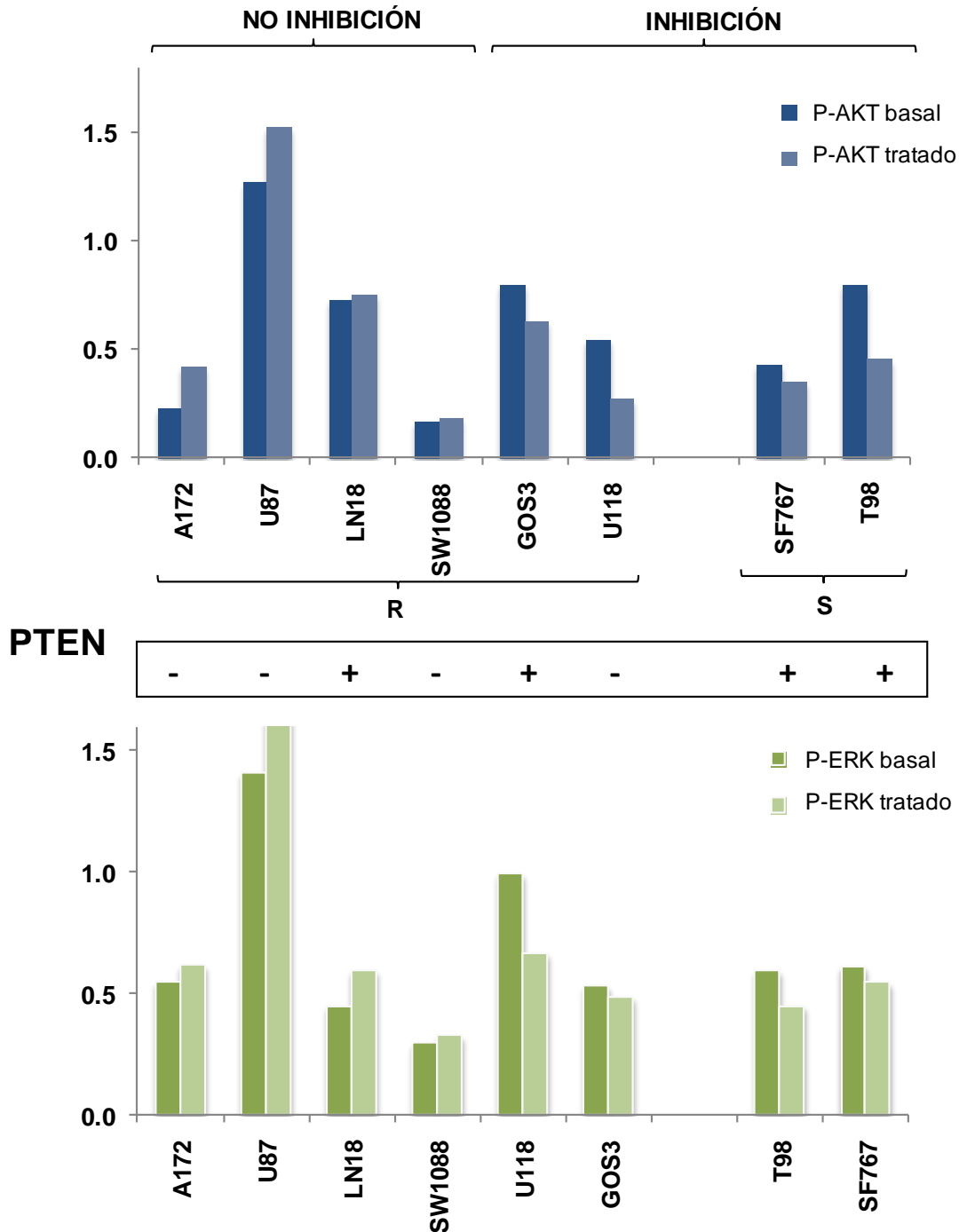


Figura 34. Cuantificación de P-AKT y P-ERK por ICW, comparando la cantidad de proteína fosforilada antes y después del tratamiento con ERL. Se observa que ERL no inhibe ninguna de las rutas en la mayoría de las líneas celulares resistentes ni en la mayoría de líneas celulares que no expresan PTEN. Las líneas celulares sensibles T98 y SF767 si sufren una inhibición en ambas rutas tras el tratamiento con ERL.

Resultados

Estos resultados se validaron mediante WB e ICW, obteniéndose resultados equivalentes, como se muestra en la figura 35.

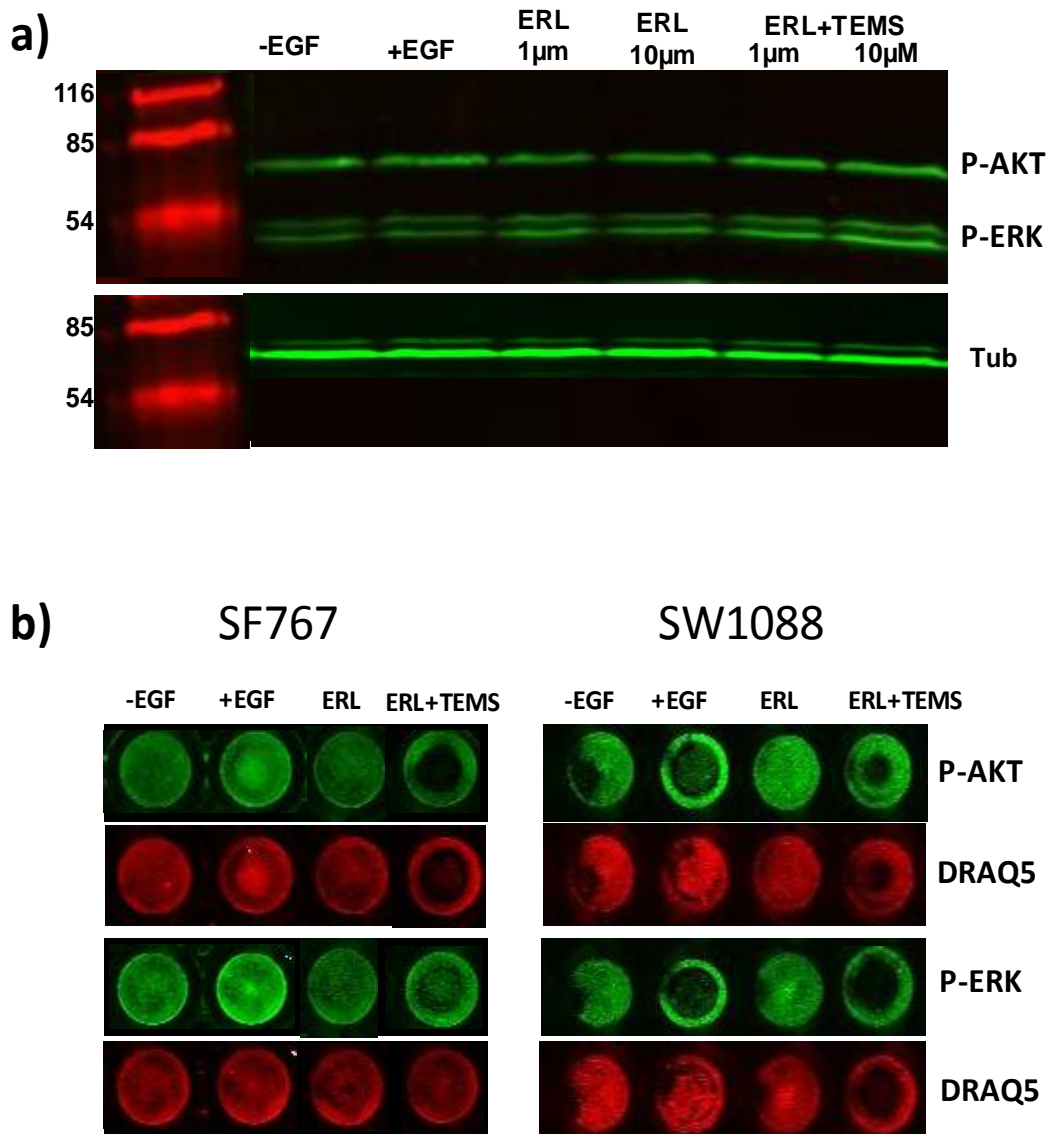


Figura 35. Resultados de WB e ICW para el análisis de P-AKT y P-ERK. a) Western Blot para la línea SW1088 donde se observa que no hay disminución de la fosforilación por el tratamiento en ninguna de las dos rutas. Se ha utilizado como control de carga la tubulina (Tub). **b)** ICW para una línea celular sensible, donde se observa disminución de P-AKT y de P-ERK con respecto al nivel basal, y para la línea celular resistente SW1088, donde no se observa disminución de la señal. Además del tratamiento con 10 μ M ERL también se probó el combinado 10 μ M ERL+ 0,01 μ M TEMS, usado en los ensayos de viabilidad celular. En el tratamiento combinado se observa un aumento de la mortalidad celular que aparece como zona no marcada dentro del pocillo. DRAQ5 se ha utilizado para la normalización y cuantificación de la señal.

2.5 ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS SENSIBLES Y RESISTENTES A ERLOTINIB

El efecto del tratamiento con ERL sobre la expresión génica se analizó mediante *microarrays* de expresión en las líneas celulares de gliomas. Para esto, los cultivos de las once líneas celulares del estudio fueron sometidos a un tratamiento de 24 horas con 10 μM de ERL o 10 μM de ERL y 0,01 μM de TEMS. Por otra parte, también se analizaron los cultivos de las líneas celulares sin tratamiento. En todos los casos se estimuló la ruta EGFR mediante la adición del factor EGF al cultivo.

En primer lugar, para valorar los resultados de manera global se realizó un agrupamiento o clúster jerarquizado no supervisado de las once líneas celulares utilizadas, además de cuatro muestras derivadas de tumores primarios cedidos por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud. Se utilizaron para ello los datos de expresión génica obtenidos de los distintos tratamientos, de las células o tumores sin tratar y de tres muestras de cerebro no tumoral comercial como control. (Figura 36). Para asegurar que el cultivo celular procedente de las muestras tumorales mantenía características génicas similares a las del tumor primario, se realizó un análisis mediante MLPA del DNA extraído del tumor y del extraído de los cultivos derivados (datos no mostrados), confirmándose la similitud.

En general, las muestras de la misma línea celular agrupaban juntas, independientemente del tratamiento. En el clúster se podía observar que las muestras de los cultivos primarios agrupaban con el grupo de líneas celulares resistentes a ERL, y no con las sensibles ni con las muestras de tejido no tumoral. Además, las líneas celulares agrupaban según la respuesta al tratamiento, independientemente de si el tratamiento se combinaba con TEMS (Figura 36).

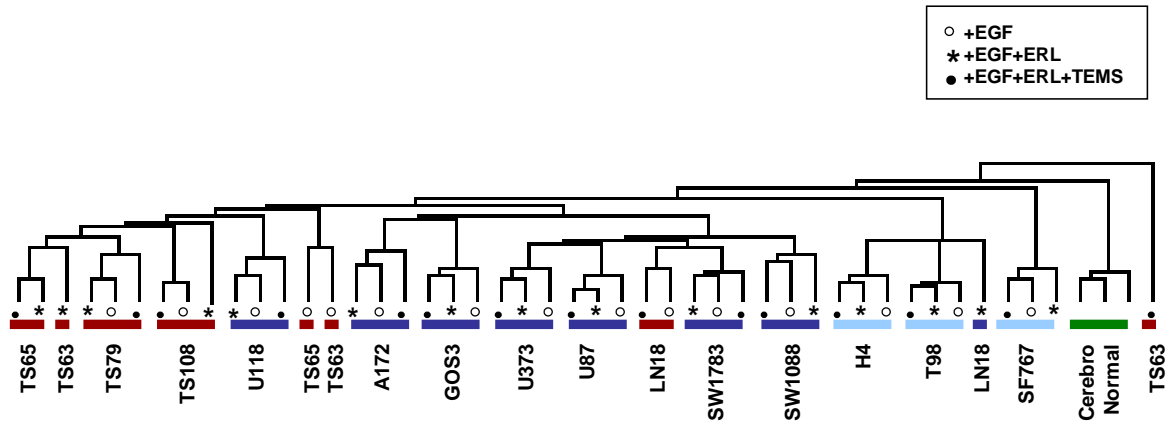


Figura 36. Clúster jerarquizado no supervisado de las líneas celulares de gliomas y los cultivos tumorales primarios con los distintos tratamientos, junto a las muestras de cerebro no tumoral usadas como control.

Los rectángulos indican: azul oscuro, líneas resistentes a ERL; azul claro, líneas sensibles; rojo, cultivos tumorales primarios; verde, tejido cerebral no tumoral. Los símbolos representan los distintos tratamientos:

2.5.1 Genes y rutas diferencialmente expresados entre líneas resistentes y sensibles

La identificación de la firma molecular responsable de la respuesta al tratamiento con ERL en líneas celulares de gliomas se realizó mediante la comparación de los perfiles de expresión génica de las líneas resistentes (8 líneas) y las sensibles (3) (*t*-test, método supervisado) en las muestras no tratadas. De esta manera, se encontraron 1.191 genes diferencialmente expresados entre líneas sensibles y resistentes (FDR <0.15). De estos, un subgrupo de 262 genes presentaba una diferencia de expresión superior a cuatro veces: 176 genes (67,2%) y 86 (32,8%) estaban sobreexpresados y reprimidos, respectivamente, en las líneas sensibles respecto a las resistentes. (Tabla 14). La caracterización funcional de los genes diferencialmente expresados de la firma molecular de respuesta mediante el sistema de análisis DAVID, demostró que las funciones más representadas eran las de **apoptosis** y **muerte celular**.

Resultados

SOBREENPRESADOS EN LÍNEAS SENSIBLES (67.2%)					
GENES	R-S	GENES	R-S	GENES	R-S
<i>GABRE</i>	-5,328	<i>NCK1</i>	-2,898	<i>CCNL1</i>	-2,404
<i>KTN1</i>	-4,856	<i>TFB2M</i>	-2,897	<i>FAM45A</i>	-2,399
<i>CRLF1</i>	-4,683	<i>ZC3H15</i>	-2,885	<i>CLDND1</i>	-2,397
<i>PNN</i>	-4,68	<i>PITX2</i>	-2,883	<i>MTMR15</i>	-2,389
<i>HECTD1</i>	-4,292	<i>NOL11</i>	-2,844	<i>ILDR1</i>	-2,35
<i>IGF2BP3</i>	-4,264	<i>H3F3A</i>	-2,844	<i>NCBP1</i>	-2,321
<i>SFRS11</i>	-4,224	<i>CCDC77</i>	-2,842	<i>TIPIN</i>	-2,315
<i>SLC38A1</i>	-4,211	<i>EIF4G2</i>	-2,812	<i>CAT</i>	-2,31
<i>CCDC14</i>	-3,975	<i>MTIF2</i>	-2,799	<i>HNRPR</i>	-2,307
<i>GCLC</i>	-3,908	<i>WAC</i>	-2,749	<i>CNOT8</i>	-2,304
<i>OSBPL9</i>	-3,875	<i>TMEM123</i>	-2,747	<i>ZC3H11A</i>	-2,303
<i>CLTC</i>	-3,844	<i>SAE2</i>	-2,728	<i>IFNGR1</i>	-2,298
<i>UBE4A</i>	-3,838	<i>PPP2R5E</i>	-2,718	<i>HERC1</i>	-2,251
<i>IDI1</i>	-3,81	<i>SQLE</i>	-2,716	<i>HIST1H3E</i>	-2,244
<i>FANCL</i>	-3,781	<i>RPS8</i>	-2,695	<i>PIK3C2B</i>	-2,227
<i>SMC3</i>	-3,77	<i>FAT</i>	-2,674	<i>TMED10</i>	-2,227
<i>RAD21</i>	-3,736	<i>YLPM1</i>	-2,669	<i>CCNG1</i>	-2,227
<i>ERCC5</i>	-3,726	<i>PDCD4</i>	-2,653	<i>ISOC1</i>	-2,191
<i>DHX36</i>	-3,681	<i>RDX</i>	-2,65	<i>ZCCHC8</i>	-2,181
<i>DEK</i>	-3,67	<i>USP9X</i>	-2,644	<i>CCDC6</i>	-2,179
<i>RGS2</i>	-3,645	<i>PIK3C3</i>	-2,61	<i>ETF1</i>	-2,16
<i>EML4</i>	-3,589	<i>GLI3</i>	-2,605	<i>AFG3L1</i>	-2,152
<i>TOP2B</i>	-3,576	<i>SERPINF1</i>	-2,601	<i>UBE1DC1</i>	-2,15
<i>XPO1</i>	-3,564	<i>NCL</i>	-2,6	<i>HNRPH3</i>	-2,143
<i>KLF9</i>	-3,546	<i>S75896</i>	-2,59	<i>BLM</i>	-2,114
<i>COX1</i>	-3,503	<i>TOP1</i>	-2,583	<i>RNASEN</i>	-2,11
<i>RM1</i>	-3,488	<i>NUP133</i>	-2,566	<i>NUP153</i>	-2,104
<i>NARS</i>	-3,379	<i>RPS6</i>	-2,55	<i>VAV3</i>	-2,094
<i>ITGA6</i>	-3,345	<i>CYTB</i>	-2,549	<i>ARFGEF1</i>	-2,082
<i>DLG7</i>	-3,335	<i>MAFB</i>	-2,527	<i>RAB3GAP1</i>	-2,073
<i>KCTD3</i>	-3,308	<i>EIF1AX</i>	-2,526	<i>TMEM131</i>	-2,073
<i>SLC35E4</i>	-3,303	<i>RPL11</i>	-2,52	<i>GBP6</i>	-2,072
<i>MATR3</i>	-3,245	<i>ATXN2</i>	-2,507	<i>ATP2C1</i>	-2,063
<i>SLTM</i>	-3,23	<i>KPNB1</i>	-2,503	<i>SIN3A</i>	-2,052
<i>GALNAC4S-6ST</i>	-3,222	<i>EIF3S3</i>	-2,484	<i>NASP</i>	-2,05
<i>NR3C1</i>	-3,196	<i>CR603272</i>	-2,484	<i>CCDC45</i>	-2,048
<i>ADNP</i>	-3,183	<i>ZNF131</i>	-2,461	<i>TMEM41B</i>	-2,045
<i>KIF2A</i>	-3,154	<i>GPBP1L1</i>	-2,447	<i>GNAI1</i>	-2,038
<i>LRPPRC</i>	-3,1	<i>BCLAF1</i>	-2,441	<i>SYBL1</i>	-2,038
<i>CCAR1</i>	-3,067	<i>RPS23</i>	-2,435	<i>CAMSAP1L1</i>	-2,034
<i>CTR9</i>	-3,006	<i>MSH6</i>	-2,426	<i>ND2</i>	-2,025
<i>MSH2</i>	-2,983	<i>TCF20</i>	-2,425	<i>RPL26</i>	-2,025
<i>RLF</i>	-2,966	<i>FUSIP1</i>	-2,42	<i>TDG</i>	-2,023
<i>RPS24</i>	-2,939	<i>AMD1</i>	-2,417		
<i>DHX15</i>	-2,936	<i>ATXN10</i>	-2,416		

Resultados

REPRIMIDOS EN LÍNEAS SENSIBLES (32,8%)					
GENES	R-S	GENES	R-S	GENES	R-S
<i>CD70</i>	6,543	<i>HPCAL1</i>	2,593	<i>DOHH</i>	2,199
<i>IL11</i>	3,893	<i>CYBASC3</i>	2,588	<i>DOK1</i>	2,192
<i>KCNN4</i>	3,718	<i>ELOVL1</i>	2,582	<i>ILK</i>	2,184
<i>REEP2</i>	3,479	<i>SDSL</i>	2,54	<i>PMM1</i>	2,177
<i>TMED1</i>	3,419	<i>ASNA1</i>	2,515	<i>NTHL1</i>	2,157
<i>METRN</i>	3,254	<i>GSS</i>	2,5	HRAS	2,156
CTGF	3,249	<i>HYAL2</i>	2,477	<i>ABCA3</i>	2,154
<i>CREB3</i>	3,151	<i>CHCHD6</i>	2,464	<i>CCDC95</i>	2,135
<i>SLC25A11</i>	3,138	<i>AKR7A3</i>	2,406	<i>MANBAL</i>	2,133
<i>CLPB</i>	3,078	<i>AVEN</i>	2,398	<i>FARSLA</i>	2,117
<i>STX5</i>	3,053	<i>TSSC4</i>	2,396	<i>DUSP15</i>	2,116
<i>TP53I13</i>	2,882	<i>R3HCC1</i>	2,381	<i>CTSD</i>	2,091
<i>GEM</i>	2,874	<i>EIF2B4</i>	2,365	<i>RAB11FIP5</i>	2,085
<i>MT1B</i>	2,857	<i>TCEA2</i>	2,365	<i>HAGH</i>	2,069
<i>FNDC4</i>	2,851	<i>LMNB2</i>	2,313	<i>CDKN2D</i>	2,063
<i>TWF2</i>	2,818	<i>CCDC107</i>	2,297	<i>E2F1</i>	2,059
<i>PLAUR</i>	2,731	<i>CCDC124</i>	2,281	<i>ZFAND2B</i>	2,051
<i>GADD45B</i>	2,684	<i>AFARP1</i>	2,277	<i>AP1M1</i>	2,047
<i>CR601567</i>	2,665	<i>CDK5</i>	2,248	<i>APBB1</i>	2,045
<i>CDC34</i>	2,654	<i>BRMS1</i>	2,243	HDAC3	2,038
<i>BCL7C</i>	2,626	<i>PIN1</i>	2,233	<i>ARL2</i>	2,022
<i>SNX17</i>	2,621	<i>GIYD1</i>	2,204	<i>CYB5R2</i>	2,022
<i>DAPK3</i>	2,62	<i>AP4M1</i>	2,2		

Tabla 14. Genes diferencialmente expresados (FDR<0.15) entre líneas resistentes y sensibles no tratadas.

Se han seleccionado algunos de los genes que podrían servir como marcadores de predicción de respuesta a ERL para su validación mediante qRT-PCR. En primer lugar, se seleccionaron cuatro de los genes más desregulados en el perfil de expresión de respuesta a ERL: **HRAS**, **CTGF**, **ERCC5** y **HDAC3**. Estos genes se escogieron además, porque tenían algún tipo de relación descrita con la tumorigénesis:

- **HRAS** es un miembro de la familia de oncogenes Ras, que participan en señalización intracelular. Se ha descrito que la sobreactivación de la ruta Ras/Raf en gliomas se produce por ganancia del número de copias de los genes de la ruta, entre ellos HRAS (Jeuken *et al.*, 2007).

Resultados

- **ERCC5** es una proteína de reparación de DNA en respuesta frente a daños por luz UV. Determinados polimorfismos en este gen se han relacionado con el mayor riesgo de sufrir distintos tipo de cáncer, como de pulmón y de cabeza y cuello (Michiels *et al.*, 2007) o gliomas (Rajamaran *et al.*, 2010).
- **HDAC3** es una histona deacetilasa que modula el ciclo celular y la apoptosis a través del control de TP53. Se ha observado una alta expresión citoplasmática de HDAC3 en astrocitomas (Liby P *et al.*, 2006).
- **CTGF** es una proteína que estimula la angiogénesis y la proliferación celular. Su sobreexpresión en gliomas se ha asociado a un peor pronóstico y a una mayor progresión tumoral, así como a resistencia a quimioterápicos como la TMZ (Yin D *et al.*, 2010).

Los análisis de qRT-PCR confirmaron los resultados obtenidos mediante la utilización de los *microarrays*, mostrando valores de mRNA superiores (*HRAS*, *CTGF*, *HDAC3*) o inferiores (*ERCC5*) en líneas resistentes respecto a las sensibles (Figura 37, 38).

Resultados

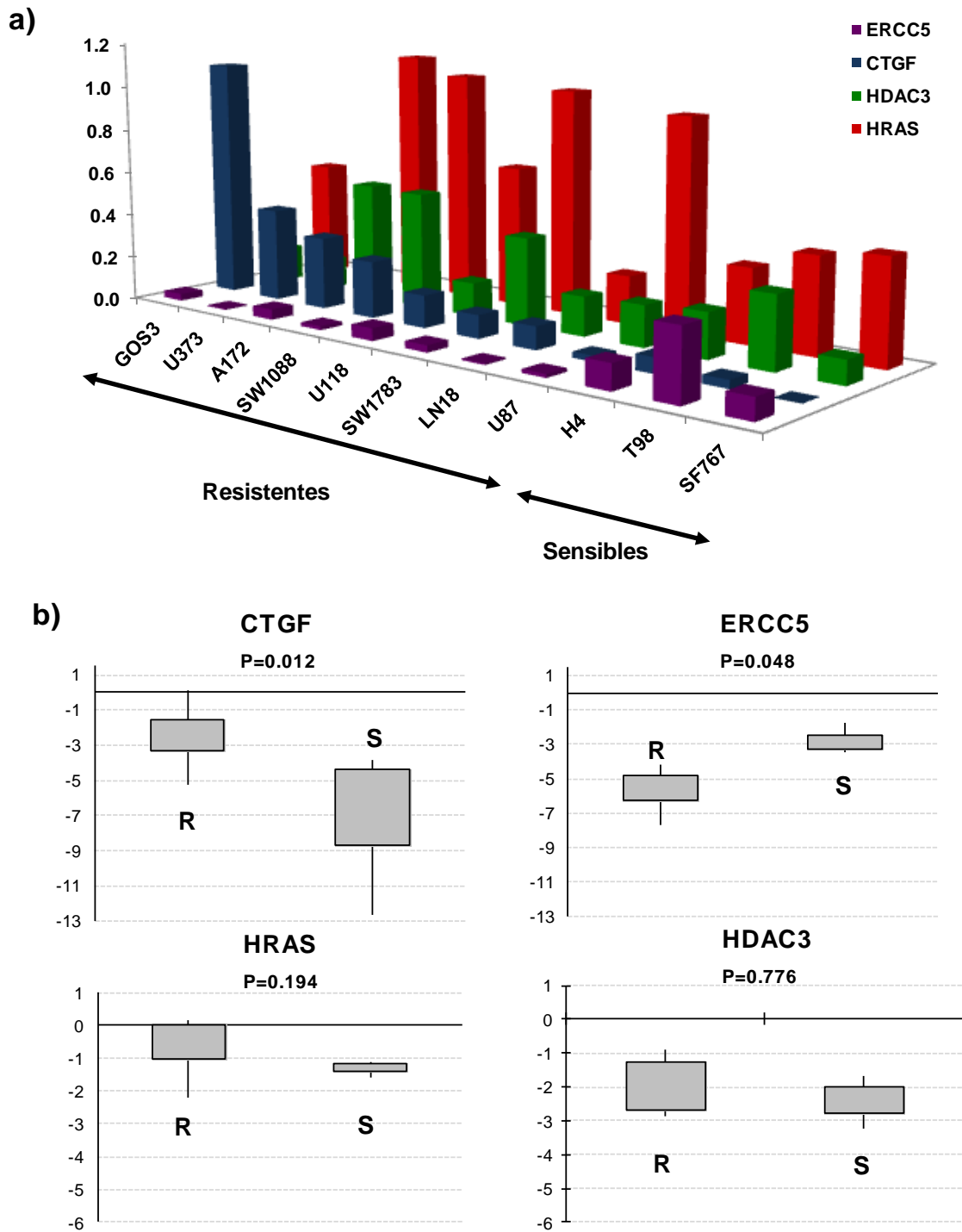


Figura 37 Niveles relativos de la expresión de genes asociados a la respuesta a ERL en líneas celulares de gliomas. Se muestran los resultados de la validación de los genes *HRAS*, *CTGF*, *ERCC5* y *HDAC3* mediante qRT-PCR. **a)** Se presentan los datos de los niveles de mRNA para cada gen y cada línea en relación al control endógeno *GAPDH*, expresado en unidades arbitrarias. **b)** Se representan los valores medios de mRNA de cada gen en cada grupo (R, resistente; S, sensible) en relación al control endógeno (*GAPDH*). Las cajas representan los valores de expresión (log2) de los percentiles 25 y 75, y las líneas verticales indican el valor máximo y el mínimo.

Resultados

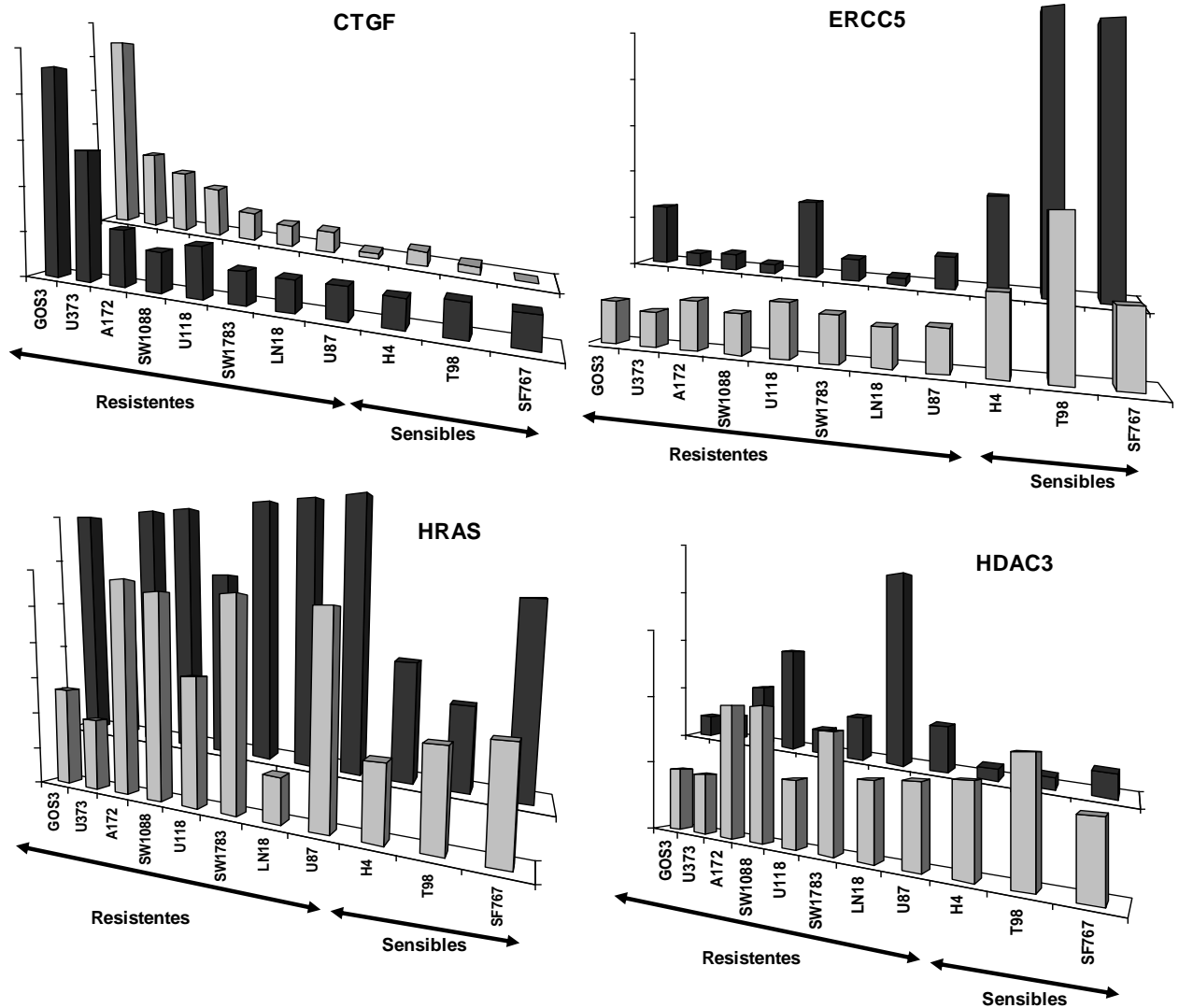


Figura 38. Comparativa de los niveles de mRNA de genes asociados a respuesta a ERL determinados mediante análisis de *microarrays* y qRT-PCR. Ambos métodos mostraron niveles de mRNA más altos (*HRAS*, *HDAC3*, *CTGF*) o más bajos (*ERCC5*) en las líneas resistentes que en las sensibles. Los datos se muestran en unidades arbitrarias.

Además, para determinar las rutas celulares que diferenciaban la resistencia/sensibilidad a ERL se analizaron los datos de expresión de líneas celulares no tratadas con el programa *Gene Set Enrichment Analysis* (*GSEA*). Este análisis reveló que, tras la estimulación del EGFR con el factor EGF, **la ruta PI3K** estaba diferencialmente expresada entre ambos grupos de manera significativa ($P < 0,05$). En concreto, las líneas sensibles mostraban una sobreexpresión de los genes de esta ruta en comparación con la expresión de dichos genes en las líneas resistentes (Figura 39). El análisis de los genes de la ruta PI3K en particular, mostró **diez genes diferencialmente expresados**

entre las líneas sensibles y resistentes (FDR < 0.05) tras la estimulación del EGFR (*PIK3R3*, *E2F1*, *PIK3C3*, *PPP2R5C*, *BAD*, *PPP2R5E*, *GSK3A*, *MAPK8IP1*, *PIK3C2B*, *BCL2*).

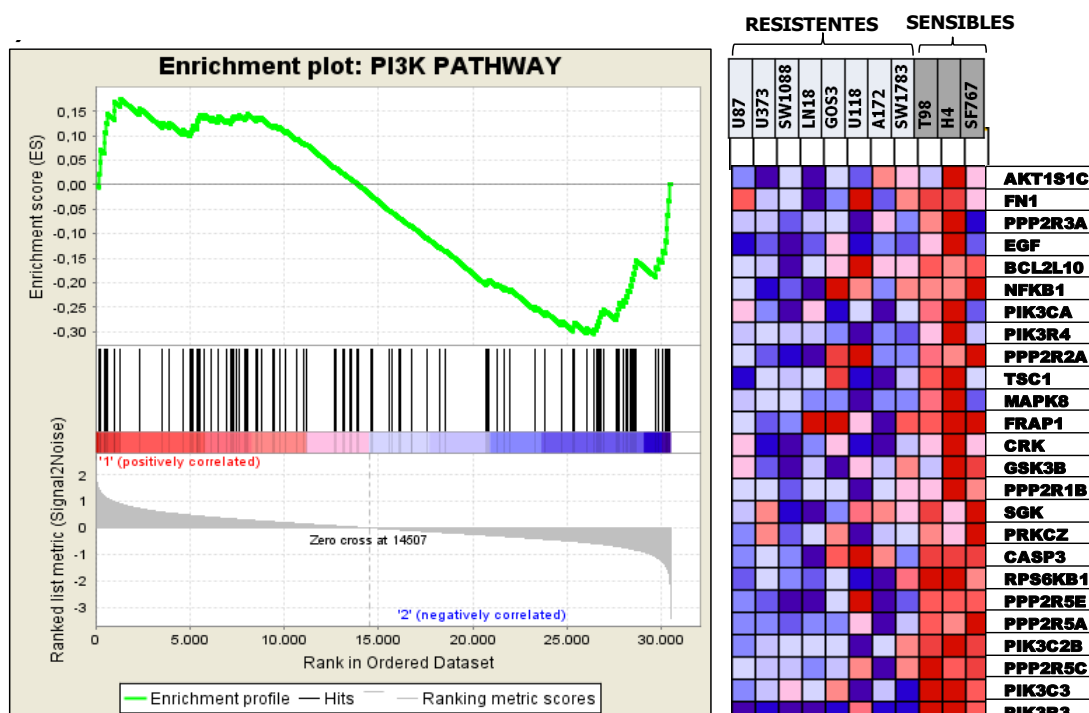


Figura 39. Resultados de GSEA donde se muestra que la ruta PI3K está diferencialmente expresada entre resistentes y sensibles. Gráfica de enriquecimiento de los genes de la ruta PI3K en líneas sensibles tras estimulación del EGFR. En la parte derecha se muestran los genes de la ruta PI3K que fueron significativos. Los cuadrados rojos muestran expresión más alta y los azules, más baja.

2.6 ESTUDIO DEL EFECTO DEL ERL SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

2.6.1 Efecto del ERL sobre los genes de la firma molecular de respuesta

El análisis del efecto del tratamiento con ERL sobre el subgrupo de 262 genes que formaban la firma molecular de respuesta, mostró que las líneas sensibles y resistentes, además de presentar distintos perfiles de expresión, también expresaban distintos patrones de respuesta génica al aplicar el tratamiento con ERL (Figura 40). Es interesante resaltar que las líneas sensibles y la mayor parte de las líneas resistentes (5/8) no cambiaban el patrón de expresión de estos genes al tratarlas con ERL. Sin embargo, tres de las líneas resistentes (LN18, SW1088, A172), que mostraban un perfil génico

Resultados

opuesto al de las sensibles, invirtieron completamente su patrón de expresión tras el tratamiento con ERL (Figura 40). Precisamente estas tres líneas celulares no se veían afectadas en lo que se refiere a la inhibición de P-AKT y P-ERK tras el tratamiento con ERL.

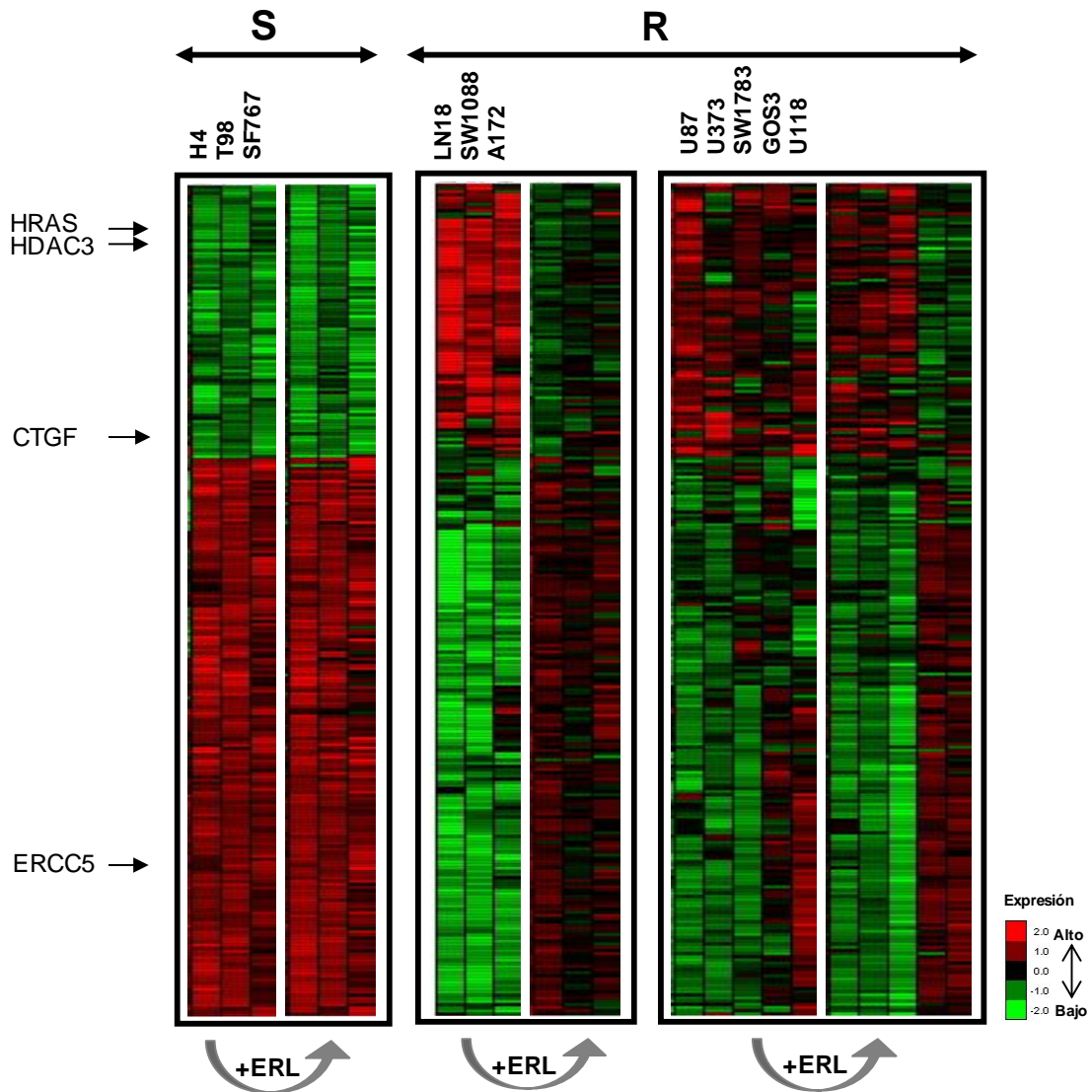


Figura 40. Clúster de expresión de los 262 genes más diferencialmente expresados, antes y después del tratamiento con ERL. Observamos que las 3 líneas sensibles y 5 de las resistentes (derecha) no alteran significativamente su expresión con el tratamiento. Tres de las 8 líneas resistentes (LN18, SW1088 y A172) cambian la expresión por completo tras el tratamiento, haciendo que aquellos genes que estaban sobreexpresados se repriman y viceversa.

Resultados

El análisis realizado mediante GSEA para comprobar qué rutas celulares diferenciaban a ambos grupos de líneas celulares tras el tratamiento con ERL mostró una sobreexpresión de los genes de **apoptosis** y de la **ruta PI3K en líneas las resistentes respecto a las sensibles tras el tratamiento con ERL** ($P < 0.01$) (Figura 41). Como era de esperar, estos resultados confirman que la ruta más afectada por el tratamiento con ERL es la ruta PI3K.

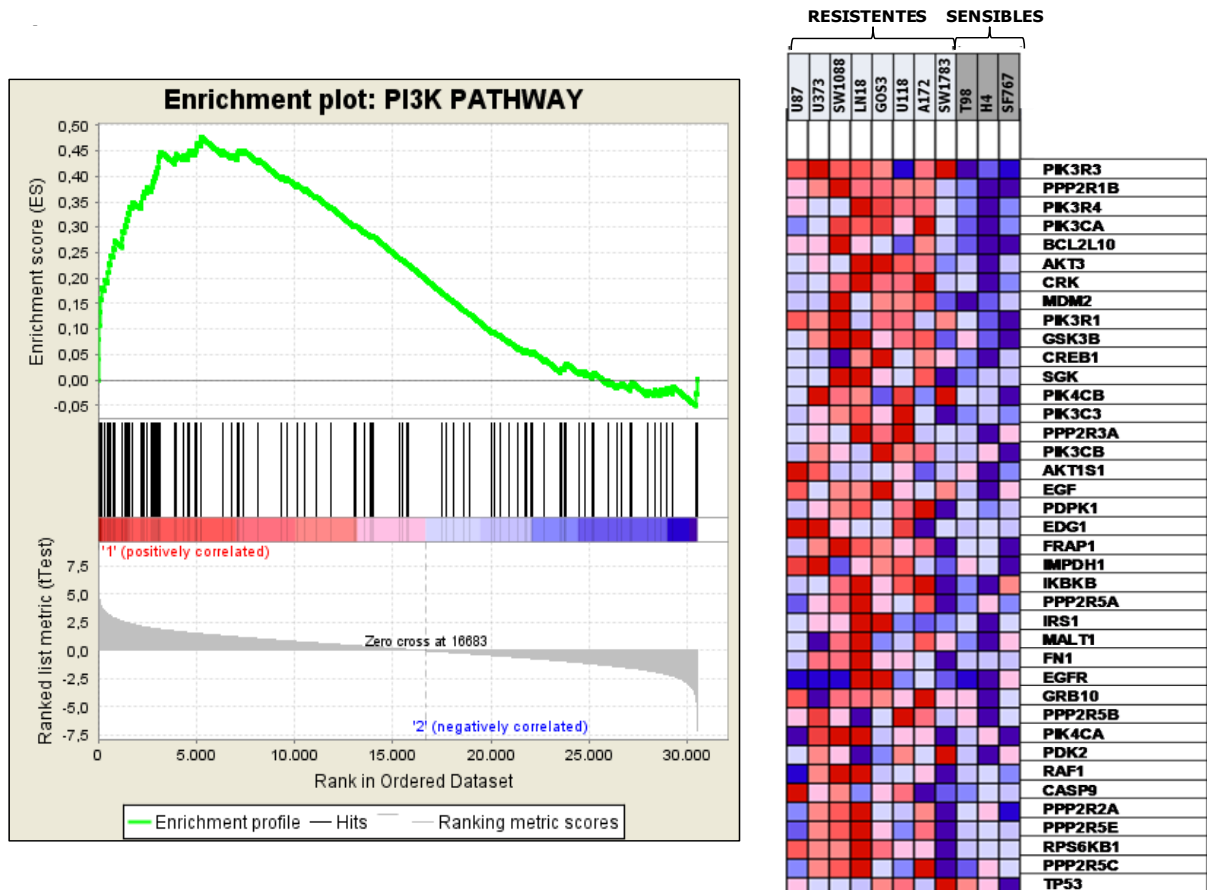


Figura 41. Resultados de GSEA donde se muestra que la ruta PI3K está diferencialmente expresada entre las líneas resistentes y sensibles. Gráfica de enriquecimiento de los genes de la PI3K en líneas resistentes tras tratamientos con ERL y estimulación del EGFR. Se muestran los genes significativos dentro de los genes de la ruta PI3K. Los cuadrados rojos muestran expresión más alta y los azules, más baja.

En particular, al analizar los diez genes de la ruta PI3K diferencialmente expresados entre las líneas sensibles y resistentes, se observó que el tratamiento con ERL causaba un cambio de expresión en dos de estos genes: **PIK3R3** y **E2F1**. La expresión de **PIK3R3**, que era significativamente superior en sensibles que en resistentes antes del tratamiento, reducía su expresión tras

Resultados

el tratamiento sólo en el grupo de las líneas sensibles (Figura 42a; Figura 42b). Por el contrario, el gen *E2F1*, que tenía una expresión más alta en resistentes que en sensibles antes del tratamiento, redujo su expresión con el tratamiento en ambos grupos (Figura 42 a,b). Estos resultados sugerirían un papel importante de *E2F1* en la respuesta al ERL.

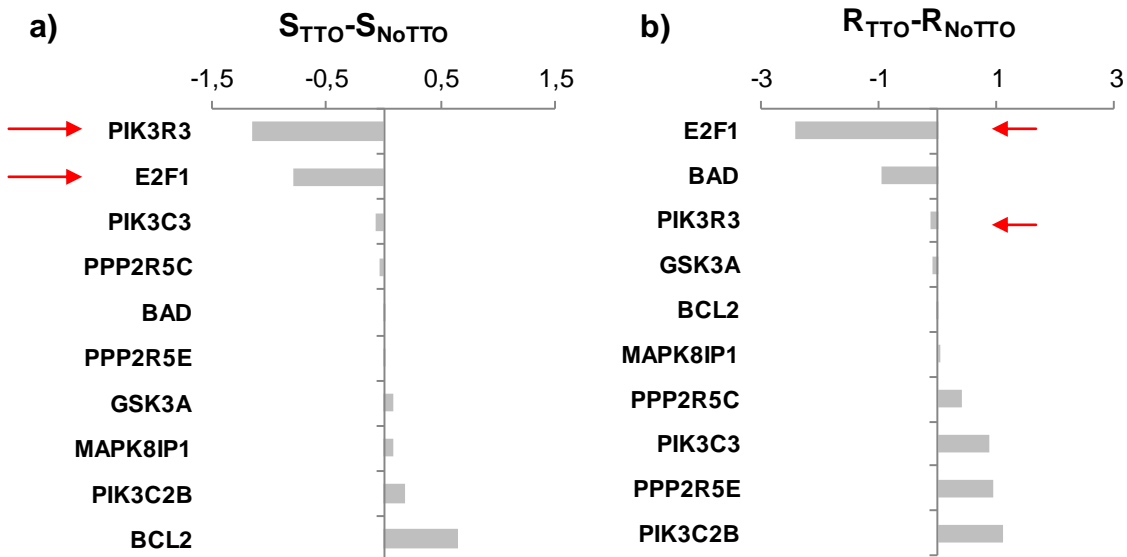


Figura 42. Representación del cambio de expresión tras el tratamiento con erlotinib en los diez genes de la ruta PI3K más diferencialmente expresados entre líneas resistentes y sensibles (FDR<0.05). a) Cambio en la expresión génica en las líneas sensibles. Se observa la disminución de la expresión de *PIK3R3* y de *E2F1* en este grupo. b) Cambio en la expresión génica en las líneas resistentes. Se observa la reducción de expresión de *E2F1* en las líneas resistentes. Sin embargo, apenas se observa cambio de expresión de *PIK3R3* en este grupo.

2.6.2 Comparación de los perfiles de expresión génica.

Para comprobar qué genes se veían más afectados por el tratamiento con ERL, se compararon los perfiles de expresión génica de las once líneas celulares (sin distinción entre resistentes y sensibles) antes y después del tratamiento. Este análisis demostró que había 44 genes diferencialmente expresados (FDR<0.15) al comparar la expresión génica de las líneas celulares antes y después del tratamiento (Tabla 15).

Resultados

AUMENTAN CON EL TRATAMIENTO			DISMINUYEN CON EL TRATAMIENTO		
GEN	FDR	TTO/NoTTO	GEN	FDR	TTO/NoTTO
GAS5	0,008	1,595	BIRC5	0,011	-1,04
<i>PSAT1</i>	0,09	1,976	PLK1	0,011	-1,596
<i>SLC25A33</i>	0,09	0,979	<i>PTTG1</i>	0,09	-0,838
<i>SHOX</i>	0,09	0,301	<i>TUBB2C</i>	0,09	-1,051
<i>ASNS</i>	0,102	1,159	<i>UBE2T</i>	0,09	-1,081
<i>DKFZp547E087</i>	0,102	0,251	<i>NY-SAR-48</i>	0,09	-1,129
<i>ZFYVE20</i>	0,103	0,333	<i>PTTG2</i>	0,09	-1,342
<i>DDIT3</i>	0,123	2,481	<i>CDCA3</i>	0,09	-1,918
<i>CBS</i>	0,123	1,688	<i>CDC20</i>	0,09	-2,028
<i>ENTHD1</i>	0,123	0,285	<i>HIC1</i>	0,092	-0,433
<i>BQ014494</i>	0,123	0,217	<i>PSRC1</i>	0,092	-1,771
<i>PCK2</i>	0,145	1,547	<i>SPBC25</i>	0,092	-2,41
<i>MKNK2</i>	0,145	1,061	<i>UBE2C</i>	0,103	-1,166
<i>ProSAPiP1</i>	0,145	0,243	<i>S100A13</i>	0,123	-0,685
<i>TRIB3</i>	0,147	3,046	<i>TUBA3</i>	0,123	-0,956
<i>ATF3</i>	0,147	1,226	<i>TK1</i>	0,123	-1,04
			<i>CDCA8</i>	0,123	-1,065
			<i>AI608782</i>	0,123	-3,447
			<i>GINS2</i>	0,125	-0,698
			<i>LIG1</i>	0,125	-1,261
			<i>PKM2</i>	0,138	-0,735
			<i>TUBB</i>	0,143	-0,683
			<i>AV737563</i>	0,145	-2,343
			<i>KDELRL1</i>	0,147	-0,8
			<i>MYBPC3</i>	0,148	-0,479
			<i>UBE2S</i>	0,148	-0,938
			<i>SPBC24</i>	0,148	-2,426
			<i>TUBB4</i>	0,149	-1,097

Tabla 15. Genes diferencialmente expresados entre líneas celulares de gliomas tratadas con ERL y sin tratar (FDR<0.15). En la tabla se recogen los genes que aumentan su expresión con el tratamiento (izquierda) y los genes que disminuyen su expresión después del tratamiento (derecha). Junto al símbolo de cada gen se incluye el valor de FDR obtenido y el cambio en la expresión tras el tratamiento referido al valor sin tratar.

Tres de estos genes presentaban una mayor significación (FDR<0.05) tanto en líneas sensibles como en resistentes: **GAS5**, **PLK1** y **BIRC5**. Mientras que **GAS5** estaba sobreexpresado después del tratamiento, **PLK1** y **BIRC5** estaban reprimidos tras la inhibición del receptor EGFR (Tabla 15). Se sabe que GAS5 y BIRC5 actúan como promotor o inhibidor de la apoptosis, respectivamente, mientras que PLK1 activa el ciclo celular.

Resultados

El cambio de expresión de BIRC5 en la respuesta a ERL fue confirmado mediante análisis de ICW, que demostraba una disminución en la expresión de la proteína codificada por *BIRC5*, la survivina, tras el tratamiento (Figura 43).

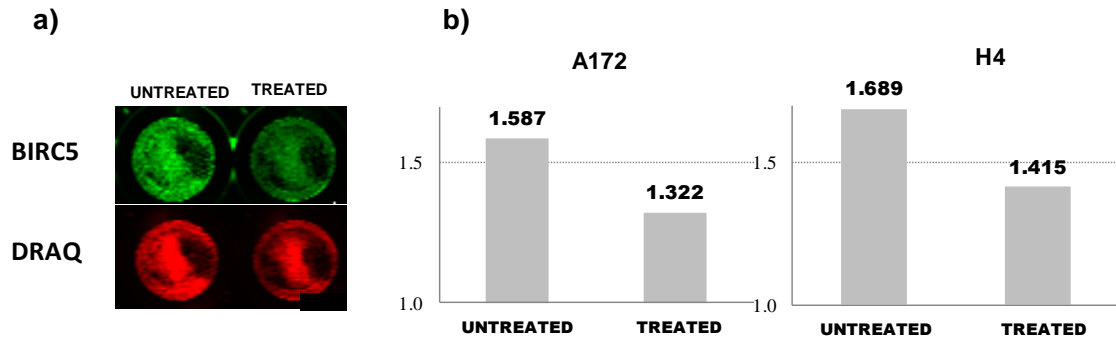
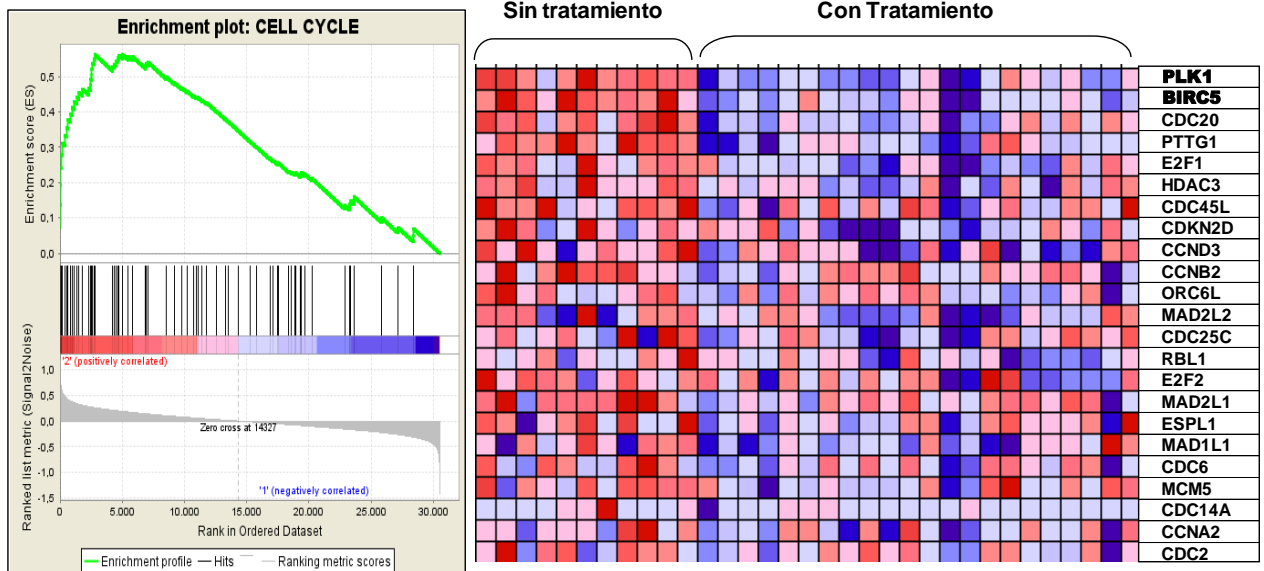


Figura 43. Resultados de la cuantificación de la expresión de survivina (BIRC5) antes y después del tratamiento con ERL. a) Imagen de ICW para la línea celular sensible H4, se cuantifica la expresión de survivina (verde) en relación a la proporción de células del experimento marcadas mediante tinción nuclear con DRAQ5 (rojo). **b)** Cuantificación de survivina en dos líneas celulares representativas, A172 (resistente) y H4 (sensible) (expresado en unidades arbitrarias). Se observa una disminución en su expresión tras el tratamiento confirmando los resultados de expresión génica.

Por otra parte, el análisis funcional mediante GSEA entre líneas tratadas y no tratadas, demostró que había dos rutas reprimidas tras el tratamiento: la ruta del **ciclo celular** y la de la **ubiquitina** (FDR<0.1) (Figura 44). Estos resultados son concordantes con los obtenidos previamente en los ensayos de citometría de flujo (apartado 2.3 de resultados), donde se demostró que ERL detenía el ciclo celular en las líneas celulares de gliomas, aumentando el porcentaje de células en la fase G1 tras el tratamiento.

Resultados

a)



b)

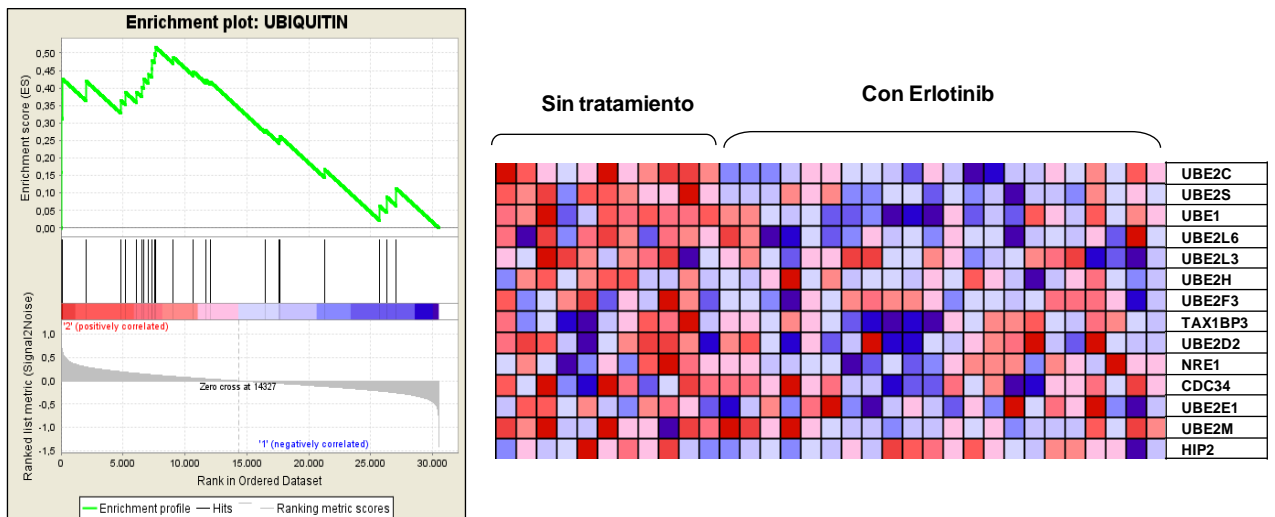


Figura 44. Resultados de GSEA para el análisis de las rutas significativamente afectadas tras el tratamiento con erlotinib (FDR<0.15). a) Gráfica de enriquecimiento de los genes de ciclo celular que están diferencialmente expresados antes y después del tratamiento. b) Gráfica de enriquecimiento de los genes de la ruta de la ubiquitina que están diferencialmente expresados antes y después del tratamiento. Los cuadrados rojos muestran expresión más alta y los azules, más baja.

Gefitinib

2.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GEFITINIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Los resultados de viabilidad celular para el tratamiento con gefitinib (GEF) mostraron que todas las líneas celulares de nuestro estudio eran resistentes a este inhibidor (Figura 45). Además, al contrario que con ERL, las líneas que expresaban PTEN estaban entre las más resistentes al tratamiento con GEF. No se observaba relación con los otros marcadores estudiados (*EGFR*, *TP53*, *PI3KCA*, *CDKN2C*).

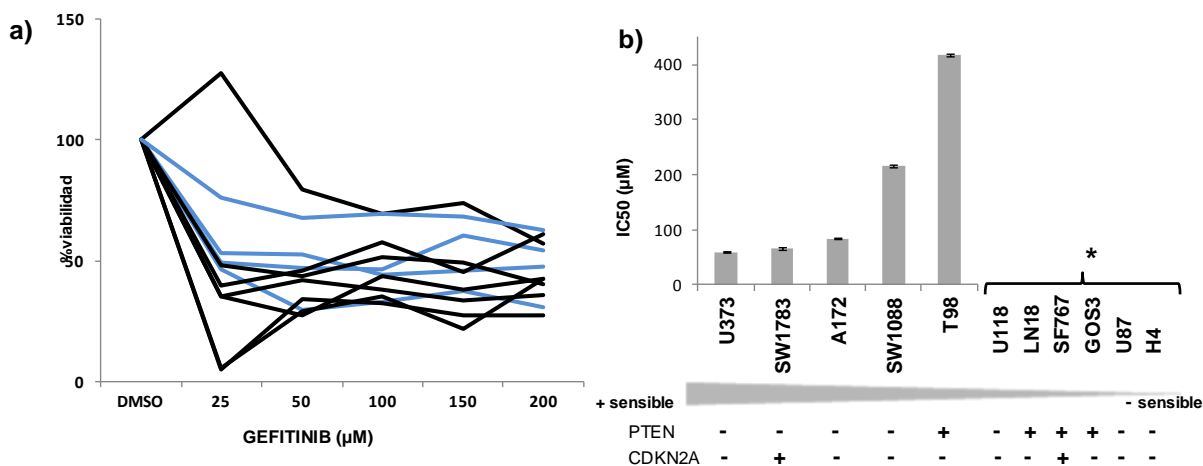


Figura 45 Resultados de los ensayos de viabilidad celular para Gefitinib a) Gráfica de viabilidad celular. Las líneas representadas en azul muestran las gráficas de viabilidad a las siguientes concentraciones de gefitinib: 25, 50, 100, 200, 300 µM y las líneas en negro, a las concentraciones que indica el eje. **b)** Representación de los valores de IC₅₀ ordenados de menor (más sensible) a mayor (menos sensible). Todas las líneas son consideradas como resistentes, ya que tienen valores muy elevados de IC₅₀ (*: Valor IC₅₀ > 500 µM).

A pesar de que los resultados de viabilidad celular con GEF parecían indicar ausencia de respuesta en nuestras líneas celulares, estudiamos en profundidad el efecto del inhibidor sobre la biología celular (ruta del EGFR, ciclo celular y apoptosis). Para estudios posteriores se utilizó una concentración de 10 µM, de acuerdo con la literatura previa en líneas celulares (Costa *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2011).

2.8 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GEFITINIB SOBRE EL CICLO CELULAR

El análisis del ciclo celular se realizó mediante la técnica de citometría de flujo en 5 líneas celulares de gliomas (A172, U118, SF767, GOS3 y T98), todas ellas con una baja sensibilidad a GEF (valor de IC_{50} superior a $50 \mu M$). Por un lado, se observó que estas líneas presentaban distinto porcentaje de células en fase G1 al estimular el receptor EGFR. Esto podría indicar que las respuestas frente a la activación de la ruta serían diferentes en estas líneas, con distintos grados de activación entre ellas (la disminución de células en fase G1 indica que hay más células en división, por tanto, cuanto menos células haya en G1, mayor activación del ciclo celular habrá) (Figura 46a). A172 es la línea que más porcentaje de células en fase G1 presenta y por tanto la que tiene menor cantidad de células en división. Esto indica que la estimulación con EGF, activa menos el ciclo celular en la línea A172 que en las otras.

Por otro lado, tras el tratamiento con GEF durante 48 horas a una concentración $10 \mu M$, se observó que en todas las líneas celulares se producía un incremento en la proporción de células en fase G1 (a costa de un descenso en la proporción de células en fase S; Figura 46b). **Esto indica que el tratamiento con GEF produce detención del ciclo celular** en todas las líneas celulares analizadas. El incremento es mínimo para A172 (sólo un 5%), siendo en la que menos se activa el ciclo tras la adición de EGF (Figura 46a).

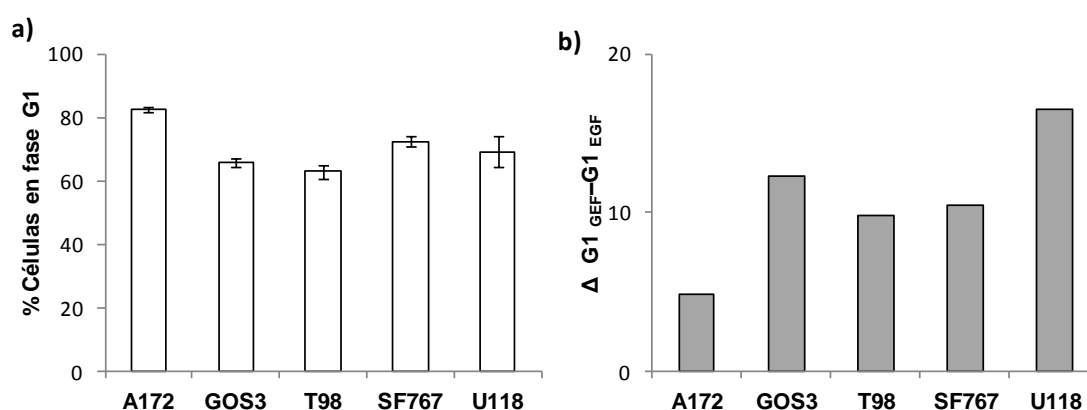


Figura 46. Resultados del estudio del ciclo celular analizado por citometría de flujo. a) En la gráfica se representan los porcentajes de células en fase G1 para las 5 líneas celulares analizadas tras la estimulación de la ruta con EGF. **b)** Incremento (%) de células en fase G1 tras tratamiento con GEF (% células en G1 con tratamiento - % células en G1 sin tratamiento).

2.9 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GEFITINIB SOBRE LA APOPTOSIS

En las mismas cinco líneas celulares se realizó el estudio de apoptosis también mediante citometría de flujo. De éstas, sólo U118 y SF767 mostraron un aumento en el porcentaje de células en apoptosis tras el tratamiento con 10 μ M GEF durante 48 horas (Figura 47), mientras que apenas se observaron cambios en las otras tres líneas estudiadas. Cabe resaltar que los marcadores moleculares analizados en relación con la ruta (PTEN, EGFR) no se encontraron correlacionados con la apoptosis ya que S767 expresa PTEN mientras que U118 es deficiente para la proteína y en ningún caso, estas líneas presentaron mutaciones puntuales en EGFR.

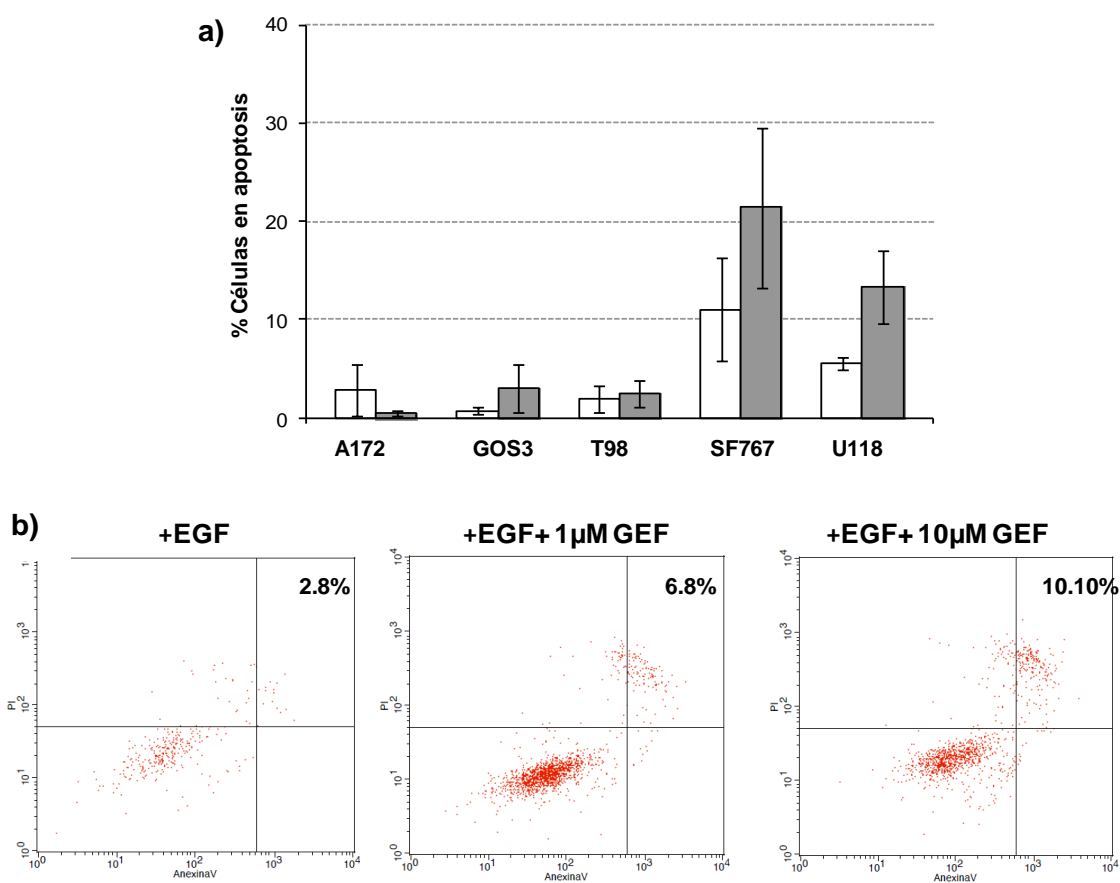


Figura 47. Resultados del análisis de apoptosis tras el tratamiento con GEF (10 μ M; 48 horas) analizado por citometría de flujo. a) De las cinco líneas estudiadas, SF767 y U118, muestran un aumento en el porcentaje de células en apoptosis tras el tratamiento con GEF (barra gris) respecto a las células no tratadas (barra blanca), en ambos casos ($n=3$, media \pm error). **b)** Gráficos obtenidos en el citómetro de flujo para el análisis de la apoptosis para la línea SF767. El cuadrante inferior izquierdo muestra la población de células vivas, mientras que el cuadrante superior derecho, muestra la población de células en apoptosis. Se indica el % de células en apoptosis, observándose un aumento de la apoptosis con el tratamiento a las concentraciones de 1 μ M (panel central) y 10 μ M de GEF (panel de la derecha).

2.10 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GEFITINIB SOBRE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

2.10.1 Efecto sobre las rutas MAPK/ERK y PI3K/AKT

El efecto de GEF sobre la señalización intracelular se estudió en las mismas cinco líneas celulares de gliomas. Pudo observarse que **la mayor inhibición de ambas rutas, se produjo en las dos líneas en las que GEF causaba apoptosis** (SF767, U118) (Tabla 16, Figura 48). Por otro lado, y como era de esperar, la línea A172, que no respondía al GEF ni en la detención del ciclo celular ni en el incremento de la apoptosis, tampoco mostró inhibición de la ruta. Además, en las otras dos líneas en las que sí se detenía el ciclo celular pero no había apoptosis (T98 y GOS3), se observó que había inhibición de la ruta PI3K (por la disminución de los niveles de P-AKT), o de ambas rutas, PI3K y ERK (al disminuir tanto P-AKT como P-ERK). Esta inhibición, sin embargo, era siempre menor que para las líneas en las que sí había apoptosis (Figura 48).

En definitiva, a pesar de que los ensayos de viabilidad celular indicaban ausencia de respuesta a GEF en las líneas celulares derivadas de gliomas, el estudio en profundidad posterior indicó que el tratamiento con GEF inducía detención del ciclo celular en todas las líneas celulares analizadas y, además, inducía apoptosis en aquellas líneas donde el tratamiento más inhibía la fosforilación de AKT y ERK. Esto podría indicar que, en este caso, la técnica del MTT no es la más concluyente para determinar la sensibilidad del tratamiento con GEF en las líneas celulares de gliomas.

Resultados

	APOPTOSIS	P-AKT	P-ERK	PTEN
A172	NO	=	=	-
GOS3	NO	↓	↓	+
T98	NO	↓	=	+
SF767	SI	↓	↓	+
U118	SI	↓	↓	-

Tabla 16. Resumen del efecto del tratamiento con GEF sobre la apoptosis y la fosforilación de P-AKT y P-ERK en líneas celulares de gliomas. (+ ó -: expresión o no de PTEN; ↓: disminución de proteína fosforilada; = : no disminución).

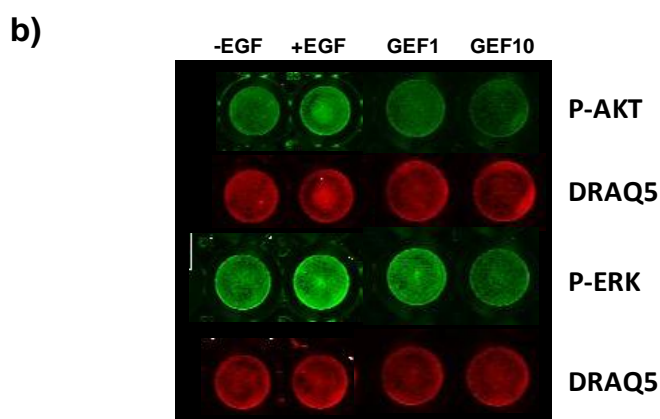
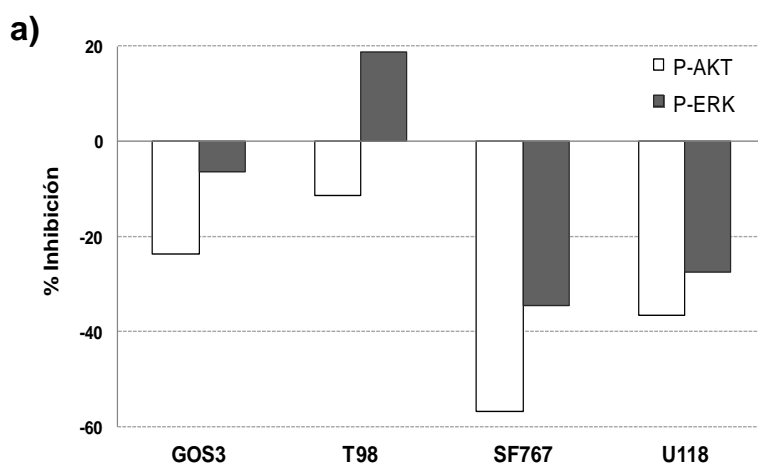


Figura 48. a) Gráfica de porcentaje de inhibición de AKT y ERK en líneas celulares de gliomas. Se representa el porcentaje de disminución de proteína fosforilada tras el tratamiento y estimulación del EGFR, con respecto a la proteína fosforilada antes del tratamiento y sin estimulación de la ruta. (No se representa A172, porque no presenta inhibición ni en AKT ni en ERK). b) ICW para una línea celular representativa, SF767. Se observa que el tratamiento con 10 μ M de GEF disminuye la intensidad de la señal de P-ERK y P-AKT (verde) respecto al pocillo basal (-EGF) y al estimulado con EGF (+EGF). DRAQ5 es utilizado para normalizar la señal.

2.10.2 Efecto sobre la proteína proapoptótica BIM

Estudios previos con líneas de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) sensibles a gefitinib, muestran que la inducción de la proteína proapoptótica, **BIM**, es esencial para que se produzca apoptosis mediada por este inhibidor (Costa *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2011). Para probar si esto ocurría también en líneas celulares de gliomas, estudiamos la expresión de BIM en relación con el tratamiento con GEF en estas líneas.

Observamos que las líneas celulares de gliomas que más apoptosis sufrían con el tratamiento (SF767 y U118) eran las que mayor cantidad de BIM expresaban de manera inicial, esto es, tras la estimulación del receptor (Figura 46). Tras el tratamiento con GEF, se observó un ligero aumento de la expresión proteica de BIM por ICW, comparando con los niveles basales, sobre todo en SF767, que también era la que más apoptosis tenía (Figura 49 a). Sin embargo, apenas hubo cambio expresión de BIM en las otras tres líneas, A172, GOS3 y T98 (Figura 49 b).

Por otro lado, habíamos observado que en las líneas que sufrían apoptosis tras el tratamiento con GEF, SF767 y U118, se producía una inhibición en las dos rutas, AKT y ERK. En el caso de GOS3, que también presentaba inhibición de ambas rutas pero no sufría apoptosis, observamos que tenía un nivel basal de BIM más bajo y que éste no aumentaba con el tratamiento (Figura 49).

Resultados

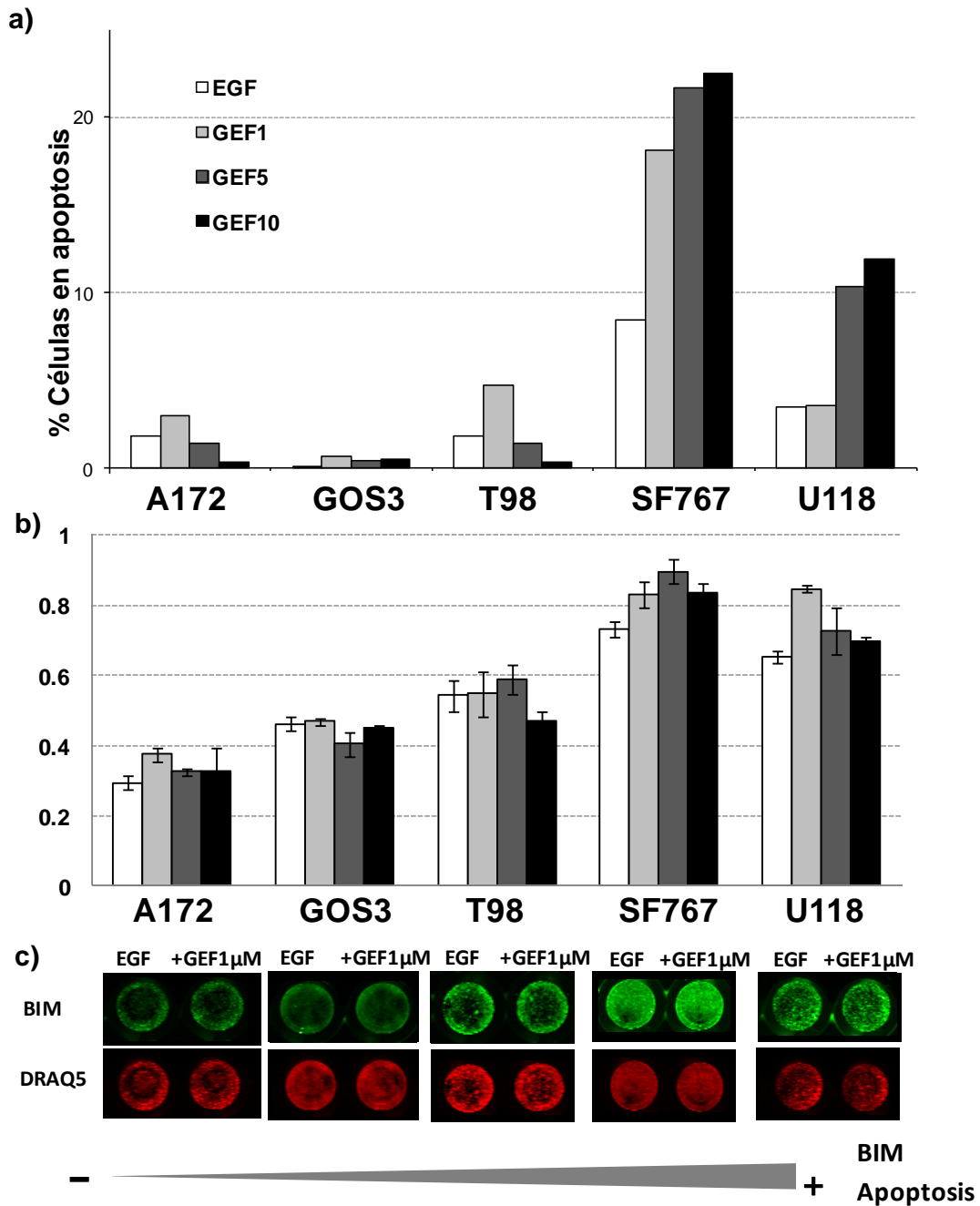


Figura 49. Efecto del tratamiento con gefitinib en líneas celulares de gliomas. a) Porcentaje de células en apoptosis tras el tratamiento con 0 (EGF), 1 μ M (GEF1), 5 μ M (GEF5), y 10 μ M (GEF10) de gefitinib (48h) con estimulación con EGF. **b)** Cuantificación de la expresión de BIM, normalizado respecto a DRAQ5, con el tratamiento a las concentraciones de GEF anteriores (24h) (media \pm error; n=3). Se expresa en unidades arbitrarias. **c)** Imagen de ICW para el marcaje de las cinco líneas celulares con el anticuerpo frente a BIM (verde) y el marcador de núcleos celulares (DRAQ5), tras tratamiento con 1 μ M de GEF durante 24 horas (+GEF1 μ M) o sin tratamiento (EGF), tras estimulación del EGFR en ambos casos. Se observa mayor expresión en general de BIM, en aquellas líneas que más apoptosis sufren a consecuencia del tratamiento con GEF.

2.10.3 Efecto de la inhibición de PI3K en la expresión de BIM

Estudios previos sugerían diferentes mecanismos de activación de BIM en líneas celulares sensibles a TKIs (Gong *et al.*, 2007, Handrick *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, tratamos de comprobar si la inhibición de AKT por sí sola, inducía la expresión de BIM. Para ello se estudió el efecto del tratamiento con un inhibidor específico de la PI3K, LY294002, sobre la línea SF767. Se trató el cultivo con una concentración de 10 μ M del inhibidor y se midieron los niveles de P-AKT, P-ERK y BIM mediante ICW, tras el tratamiento (Figura 50).

Como era de esperar, el inhibidor afectó únicamente a la fosforilación de AKT y no a ERK. Sin embargo, esto no hizo aumentar los niveles de expresión de BIM. Estos resultados sugieren que el incremento de BIM en líneas celulares de gliomas no es debido sólo a la inhibición de AKT, sino a la inhibición conjunta las rutas de PI3K y MAPK, o tal vez, a otros efectos todavía no definidos causados por el tratamiento con gefitinib.

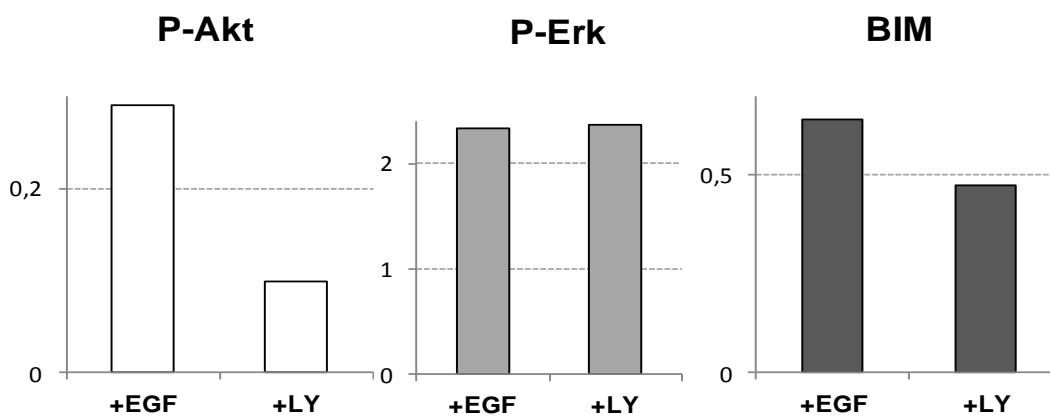


Figura 50. Cuantificación mediante ICW de P-AKT, P-ERK y BIM tras el tratamiento con LY294002 en la línea celular SF767. Se observa que el tratamiento disminuye la fosforilación de AKT pero no de ERK. BIM disminuye con el tratamiento con LY294002 en la línea SF767.

LY294002

2.11. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE PI3K, LY294002, SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Los resultados de viabilidad celular con el inhibidor de PI3K, LY294002 (LY) en las líneas celulares de gliomas mostraban dos grupos claramente diferenciados (a una concentración de inhibidor de 10 μM). Por un lado, las **líneas sensibles**, que eran aquellas que tenían una IC_{50} menor de 10 μM (H4 y T98) y por otro, las **líneas resistentes**, que presentan una IC_{50} mayor de 10 μM (el resto de líneas) (Figura 51).

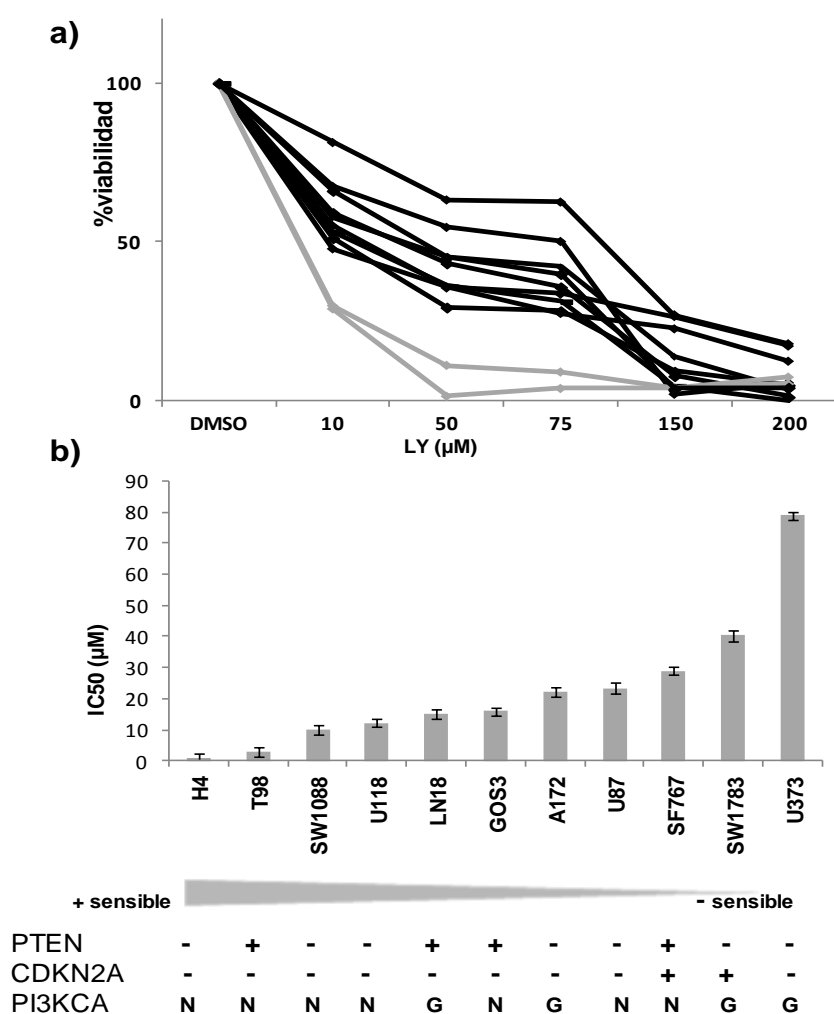


Figura 51 Resultados de los ensayos de viabilidad celular para LY294002 a) Gráfica de viabilidad celular. En negro se representan los datos de las líneas consideradas resistentes y en gris las consideradas como sensibles según los datos de IC_{50} (media \pm error estándar; $n=3$). b) Representación de los valores de IC_{50} ordenados de menor (más sensible) a mayor (menos sensible) y de los datos de expresión de los marcadores moleculares (-: no hay expresión de la proteína; +: expresión de la proteína; G: ganancia génica; A: amplificación; N: normal).

Resultados

En cuanto a la relación de los marcadores moleculares analizados con la resistencia o sensibilidad a LY, se observa que la mayoría de las líneas resistentes (6/9) no expresaban PTEN. Curiosamente, las únicas dos líneas que conservaban *CDKN2A* se encontraban entre las más resistentes a LY, es decir, entre las que mayor IC_{50} presentaban. No se observaba ninguna relación con los otros marcadores estudiados (*CDKN2C*, *EGFR*, *TP53*) con la respuesta a LY.

Como se mencionó anteriormente, cuatro de las líneas celulares presentaban ganancia del gen que codifica para la subunidad PIK3CA de PI3K, coincidiendo que las cuatro líneas son resistentes al tratamiento con LY (Figura 51). Además, dos de las líneas con mayor IC_{50} para LY (SW1783 y U373, Figura 51) presentaban ganancias en este gen. Es de esperar que una sobreexpresión de P3IK, que podría derivarse de la ganancia génica observada, sea un obstáculo para el tratamiento con LY, ya que al estar aumentada la dosis génica de la diana de este fármaco, podría necesitarse una mayor concentración para conseguir su inhibición. En este sentido, la línea U373 es la más resistente al tratamiento con LY y también la que mayor número de copias de *PIK3CA* presentaba según el estudio de Kita *et al.* (2007).

Discusión

La presente tesis doctoral se realizó con el objetivo de identificar los marcadores moleculares y de expresión génica característicos de la respuesta al tratamiento con inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT en líneas celulares derivadas de gliomas.

Para conseguir este objetivo, en primer lugar, se realizó la caracterización molecular de las líneas celulares del estudio y, posteriormente, se estudió su respuesta frente al tratamiento con cuatro inhibidores de EGFR (gefitinib, erlotinib, temsirolimus y LY294002). Además, para los inhibidores tirosina quinasa, erlotinib y gefitinib, se estudió el efecto sobre la apoptosis, el ciclo celular y la señalización intracelular. Por último, se analizaron los cambios en la expresión génica en las mismas líneas debidos al tratamiento con ERL, identificando aquellas dianas o marcadores moleculares que pueden estar asociados a la respuesta a este inhibidor.

1. Las líneas celulares derivadas de gliomas tienen más pérdidas que ganancias génicas y no mantienen las amplificaciones de los tumores de los que proceden

En esta tesis doctoral se realizó la caracterización molecular completa de once líneas celulares derivadas de gliomas habitualmente utilizadas en experimentación, mediante distintas técnicas de Biología Molecular.

El análisis general demostró que las líneas celulares de glioma mostraban las principales pérdidas génicas que son típicas de GBM, pero **no se observaban las ganancias de alto nivel** que suelen encontrarse en este tipo de tumores. Las líneas celulares conservaban las pérdidas y/o alteraciones más frecuentes en GBM, como pérdida de *PTEN* y de *CDKN2A/CDKN2B*, ganancia de 7q (*EGFR*) y mutación de *TP53*. Sin embargo, no mantenían las amplificaciones frecuentemente descritas para GBM primarios como 1q (*MDM4*, *PIK3C2B*), 7q (*MET*, *PEX1*, *CDK6*), 12p (*CCDN2*), 12q (*MDM2*, *GLI*, *CDK4*) o 13q, descritas en la bibliografía (Rao *et al.*, 2010; Ruano *et al.*, 2006). La única amplificación típica de tumores que se detectó en una línea celular de este estudio (SW1783), fue la del gen *PDGFRA* en 4q. Este gen codifica para un receptor celular de respuesta a factores de crecimiento que regulan distintos

procesos biológicos, como desarrollo embrionario, angiogénesis o proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, A172 mostró ganancia de *PIK3C2B* pero no la amplificación descrita en GBM primarios.

También observamos que las líneas celulares adquirirían nuevas mutaciones durante el proceso de inmortalización del cultivo que no se dan en tumores primarios. En concreto, nuestro análisis demostró que las líneas celulares presentaban ganancias de bajo nivel en los cromosomas 5, 16 y 17 y pérdidas en los cromosomas 6, 8, 11 y 18, que, aunque no son habituales en tumores primarios, sí que se han descrito en cultivos celulares procedentes de diversos tipos de tumores (Greshock *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Estas alteraciones se asocian a las presiones de selección que sufren los cultivos celulares tras años de mantenimiento *in vitro* (García-Claver *et al.*, 2011). Por otra parte, Li y colaboradores indicaban que aunque los tumores primarios de gliomas con frecuencia presentaban pérdidas en el cromosoma 13, estas alteraciones no se encontraban en las líneas celulares. Sin embargo, nuestro análisis demostró una pérdida completa o parcial de este cromosoma en la mayoría de las líneas celulares analizadas (H4, LN18, U373, SW1088, U118, U87, SF767, SW1783, A172) (Figura 14). Solamente las líneas GOS3 y T98 no presentaban pérdidas en el cromosoma 13, confirmando los resultados de Li y colaboradores, para esta última.

El análisis por CGH reveló que **las líneas celulares de gliomas contenían más pérdidas que ganancias** de material genético (el número de sondas perdidas casi duplicaba al de sondas ganadas (22,15% de sondas perdidas frente al 12,5% de ganadas), al contrario de lo que se observa en tumores primarios de gliomas, donde se describen con más frecuencia las ganancias (Rao *et al.*, 2010; Ruano *et al.*, 2006). Lo mismo ocurre en líneas celulares de cáncer de mama, donde las pérdidas genómicas casi duplicaban a las ganancias (Tsuji *et al.*, 2010). Estos hechos concuerdan con lo propuesto en diversos estudios con diferentes líneas celulares tumorales que indican que, aunque las líneas celulares mantienen las alteraciones moleculares del tumor de origen, van adquiriendo progresivamente nuevas alteraciones a consecuencia del proceso de inmortalización y de prolongación del tiempo de

cultivo *in vitro* (Greshock *et al.*, 2008; Naylor *et al.*, 2005; Oga *et al.*, 2002; Tsuji *et al.*, 2010).

La **amplificación del *EGFR*** es la alteración más común entre la mayoría de los GBM primarios (Louis *et al.*, 2007). Esta amplificación se produce a través de *dobles minutos*, que son pequeños fragmentos de DNA circular extracromosómico que se replican en el núcleo, pero que carecen de centrómero y telómero. Sin embargo, en este estudio se observó que ninguna de las líneas celulares presentaba amplificación del *EGFR*, aunque sí mantenían ganancias de bajo nivel (principalmente ganancias en todo o parte del cromosoma 7). Esto confirmaba los estudios de otros autores que describen que es habitual la pérdida de la amplificación del *EGFR* durante el mantenimiento *in vitro* de los cultivos, al tratarse de estructuras extra cromosómicas difíciles de conservar genéticamente (Lee *et al.*, 2006; De Witt Hamer *et al.*, 2008).

Por otro lado, ninguna de las líneas celulares de glioma analizadas presentaba el **receptor mutante *EGFRvIII*** común en GBM primarios, ni mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa de *EGFR*. En concreto, ninguna de las líneas celulares presentaba la mutación T790M que está asociada a la resistencia adquirida al ERL, ni la mutación L858R o la delección del exón 19, que están asociadas a una mejor respuesta a TKIs en cáncer de pulmón. Estos resultados confirmaron los estudios previos de otros autores que indicaban que mientras que en cáncer de pulmón era habitual encontrar este tipo de mutaciones, no ocurría lo mismo en gliomas (Marie *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2009).

Otra de las alteraciones más comunes en la gliomagénesis es la **alteración de *PTEN***. La mayoría de las líneas celulares analizadas en este estudio mostraban alteraciones en el gen y por ello pérdida de la expresión de la proteína PTEN, bien por delección homocigota (3 líneas celulares), o por mutación puntual (4). Los estudios de análisis génico masivo indican que alrededor del 10,9% de los GBM tienen pérdida del gen *PTEN* en homocigosis (Rao *et al.*, 2010). Esta cifra era algo más elevada en las líneas de nuestro estudio (3/11, 27% presentaban delección en homocigosis). Estas diferencias

podrían deberse a que la cantidad de muestras analizadas en el estudio de Rao *et al.* era mucho mayor (en total analiza un total de 366 GBM recopilados de diversos trabajos y de la TGCA). Sin embargo, el mecanismo más común de pérdida completa del gen *PTEN* en GBM, es por pérdida de una de las copias (que ocurre hasta en el 70% de estos tumores GBM) y mutación de la copia restante (Ohgaki *et al.*, 2007; Riemenschneider *et al.*, 2010). En nuestro caso, dos de las líneas celulares presentaban pérdida de una de las copias, es decir, delección en hemicigosis (SF767, GOS3), pero ambas expresaban la proteína. Por otro lado, el 40% de los GBM primarios presentan mutaciones en los exones 5 y 6 del gen *PTEN*, que corresponden al dominio catalítico de la proteína (Knobe *et al.*, 2002). En nuestro caso, las líneas celulares de gliomas presentaban mutaciones en los exones 3, 7 y 8 de *PTEN*.

La única amplificación típica de GBM que se ha mantenido en una de las líneas celulares (SW1783) ha sido la del gen *PDGFRA* (Riemenschneider *et al.*, 2010). Según la clasificación de Verhaak y colaboradores en 2010, la **amplificación de *PDGFRA*** caracteriza los GBM de tipo “proneural”, mientras que el tipo de GBM “clásico” se caracteriza por amplificación de *EGFR* (Verhaak *et al.*, 2010). Además, se ha encontrado que hasta en un tercio de GBM “proneural” presentaban amplificación de *PDGFRA* (Ozawa *et al.*, 2011). Este resultado podría sugerir que la línea SW1783 procediera de un GBM “proneural” según esta clasificación. Sin embargo, los mismos autores reconocen que, aunque estos perfiles de expresión sí que se observan en los *xenografts* (tumores humanos implantados en ratones de experimentación), no se ha podido obtener la misma información en el caso de las líneas celulares.

Otros de los genes que frecuentemente presentan ganancias en gliomas son: *PIK3CA*, *BRAF* y *BIRC5*. La **amplificación de *PIK3CA***, subunidad activadora de la PI3K, se ha observado en varios tipos de cáncer, incluyendo los gliomas (Karakas *et al.*, 2006; Kita *et al.*, 2007; Vogt *et al.*, 2006). ***BRAF*** es una serin/treonin-quinasa que está frecuentemente **activada por mutación específica** (V600E) en varios tipos de gliomas (extracerebelosos, gangliogliomas, xantoastrocitoma pleomórfico) o por duplicación del gen en tándem, como en los astrocitomas pilocíticos (Bar *et al.*, 2008;

Riemenschneider *et al.*, 2010). Sin embargo, la activación de *BRAF*, por cualquier mecanismo, es poco frecuente en astrocitomas difusos infiltrativos. Seis de las líneas celulares analizadas presentaban ganancia de *BRAF* por MLPA, pudiendo deberse a la ganancia total o parcial del cromosoma 7 que se observaba en dichas líneas celulares (Figura 14). Por otra parte, la **survivina**, proteína codificada por el **gen *BIRC5*** (17q), promueve proliferación celular, la angiogénesis e inhibe la apoptosis. Mientras que en el tejido adulto normal apenas es detectable, se ha encontrado sobreexpresión de esta proteína en tejidos de gran renovación celular, como ocurre en el cáncer (Altieri *et al.*, 2003). En concreto, varios artículos recogen la sobreexpresión de *BIRC5* en glioblastomas (Das *et al.*, 2002; Hogdson *et al.*, 2009) estando asociado a una mayor gradación del tumor y a un peor pronóstico (Shirai *et al.*, 2009; Zhen *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, observamos que cinco de las 11 de las líneas celulares (H4, LN18, T98, U373, A172) presentaban también ganancia de *BIRC5*.

En **GBM secundarios**, son frecuentes las mutaciones en el gen supresor de tumores, *TP53* (17p13.1) y en *IDH* y la pérdida de heterocigosidad en 17p. En nuestras líneas, no se observaron ni ganancias ni pérdidas del número de copias de *TP53*, ni por CGH, ni por MLPA, pero si se han observado mutaciones puntuales en algunas de las líneas analizadas (Tabla 11).

Además, nuestro análisis demostró que las líneas celulares de gliomas presentaban alteraciones génicas que en GBM son mutuamente excluyentes, como la presencia de mutaciones simultáneas en varios miembros de una misma ruta (*TP53/PI3K/RB1* o *EGFR/PTEN/PI3K*; Tablas 11 y 12). El trabajo de Parsons y colaboradores de 2008, recogía que la mayoría de los GBM, tanto primarios como secundarios, presentaban alteraciones en genes relacionados con las rutas *TP53*, *RB1* y *PI3K*, pero no en varias rutas simultáneamente, ni varios genes mutados dentro una misma ruta (Parsons *et al.*, 2008). Sin embargo, nosotros comprobamos que las líneas celulares de gliomas habitualmente contienen alteraciones en las tres rutas a la vez (T98, LN18, SW1088, U118, GOS3, tabla 12). Del mismo modo, también es frecuente que en las líneas celulares se den a la vez alteraciones en los genes *EGFR*, *PTEN* y *PIK3CA*, que no suelen ocurrir en GBM.

Así, podemos decir que **las líneas celulares derivadas de gliomas mantienen** algunas de las alteraciones características de los tumores primarios como son **la pérdida de *PTEN*, *CDKN2A* y *CDKN2B***, además de adquirir otras mutaciones durante el proceso de immortalización del cultivo. Sin embargo, estos procesos *in vitro* producen la pérdida de las amplificaciones típicas en gliomas, sobre todo la del *EGFR*. También son frecuentes las ganancias de bajo nivel de *PI3KCA*.

En conclusión, aunque las líneas celulares de gliomas suponen un modelo experimental sencillo de manejar y que permite una primera aproximación a la biología de los gliomas, habrá que tener en cuenta que presentan diferencias fundamentales frente a los tumores que representan, como son la pérdida de amplificaciones y la adquisición de alteraciones típicas del cultivo.

2. Las líneas celulares de gliomas responden de manera diferente a distintos inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT

2.1 Erlotinib y Temsirolimus

2.1.1 Marcadores moleculares y respuesta a Erlotinib

Nuestros resultados mostraban que la mayoría de las líneas celulares resistentes al tratamiento con ERL no expresaban PTEN. De acuerdo con esto, diversos autores han asociado la pérdida de PTEN a una peor respuesta a ERL en GBMs (Wang *et al.*, 2006; Mellinghof *et al.*, 2007, Loew *et al.*, 2009). Sin embargo, la predicción de la respuesta al tratamiento con ERL atendiendo a marcadores moleculares presenta controversias. Por un lado, hay un grupo de autores que defienden que la mejor respuesta a TKIs se da en pacientes que coexpresan PTEN y EGFRvIII (Friedman *et al.*, 2005; Mellinghof *et al.*, 2005; Mellinghof *et al.*, 2007; Preusser *et al.*, 2008), mientras que otros autores no corroboran estos resultados. En concreto, indican que no presentan una respuesta más favorable al ERL atendiendo a la amplificación de *EGFR* (Brown *et al.*, 2008; Raizer *et al.*, 2010; Yung *et al.*, 2010; Van den Bent *et al.*, 2009). Nuestro trabajo, sin considerar la amplificación de *EGFR*, que no se daba en

las líneas celulares estudiadas, sí demostró una mejor respuesta a ERL cuando había expresión de PTEN.

Por otra parte, pudimos observar que tanto las líneas celulares que tenían ganancia en PI3KCA como las que tenían mutación en TP53 presentaban una peor respuesta a ERL. Estudios previos realizados en cáncer de ovario demostraron que aquellos tumores que portaban amplificación de *PI3KCA* tenían una peor respuesta a la terapia convencional (Carden *et al.*, 2012; Kolasa *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005). En el caso de la mutación de TP53, existen trabajos en líneas celulares de gliomas que relacionan la ausencia de actividad de TP53 por mutación con una mejor respuesta a TMZ (Blough *et al.*, 2011). Sin embargo, no existen estudios que relacionen estas alteraciones con la respuesta a inhibidores de la ruta EGFR/PI3K/AKT.

Por último, no se observó relación entre la respuesta a ERL y los otros marcadores moleculares estudiados (*EGFR*, *CDKN2A*).

2.1.2 Marcadores moleculares y respuesta a Temsirolimus

Atendiendo a la respuesta al tratamiento con el inhibidor de mTOR, temsirolimus, nuestros resultados no indicaban ninguna relación entre la expresión de PTEN y una mejor respuesta, ya que tanto 2 de las 5 líneas celulares sensibles, como de 2 de las 6 resistentes expresaban la proteína. En este caso, TEMS actúa sobre la proteína mTOR que se encuentra por debajo de PTEN en la ruta de señalización de EGFR/PI3K y, por tanto, la expresión o ausencia de PTEN no tiene por qué influir en la acción del inhibidor. Esto coincide con los resultados de estudios previos, que indican que la inhibición de mTOR es efectiva tanto en tumores que expresan PTEN como en los que no lo expresan (Cloughesy *et al.*, 2008). Del mismo modo, nuestros resultados, mostraban que la expresión de PTEN reforzaba la acción del ERL cuando se combinaba con TEMS, como también recogen otros autores (Wang *et al.*, 2006).

Por otra parte, cabe destacar que ninguna de las cinco líneas sensibles a TEMS expresaban *CDKN2A*. Sin embargo, el hecho de que sólo dos de las

11 líneas del estudio conservaran este gen y la ausencia de otros estudios que apoyen este hallazgo, nos impide poder elaborar conclusiones respecto a esta observación. Nuestros resultados, en concordancia con los datos del CGP, demostraron que 4 de las 6 líneas resistentes a TEMS tenía TP53 mutado. La mutación en *TP53* es una de las alteraciones tumorales que aparecen más tarde en el desarrollo de un tumor y se asocia a una progresión tumoral más rápida. Es por esto que podría estar asociado a una falta de respuesta a tratamientos con inhibidores de la ruta EGFR. Del mismo modo, la mayoría de las líneas con ganancia de *PI3KCA* son resistentes a TEMS. De forma similar a lo observado para el ERL, la ganancia en *PI3KCA* y la mutación en *TP53* están asociadas a una peor respuesta a TEMS en líneas celulares de gliomas. En este sentido, serían necesarios más estudios que relacionen estas alteraciones con la respuesta a inhibidores de la ruta del EGFR, como ERL o TEMS.

2.1.3 Marcadores moleculares y tratamiento combinado erlotinib y temsirolimus

El uso del inhibidor de mTOR, TEMS, en combinación con ERL, favoreció la respuesta en líneas celulares de gliomas resistentes, sobre todo en aquellas que no expresaban PTEN, confirmando estudios previos (Wang *et al.*, 2006; Mellingshof *et al.*, 2005). Estos trabajos proponían que una terapia combinada compuesta por un TKI y otro inhibidor frente a otra proteína de la ruta del EGFR, podría revertir la falta de respuesta a TKIs en determinados tumores. Apoyando estas propuestas, nuestros resultados mostraban que la terapia combinada con ERL y mTOR, lograba respuesta en líneas celulares que eran resistentes a ERL en monoterapia. Wang y colaboradores proponían, además, que esta combinación sería más beneficiosa en líneas celulares deficientes en PTEN. Este mayor beneficio se debería a que en ausencia de PTEN la ruta EGFR/PI3K está continuamente activa (Wang *et al.*, 2006). Apoyando lo anterior, nuestro trabajo también demostró que tres de las cuatro líneas en las que se consiguió respuesta con el tratamiento combinado, no expresaban PTEN.

La comparación de nuestros resultados con los obtenidos para otros agentes terapéuticos en uso o en estudio para el tratamiento de gliomas

(temozolomida, carmustina y tetrahidrocannabinol) demostró que no existía correlación entre la sensibilidad a ERL o a TEMS en comparación con la presentada frente a dichos agentes terapéuticos en estas líneas celulares (Figura 32). Esto sugiere que **los mecanismos de resistencia para estos inhibidores son específicos y distintos a las formas de resistencia frente a otros agentes terapéuticos.**

2.1.4 Las líneas celulares de gliomas tienen distintos perfiles de expresión génica según su respuesta a erlotinib

Dada la mencionada heterogeneidad de los GBMs es probable que la terapia dirigida con TKIs sea sólo activa en una subpoblación de pacientes. Por tanto para valorar más acertadamente el beneficio de esta terapia, sería necesario seleccionar previamente a los pacientes entre cuyos tumores tengan un perfil génico apropiado para este tratamiento. Para ello, se deben caracterizar bien las características moleculares de tumores susceptibles de tratamientos con TKIs.

En este estudio, se analizaron conjuntamente los perfiles de expresión de once líneas celulares con cultivos primarios de tumores y con material procedente de cerebro normal como control, para entender los mecanismos de resistencia a ERL. Un clúster inicial de aproximación reveló que las líneas celulares presentaban perfiles de expresión similares entre sí, independientemente del tratamiento aplicado, y por ello se agrupaban por línea celular (Figura 36). Además, se comprobó que aquellas líneas celulares con una respuesta similar a ERL (definida en los ensayos de viabilidad celular) agrupaban juntas en el clúster, sugiriendo un posible perfil genético común de respuesta a ERL. Por otra parte, se observó que los cultivos celulares de los tumores primarios se agrupaban con las líneas celulares resistentes, y no con las sensibles ni con el tejido no tumoral. Este resultado indicaba que los tumores primarios tenían un perfil de expresión génica semejante al de las líneas celulares resistentes, apoyando la idea de que los patrones de expresión génica pueden ser relevantes en la determinación de la respuesta a los distintos tratamientos farmacológicos.

El estudio de expresión génica diferencial entre las líneas resistentes y sensibles permitió encontrar un grupo de genes (1.191 genes, de los que 262 presentaban una diferencia de expresión superior a cuatro veces) que diferenciaban los dos grupos de respuesta a ERL. Las funciones biológicas que correspondían a esta expresión diferencial eran la **apoptosis** y el **ciclo celular**, confirmando estudios previos sobre líneas celulares de GBM (Halastch *et al.*, 2008; Halastch *et al.*, 2009). Dentro de este grupo de genes, se han validado varios (*HRAS*, *CTGF*, *HDAC3* y *ERCC5*) que podrían utilizarse como potenciales marcadores moleculares de respuesta a ERL. Estos marcadores, sin embargo, deberían ser analizados en mayor detalle y en series amplias de tumores para corroborar su utilidad.

El análisis del efecto del tratamiento con ERL sobre el subgrupo de 262 genes que formaban la firma molecular de respuesta, mostró que las líneas sensibles y resistentes, además de presentar distintos perfiles de expresión, también expresaban distintos patrones de respuesta génica al aplicar el tratamiento con ERL. Se observaba que ni las líneas sensibles ni la mayor parte de las líneas resistentes cambiaban este patrón de expresión tras el tratamiento (Figura 40). No obstante, tres de las líneas resistentes (LN18, SW1088, A172), que mostraban un perfil génico opuesto al de las sensibles y que además no sufrían inhibición de P-AKT y P-ERK, invirtieron completamente su patrón de expresión tras el tratamiento con ERL. Estos resultados podrían indicar que los genes responsables de resistencia y sensibilidad no se ven directamente afectados (no cambia su expresión) al tratar con ERL y únicamente parecen verse afectados cuando no se experimenta inhibición de las rutas AKT y ERK.

Además los análisis de expresión demostraron que antes del tratamiento con ERL, las líneas celulares sensibles sobreexpresaban los genes de la ruta de la PI3K/AKT, mientras que tras el tratamiento, eran las resistentes las que presentaban este enriquecimiento. Esto sugiere, como era de esperar, que ERL inhibe los genes de la ruta de PI3K/AKT, sobre todo en el grupo de las líneas sensibles, donde se reprimen los genes de esta ruta con el tratamiento. El análisis detallado de los genes de la ruta PI3K/AKT, evidenció, entre otros, dos genes diferencialmente expresados entre líneas resistentes y sensibles y que

cambiaban su expresión tras el tratamiento con ERL: *PIK3R3* y *E2F1*. Mientras que el primero estaba sobreexpresado en líneas sensibles y reducía su expresión con el tratamiento únicamente en este grupo, la expresión de *E2F1*, se reducía significativamente en ambos grupos, sensibles y resistentes, tras el tratamiento con ERL.

El gen *PIK3R3* codifica para la subunidad reguladora 3 (p55 γ) de la PI3K de clase I que se une a tirosina quinasas activadas (como el EGFR) a través del dominio SH2 regulando su actividad quinasa. Se ha descrito ganancia de este gen en GBM altamente proliferantes, sugiriendo que este incremento de expresión puede contribuir a la supervivencia de la célula tumoral (Soroceanu *et al.*, 2007). De acuerdo con los estudios realizados en células derivadas de cáncer de ovario, en los que el silenciamiento de *PIK3R3* causaba un incremento en la apoptosis (Zhang *et al.*, 2007), nosotros observamos que el tratamiento con ERL causaba la represión de este gen en líneas sensibles. Por el contrario, esta represión de *PIK3R3* por ERL no ocurría en las líneas celulares resistentes. Aunque se necesitan más estudios, estos resultados sugieren que *PIK3R3* podría ser una interesante diana terapéutica en gliomas.

E2F1 es un miembro de la conocida familia de factores de transcripción que se unen a la proteína de retinoblastoma (pRB) dependiente del ciclo celular. En gliomas, la proteína *E2F1* actúa como factor de transcripción que induce genes de proliferación celular (Alonso *et al.*, 2008) y regula la apoptosis (Hazar-Rethinam *et al.*, 2011). Además, se ha propuesto que los efectos antiangiogénicos que presentan los inhibidores de Ras en GBMs pueden estar mediados por la represión de *E2F1* (Blum *et al.*, 2006). Nuestros resultados demostraron que se producía una disminución de la expresión de este gen tras el tratamiento en ambos grupos de líneas celulares, lo que sugiere un importante papel de *E2F1* en la respuesta a ERL. Estos hallazgos podrían justificar la realización de más estudios sobre *E2F1* como candidato a diana terapéutica en gliomas o para potenciar el efecto del ERL.

2.1.5. El tratamiento con erlotinib afecta a genes implicados en ciclo celular y a la señalización intracelular

El estudio de expresión diferencial en las líneas celulares, antes y después del tratamiento, demostró que el tratamiento con ERL reprimía genes implicados en ciclo celular. Esto se comprobó mediante análisis por citometría de flujo, donde se observó una detención del ciclo celular en fase G1 en estas líneas. En concreto, se encontraron tres genes que experimentaban un mayor cambio de expresión con el tratamiento: **BIRC5**, **PLK1** y **GAS5**. Se observó **que ERL**, por un lado, **reprimía la expresión de BIRC5 y PLK1** y, por otro, **estimulaba la expresión de GAS5**.

Como se indicaba anteriormente, seis de las líneas celulares de nuestro estudio presentaban ganancia génica de *BIRC5*, y además, el tratamiento con ERL disminuía la expresión génica y proteica. Esto concuerda con estudios previos en GBM, en los que se recogía que la inhibición de survivina (por distintos mecanismos) sensibiliza los GBM frente a la radioterapia (Chakravarti *et al.*, 2004; Reichert *et al.*, 2012), favorecía la apoptosis e inhibía la proliferación celular (Blum *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2011; Reichert *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2010;). En definitiva, nuestros resultados confirman estos estudios previos, que proponen la **survivina** como **biomarcador para gliomas** y como un buen **candidato a ser una diana terapéutica**.

PLK1 es una serin/treonin quinasa que contribuye a la transformación maligna de los tumores. Los gliomas tienen mayor expresión de este gen que en cerebro normal y está asociado a un peor pronóstico. Además, se ha demostrado que la inhibición de *PLK1* detiene el ciclo y la progresión celular, sugiriéndose a *PLK1* como una posible diana terapéutica (Cheng *et al.*, 2012).

GAS5 es un RNA no codificante cuya traducción y estabilidad depende de la ruta de mTOR. Recientemente se ha publicado que *GAS5* es necesario para la detención del crecimiento celular en linfocitos T humanos, tanto normales como leucémicos, siendo mediador en el efecto inhibitor de la rapamicina y de sus análogos (Williams *et al.*, 2011). Además, *GAS5* hace que las células sean más sensibles hacia la apoptosis suprimiendo los factores antiapoptóticos inducidos por glucocorticoides (Kino *et al.*, 2010). Nuestros

resultados mostraron un incremento de GAS5 tras el tratamiento junto con una detención del ciclo celular en las líneas celulares derivadas de gliomas.

En nuestro trabajo observamos que la estimulación del EGFR activa no sólo a la ruta más estudiada PI3K/AKT, sino también a otras rutas intracelulares, como la ruta MAPK/ERK. De hecho, en las líneas de gliomas resistentes a ERL encontramos una mayor activación de ERK tras estimulación del EGFR con respecto a las sensibles. Este resultado podría estar justificado, en parte, por la mayor expresión de *HRAS* en las líneas resistentes, observada en los estudios de expresión. ***HRAS*** es miembro de la familia de oncogenes Ras, actúa en señalización intracelular a través de la vía MAPK. En la bibliografía, ya se había descrito la sobreactivación de la ruta Ras/Raf en gliomas por ganancia génica de *HRAS*, entre otros genes (Jeuken *et al.*, 2007) y que los tumores portadores de wtEGFR, presentaban mas activación de la ruta MAPK que de la PI3K (Huang *et al.*, 2007). Por lo tanto, la mayor activación de ERK observada en líneas resistentes, justificado por la sobreexpresión de *HRAS* en éstas, resalta la gran importancia de la activación de la ruta MAPK/ERK en gliomas. Todo esto sugiere, como se recogen en algunas revisiones sobre terapia de gliomas, que son necesarios nuevos estudios sobre inhibidores de ERK para potenciar el efecto de los TKIs (Huang *et al.*, 2007; Paternot *et al.*, 2009, Sunayama *et al.*, 2010).

Nuestro trabajo evidenció que el tratamiento con ERL inhibía la señalización celular a través de las vías PI3K/AKT y en MAPK/ERK en las líneas sensibles al inhibidor, mientras que no lo hacía en la mayoría de las líneas resistentes estudiadas. Sin embargo, en dos de las líneas resistentes (GOS3 y U118) se observó que el tratamiento con ERL inhibía la fosforilación en AKT y/o ERK a pesar de que no se observaba reducción en la viabilidad celular en estas líneas. Una explicación posible a esto podría ser que en determinados contextos genéticos la inhibición parcial de AKT y ERK no afecta a la viabilidad celular. Estos resultados, junto con el análisis funcional (GO terms) sugiere que estas líneas celulares tienen alteraciones adicionales que podría determinar la sensibilidad a ERL.

Por otro lado, atendiendo a la relación entre la expresión de PTEN y el efecto de ERL sobre la inhibición de AKT y de ERK, hemos observado que la

expresión de PTEN en las líneas celulares favorece la inhibición de esas rutas, independientemente de su clasificación como resistentes o sensibles según los ensayos de viabilidad. Esto parece lógico, ya que como hemos indicado anteriormente, PTEN es un inhibidor natural de la ruta que desactiva la señalización iniciada por el EGFR, coincidiendo con lo que se recoge en trabajos previos (Mellinghof *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006).

2.2 Gefitinib

En nuestro trabajo encontramos, en general, peores respuestas para GEF que para ERL en las líneas celulares de gliomas. Del mismo modo, los resultados de los ensayos clínicos previos con GEF para el tratamiento de GBM no muestran ni mayor supervivencia, ni mayor supervivencia sin progresión que con las terapias convencionales (Hegi *et al.*, 2011; Rich *et al.*, 2004; Uhm *et al.*, 2011). De hecho, la ausencia de datos positivos respecto al GEF hace que el número de ensayos clínicos en la actualidad con TKIs sea superior para ERL (23 ensayos clínicos) que para GEF (9) (www.clinicaltrials.gov; Krakstad and Chekenya, 2010).

2.2.1. Marcadores moleculares y respuesta a Gefitinib

En relación a los marcadores moleculares, estudios previos han descrito una mejor respuesta a GEF en los subgrupos de pacientes con tumores portadores de EGFRvIII (Mellinghof *et al.*, 2005; Kinsella *et al.*, 2012). En nuestro estudio, la falta de respuesta a GEF puede deberse a que en ningún caso, nuestras líneas celulares expresaban ese receptor mutante. Sin embargo, las líneas celulares de nuestro estudio que expresaban PTEN, estaban entre las más resistentes a GEF, al contrario de lo que se observaba para ERL.

2.2.2. Efecto del Gefitinib sobre la biología celular

A pesar de que los estudios de MTT describieron una menor efectividad del tratamiento con GEF que con el ERL en las líneas celulares de gliomas, sí se observaron efectos sobre la biología celular en algunas de estas líneas.

Comprobamos que GEF causaba detención del ciclo celular en fase G1 y, en algunos casos, disminuía la fosforilación de AKT y ERK. Además, en algunas líneas celulares causaba apoptosis, incluso en ausencia de mutaciones en el dominio tirosina-quinasa de EGFR, al contrario de lo descrito para líneas celulares de cáncer de pulmón (Costa *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Las líneas que presentaban más apoptosis eran también en las que más disminuía la fosforilación de AKT y ERK por el tratamiento con GEF.

Por otro lado, se observó que las líneas celulares que sufrían apoptosis tras el tratamiento con GEF, correspondían con las que mayor cantidad de la proteína apoptótica BIM expresaban. Además, se observó un incremento en los niveles de BIM tras el tratamiento con GEF sólo en las líneas que sufrían apoptosis, como está descrito para el cáncer de pulmón (Costa *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Aunque son necesarios más estudios, a la vista de estos resultados podemos sugerir que BIM podría ser un marcador molecular predictivo de respuesta a GEF en líneas celulares de gliomas.

Los mecanismos de activación de BIM en líneas celulares sensibles a TKIs no están bien definidos, y mientras por un lado algunos estudios sugieren que dependen sólo del bloqueo de ERK (Gong *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Kuroda *et al.*, 2006), otros sugieren que la principal causa es la inhibición de AKT (Jiang *et al.*, 2004; Handrick *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Por nuestra parte, comprobamos que la inhibición específica de AKT (usando el inhibidor de PI3K, LY) por sí sola no es capaz de inducir BIM en líneas celulares de gliomas. También observamos, en concreto en una de las líneas celulares (GOS3), que la inhibición de ambas rutas tampoco causaba ni apoptosis ni incremento de BIM. En este caso, se observó que la inhibición de AKT y ERK provocada por GEF era menor (Figura 48) que para las líneas en las que sí se observaba la apoptosis.

Estos resultados muestran que la respuesta de las líneas celulares de gliomas a GEF está influida por diversos factores. Mientras que Acquaviva y colaboradores describieron que, en líneas celulares de GBM, GEF causaba apoptosis mediante la inhibición de la ruta de la MAPK y la inducción de BIM, nosotros hemos observado que, además de la inducción de BIM, es necesaria la inhibición de las dos rutas (MAPK y PI3K) (Acquaviva *et al.*, 2011).

2.3 LY294002

El estudio de la respuesta al inhibidor de PI3K, LY294002 en las líneas celulares de gliomas, resaltó la relación de esta respuesta y la expresión de PTEN y de PI3K. Por un lado, nuestros resultados planteaban que la pérdida de PTEN provocaba una peor respuesta de las líneas celulares de gliomas a este inhibidor (6 de las 9 líneas resistentes a LY no expresaban PTEN). Por otra parte, se observa que las cuatro líneas que tienen ganancia del gen *PI3KCA* son resistentes a LY. De hecho, la línea celular más resistente al tratamiento, U373, era la que mayor número de copias de *PI3KCA* presentaba (Kita *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la ganancia de *PI3KCA* causaría una peor respuesta a la terapia con inhibidores de PI3K. Aunque un trabajo en líneas celulares de gliomas sugiere que no hay relación entre *PI3KCA* y la sensibilidad a los inhibidores de PI3K (Guillard *et al.*, 2009), otros estudios preclínicos con estos inhibidores en diversos tipos de tumores sólidos relacionan la presencia de mutaciones activadoras en *PI3KCA* y/o ausencia de PTEN con una mejor respuesta a este tipo de inhibidores (Wen *et al.*, 2012). Por otra parte, un estudio en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario, indica que la pérdida de PTEN y la amplificación de *PI3KCA* provoca una resistencia al cisplatino en estas líneas celulares (Lee *et al.*, 2005; Kolasa *et al.*, 2009). Se necesitarían más estudios en gliomas para comprobar si la amplificación de *PI3KCA* podría provocar también resistencia a tratamientos quimioterápicos, en concreto a inhibidores de PI3K.

Conclusiones

- Las líneas celulares derivadas de gliomas presentan pérdidas génicas características observadas en los tumores primarios derivados de GBMs (*PTEN*, *CDKN2A* y *CDKN2B*), así como ganancias de bajo nivel (*EGFR*, *PI3KCA*). Sin embargo, una de las amplificaciones más características de estos tumores, la del gen *EGFR*, no se observó en las líneas celulares. Además adquieren otras alteraciones propias de la inmortalización de los cultivos *in vitro*.
- Las líneas celulares de gliomas se caracterizan por tener varias alteraciones en la ruta del EGFR/PI3K/PTEN. Aunque no presentan mutaciones puntuales el dominio tirosina quinasa del EGFR, ni son portadoras del receptor mutante *EGFRvIII* presentan alteraciones simultáneamente en *PTEN*, *PI3KCA* y *EGFR*, las cuales se han descrito como mutuamente excluyentes en tumores primarios.
- Las líneas celulares de gliomas con pérdida de expresión de PTEN muestran una peor respuesta a ERL en lo que se refiere a la viabilidad celular, pero dicha respuesta mejora cuando se combina el tratamiento de ERL con TMS.
- Los mecanismos de resistencia de las líneas celulares de gliomas para ERL y TEMS son específicos y distintos a las formas de resistencia frente a otros agentes terapéuticos.
- Las líneas celulares de gliomas que tienen mutación de *TP53* y ganancia de *PI3KCA* muestran una peor respuesta al tratamiento con ERL o TEMS.
- Las líneas celulares de gliomas con ganancia de *PI3KCA* y pérdida de PTEN presentan una peor respuesta a inhibidores de PI3K, como LY294002.
- El análisis de expresión muestra represión de los genes de la ruta PI3K tras el tratamiento con ERL en las líneas celulares de gliomas sensibles a dicho tratamiento.
- El tratamiento con ERL causa la detención del ciclo celular en líneas celulares de gliomas, mediante la represión de *E2F1*, *BIRC5* y *PLK1* y la inducción de *GAS5*, principalmente.

Conclusiones

- El análisis de expresión génica realizado ha permitido proponer el estudio de los genes *PIK3R3*, *HRAS*, *CTGF*, *HDAC3* y *ERCC5* como marcadores de respuesta a erlotinib.
- Gefitinib presenta una peor respuesta que erlotinib en líneas celulares de gliomas.
- La apoptosis mediada por inducción de BIM a consecuencia del tratamiento con GEF no depende la presencia de mutaciones en EGFR, como ocurre en las líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón.
- La apoptosis mediada por gefitinib en las líneas celulares de gliomas depende de la inhibición de las rutas PI3K y MAPK y de la inducción de BIM.

Bibliografía

Bibliografía

- Acquaviva J, Jun HJ, Lessard J, Ruiz R, Zhu H, Donovan M *et al.* Chronic activation of wild-type epidermal growth factor receptor and loss of CDKN2A cause mouse glioblastoma formation. *Cancer Res* 2011, 71: 7198-206.
- Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, *et al.* Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004, 63: 700–707.
- Alonso MM, Alemany R, Fueyo J, Gómez-Manzano C. E2F1 in gliomas: a paradigm of oncogene addiction. *Cancer Lett* 2008, 263: 157–63.
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003, 22: 8581-9,
- Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving *BRAF* in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008, 67:878–87.
- Barrero P. Aplicaciones de la técnica de *microarrays* en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva* 2005, 3: 91-1000.
- Beal K, Abrey LE, Gutin PH. Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: Analysis of single-agent and combined modality approaches. *Radiation Oncology* 2011, 6: 2
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001, 125: 279–284.
- Blum R, Nakdimon I, Goldberg L, Koolg Y. E2F1 identified by promoter and biochemical analysis as a central target of glioblastoma cell-cycle arrest in response to Ras inhibition. *Int J Cancer* 2006, 119: 527–38.
- Blough MD, Beauchamp DC, Westgate MR, Kelly JJ, Cairncrosset JG. Effect of aberrant p53 function on temozolomide sensitivity of glioma cell lines and brain tumor initiating cells from glioblastoma. *J Neurooncol* 2011, 102: 1-7.
- Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM *et al.* Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res* 2004, 64: 5048-50
- Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, Wu W, Jaeckle KA, Uhm JH. Phase I/II Trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed Glioblastoma Multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J Clin Oncol* 2008, 26: 5603–9.
- Carden CP, Stewart A, Thavasulu P, Kipps E, Pope L, Crespo M *et al.* The association of PI3 kinase signaling and chemoresistance in advanced ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012,11 :1609-17.

Bibliografía

- CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2007. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS), 2011. Hinsdale, IL. www.cbtrus.org
- Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA *et al.* Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 2004, 23: 7494–506.
- Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, *et al.* Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs* 2005,23: 357–361.
- Chen H, Kovar J, Sissons S, Cox K, Matter W, Chadwell F *et al.* A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy. *Annal Biochem.* 2005, 338: 136-142.
- Chen L, Han L, Shi Z, Zhang K, Liu Y, Zheng Y *et al.* LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway. *Mol Med Rep* 2012, 5: 575-9.
- Cheng M, Wang B, Weng Z, Zhu X. Clinicopathological significance of Polo-like kinase 1 (PLK1) expression in human malignant glioma. *Acta Histochem* 2012. 114: 503– 509.
- Chin L, Meyerson M. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) *Nature* 2008, 455: 1061-8.
- Chiu HW, Ho YS, Wang YJ. Arsenic trioxide induces autophagy and apoptosis in human glioma cells in vitro and in vivo through downregulation of survivin. *J Mol Med* 2011, 89: 927-41.
- Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, Brown K, Dang J, Zhu S *et al.* Antitumor Activity of Rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Medicine* 2008, 5: 139-151.
- Combs SE, Heeger S, Haselmann R, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy, and temozolomide (GERT)-phase I/II trial study protocol. *BMC Cancer* 2006, 6:133.
- Costa DB, Halmos BH, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, *et al.* BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancer with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* 2007, 4: 1669–80.
- Das A, Tan WL, Teo J, Smith DR. Expression of survivin in primary glioblastomas. *J Can Res Clinical Oncol* 2002 128, 6: 302-6.
- Datta K, Shah P, Srivastava T, Mathur S, Chattopadhyay P, Sinha S. Sensitizing glioma cells to cisplatin by abrogating the p53 response with antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther* 2004, 11: 525–531.

Bibliografía

- Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; 4: P3
- De Witt Hamer PC, Van Tilborg AA, Eijk PP, Sminia P, Troost D, Van Noorden CJ, Ylstra B, Leenstra S. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene* 2008, 27: 2091-6.
- Dunn GP, Andronesi OC, Cahil DP. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant *IDH1/2* in glioma. *Neurosurg Focus* 2013, 34: DOI: 10.3171/2012.12.FOCUS12355.
- Esteller M, García-Foncilas J, Andion E, Goodman S, Hidalgo O, Vanaclocha V *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Eng J Med* 2000,343: 1050-54.
- Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok Y, Beare D *et al.* COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 2011, 39, D945–D950.
- Fresno-Vara JA, Casado E, Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cáncer. *Cancer Treat Rev* 2004, 30: 193–204.
- Friedman HS, Bigner DD. Glioblastoma multiforme and the epidermal growth factor receptor. *N Engl J Med* 2005, 353: 1997–9.
- Friedman HS, Prados M, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE *et al.* Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009, 27: 4733-40.
- Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, Kreisberg JI, Ballman K, Boni J *et al.* Phase II Trial of Temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: A North Central Cancer treatment group study. *J Clin Oncol* 2005, 23:5294-5304.
- Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRVIII variant in glioblastoma multiforme *J Clin Neurosci* 2009, 16: 748-54.
- García-Claver A, Ruano Y, Campos-Martín Y, Rodríguez de Lope A, Pérez-Magán E, Mur P, *et al.* Copy Number alterations in glioma cell lines. In: Glioma-Exploring its biology and practical relevance. In Tech, Croatia, 2011. ISBN 978-953-307-379-8
- Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009, 28 Sup 1: S24-31.
- Gong Y, Sonwar R, Politi K, Balak M, Chmielecki J, Jiang X, Pao W. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med* 2007, 4: 1655–68

Bibliografía

- Greshock J, Nathanson K, Martin AM, Zhang L, Coukos G, Weber BL, Zaks TZ: Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 2007, 67: 3594-600.
- Guillamo JS, Bouïard S, Valable S, Marteau L, Leuraud P, Marie Y *et al.* Molecular mechanisms underlying effects of Epidermal Growth Factor Receptor inhibition on invasion, proliferation and angiogenesis in experimental glioma. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 3697-704.
- Guillard S, Clarke PA, Poele R, Mohri Z, Bjerke L, Valenti M *et al.* Molecular pharmacology of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition in human glioma. *Cell Cycle* 2009, 8:443-53.
- Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, Unterberg A, Wirtz CR. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev* 2006, 32: 74–89.
- Halatsch ME, Löw S, Hielsher T, Schmidt U, Unterberg A, Vougioukas VI. Epidermal growth factor receptor pathway gene expressions and biological response of glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. *Anticancer Res* 2008, 28: 3725–8.
- Halatsch ME, Löw S, Mursch K, Hielsche T, Schmidt U, Unterberg A *et al.* Candidate genes for sensitivity and resistance of human glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. *J Neurosurg* 2009, 111: 211–8.
- Han L, Yang Y, Yue X, Huang K, Liu X, Pu P, Jiang H, Yan W, Jiang T, Kang C. Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of β -catenin-mediated transcription. *Brain Res* 2010, 1366: 9-17.
- Handrick R, Rübél A, Faltin H, Eibl H, Belka C, Jendrossek V. Increased cytotoxicity of ionizing radiation in combination with membrane-targeted apoptosis modulators involves downregulation of protein kinaseB/Akt-mediated survival-signaling. *Radiother Oncol* 2006, 80: 199-206.
- Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habitet AA. Epidermal Growth Factor Receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 2010, 12:675-84
- Hazar-Rethinam M, Endo-Munoz L, Gannon O, Saunders N. The Role of the E2F Transcription Factor Family in UV-Induced Apoptosis. *Int J Mol Sci* 2011, 12: 8947-60
- Hegi ME, Diserens AC, Bady P, Kamoshima Y, Kouwenhoven MC, Delorenzi M *et al.* Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Mol Cancer Ther* 2011, 10:1102
- Hsieh MH, Fang YF, Chang WC, Kuo H, Linc SY, Liu H *et al.* Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006, 53:311–22.

Bibliografía

- Hodgson JG, Yeh RF, Ray A, Wang NJ, Smirnov I, Yu M *et al.* Comparative analyses of gene copy number and mRNA expression in glioblastoma multiforme tumors and xenografts. *Neuro-Oncology* 2009, 11: 477–87.
- Huang PH, Cavenee WK, Furnari FB, White FM. Uncovering therapeutic targets for glioblastoma. A systems biology approach. *Cell cycle* 2007, 6: 2750-54.
- Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009, 4:44–57.
- Jeuken J, van den Broecke C, Gijsen S, Boots-Sprenger S, Wesseling P. RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathol* 2007, 114: 121-33.
- Jiang Z, Zheng X, Lytle RA, Higashikubo R, Rich KM. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J Neurochem* 2004, 89: 168-178.
- Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the *PI3KCA* oncogene in human cancers. *B J Cancer* 2006, 94: 455-59.
- Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where we do stand? *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1000–12.
- Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA Gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* 2010, 3: ra08.
- Kinsella P, Howley R, Doolan P, Clarke C, Madden SF, Clynes M. Characterization and response of newly developed high-grade glioma cultures to the tyrosine kinase inhibitors, erlotinib, gefitinib and imatinib. *Exp Cell Res* 2012, 318: 641-52.
- Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. *PI3KCA* alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica* 2007, 113: 295–302.
- Knobbe CB, Merlo A, Reifemberger G. PTEN signaling in gliomas. *Neuro-oncology* 2002, 4:196-211.
- Kolasa IK, Rembiszewska A, Felisiak A, Ziolkowska-Seta I, Murawska M, Moes J *et al.* *PIK3CA* amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2009, 8, 1-6.
- Korde LA, Lusa L, McShane L, Lebowitz PF, Lukes L, Camphausen K *et al.* Gene expression pathway analysis to predict response to neoadjuvant docetaxel and capecitabine for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 119: 685–99.
- Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer* 2010; 9: 135–49.

Bibliografía

- Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I *et al.* Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009, 27:740-5.
- Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DCS *et al.* Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr-Abl leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *PNAS* 2006, 3: 14907-12.
- Lee S, Choi EJ, Jin C, Kim DH. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol Oncol* 2005, 97:26-34
- Lee J, Vivanco I, Beroukhi R, Huang JHY, Feng WL, DeBiasi RM *et al.* Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 2006; 3: 2264–73.
- Li A, Walling J, Kotliarow Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ *et al.* Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res* 2008, 6: 21-30.
- Li Z, Zhou S, Zhang L, Su C, Hang J, Zhao Y, Su B, Zhou C. BIM induction of apoptosis triggered by EGFR-sensitive and resistance cell lines of non-small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2011, 28: 572-7.
- Libý P, Kostrouchová M, Pohludka M, Yilma P, Hrabal P, Sikora J *et al.* Elevated and deregulated expression of HDAC3 in human astrocytic glial tumours. *Folia Biol (Praha)* 2006, 52: 21-33.
- Lo HW, Cao X, Ali-Osman F. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with Epidermal Growth Factor Receptor in High-Grade Gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Can Res* 2008; 14: 6042-54.
- Loew S, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms. *Anticancer Agents Med Chem* 2009, 9: 703-15.
- Lorente M, Torres S, Salazar M, Carracedo A, Hernández-Tiedra S, Rodríguez-Fornés F, García-Taboada E *et al.* Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death and Differentiation* 2011, 18: 959–73
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007, 114: 97–109.
- Louis, DN., Ohgaki, H. Wiestler, OD., Cavenee, WKK. WHO classification of tumours of the central nervous system, (3rd edition) 2007 *IARC Press*, ISBN 9789283224303, Lyon, France.

Bibliografía

- Löw S, Vougioukas V, Hielscher T, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. Pathogenetic pathways leading to glioblastoma multiforme: association between gene expressions and resistance to erlotinib. *Anticancer Research* 2008, 28: 3729-32.
- Marie Y, Carpentier AF, Omuro AM, *et al.* EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas. *Neurology* 2005, 64: 1444–5.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco Y, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 2005, 353:2012–24.
- Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS. PTEN-mediated resistance to Epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 378-81.
- Michiels S, Danoy P, Dessen P, Bera A, Boulet T, Bouchardy C *et al.* Polymorphism discovery in 62 DNA repair genes and haplotype associations with risks for lung and head and neck cancers. *Carcinogenesis* 2007, 28: 1731–39.
- Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Maurizi Enrici R. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Research* 2009, 29: 5171-84.
- Naylor TL, Greshock J, Wang Y, Colligon T, Yu QC, Clemmer V, Zaks TZ, Weber BL: High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast Cancer Res* 2005, 7:R1186-98.
- Nicholas NK, Lukas RV, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 2006, 12: 7261-70.
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Clinical Practice Guidelines in Oncology. Central Nervous System Cancers. Version 2. 2011. <http://www.nccn.org>.
- Oga A, Kawauchi S, Izumi H, Ping LX, Furuya T, Sasaki K: New perspectives for tumor pathology provided by comparative genomic hybridization. *Int J Clin Oncol* 2002, 7:133-7.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol* 2007,170: 1445-53.
- Ohno M, Narita Y, Miyakita Y, Matsushita Y, Yoshida A, Fukushima S *et al.* Secondary glioblastomas with IDH1/2 mutations have longer glioma history from preceding lower-grade gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2013 Mar 14 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23494632.
- Omuro A, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* 2007, 6:1909-19.

Bibliografía

- Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H *et al.* Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Mol. Cancer Ther* 2004 3: 465-472.
- Pardo FS, Hsu DW, Zeheb R, Efird JT, Okunieff PG, Malkin DM. Mutant, wild type, or overall p53 expression: freedom from clinical progression in tumours of astrocytic lineage. *Br J Cancer* 2004, 91, 1678 – 86.
- Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M *et al.* PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev* 2010, 24: 2205–18.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008, 26: 1807-12.
- Paternot S, Roger PP. Combined inhibition of MEK and mammalian target of rapamycin abolishes phosphorylation of cyclin-dependent kinase 4 in glioblastoma cell lines and prevents their proliferation. *Cancer Res* 2009, 69: 4577–81.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006, 9: 157-73
- Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS, Brewer CJ, Agarwal N, Stevens GH *et al.* Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2010, 98: 93-9.
- Prados MD, Lamborn KR, Chang S, Burton E, Butowski N, Malec M *et al.* Phase 1 study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol* 2006, 8:67-78.
- Preusser M, Gelpi E, Rottenfusser A, Dieckmann K, Widhalm G, Dietrichet W.. Epithelial growth factor receptor inhibitors for treatment of recurrent or progressive high grade glioma: an exploratory study. *J Neurooncol* 2008; 89: 211–8.
- Raizer JJ. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol* 2005, 74: 77-86
- Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG. A phase I trial of erlotinib in patients with nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy, and recurrent malignant gliomas and meningiomas. *Neuro Oncol* 2010, 12: 87–94.
- Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG. A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro Oncol* 2010, 12: 95–103.

Bibliografía

- Rajaraman P, Hutchinson A, Wichner S, Black PM, Fine HA, Loeffler JS *et al.* DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro Oncol* 2010, 12: 37–48.
- Ramis G, Thoma`s-Moyá E, Fernández de Mattos S, Rodríguez J Villalonga P. EGFR Inhibition in glioma cells modulates Rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS ONE* 2012, 7: e38770. doi:10.1371/journal.pone.0038770
- Ramos TC, Figueredo J, Catala M, González S, Selva JC, Cruz TM *et al.* Treatment of high-grade glioma patients with humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol Ther* 2006, 5 :375–9
- Rao, S., Edwards, J., Joshi, A., Siu, M., Riggins G. A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol* 2010, 96: 169-179
- Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A *et al.* Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2006, 12: 860-8
- Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ , Gururangan S, Friedman AH, Herndon II JE *et al.* Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma *J Neurooncol* 2010, 96: 219–230.
- Reichert S, Reinboldt V, Hehlhans S, Efferth T, Rödel C, Rödel F. A radiosensitizing effect of artesunate in glioblastoma cells is associated with a diminished expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Radiother Oncol* 2012, 103: 394-401
- Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penneet KA *et al.* Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22:133–42.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica* y 2010, 120: 567-84
- Ruano Y, Mollejo M, Ribalta T, Fiaño F, Camacho FI, Gómez E *et al.* Identification of novel candidate target genes in amplicons of glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Molecular Cancer* 2006, 5: 39-51
- Ruano Y, Ribalta T, Rodríguez de Lope A, Campos-Martín Y, Fiaño C, Pérez-Magán E *et al.* Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol* 2009, 131:257-63
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S *et al.* High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* 2004, 304: 554.
- Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I *et al.* Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005, 7: 561-73.

Bibliografía

- Sarkaria JN, Galanis E, Wu W, Dietz AB, Kaufmann TJ, Gustafson MP, Brown PD, *et al.* Combination of temsirolimus (CCI-779) with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) (NCCTG trial N027D) is associated with increased infectious risks. *Clin Cancer Res* 2010, 15: 5573-80.
- Shirai K, Suzuki Y, Oka K, Noda S, Kato H, Suzuki Y *et al.* Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma. *J Neurooncol* 2009, 91: 353-58.
- Soroceanu L, Kharbanda S, Chen R, Soriano RH, Aldape K, Misra A *et al.* Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104: 3466–71.
- Stupp R, Mason WP, Van den Bent M, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–96.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* 2005, 102: 15545–50.
- Sunayama J, Matsuda K, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y *et al.* Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells* 2010, 28: 1930–9.
- Thaker MG, Pollack IF. Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies. *Expert Rev Neurother* 2009, 9: 1815-1836.
- Toth J, Egervari K, Klekner A, Bogner L, Szanto J, Nemes Z, Szollosi Z. Analysis of EGFR gene amplification, protein over-expression and tyrosine kinase domain mutation in recurrent glioblastoma. *Pathol Oncol Res* 2009, 15: 225-9.
- Tsuji K, Kawauchi S, Saito S, Furuya T, Ikemoto K, Nakao M *et al.* Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues: Comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues. *BMC Cancer* 2010, 10: 15-25.
- Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC *et al.* Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011, 80: 347-53.
- Van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MCM, Kros JM, Carpentier AF *et al.* Randomized phase II trial of Erlotinib versus Temozolomide or Carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC Brain Tumor Group Study 26034. *J Clin Oncol* 2009, 27:1268-74.
- Vaquerizas JM, Dopazo J, Diaz-Uriarte R. DNMAID: webbased diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 2004; 20: 3656–8.

Bibliografía

- Verhaak RGW, Hoadley KH, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD *et al.* An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 2010,19: 98-110.
- Vivanco I, Sawyers CL. The Phosphatidylinositol-3-kinase–Akt pathway in human cancer. *Nature reviews* 2002, 2: 489-501.
- Vogt PK, Bader AG , Kang S. PI3-Kinases, hidden potentials revealed. *Cell cycle* 2006, 5: 946-9.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE , Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA *et al.* Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 1253-1259.
- Wang MY, Lu KL, Zhu S, Dia E, Vivanco I, Shackelford GM, Cavenee GK *et al.* Mammalian Target of Rapamycin inhibition promotes response to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase inhibitors in PTEN-Deficient and PTEN-Intact Glioblastoma Cells. *Cancer Res* 2006; 66: 7864-69.
- Weiler M, Pfenning PN, Thielpold AL, Blaes J, Jestaedt L, Gronych J *et al.* Suppression of proinvasive RGS4 by mTOR inhibition optimizes glioma treatment. *Oncogene* 2013, 32: 1099-109.
- Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31: 637-43.
- Wen PY, Lee EQ, Reardon DA, Ligon KL, Yung WKA. Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2012, 14: 819–829.
- Williams GT, Mourtada-Maarabouni M, Farzaneh F. A critical role for non-coding RNA GAS5 in growth arrest and rapamycin inhibition in human T-lymphocytes. *Biochem Soc Trans* 2011, 39: 482–6.
- Yang F, Jove V, Xin H, Hedvat M, Van Meter TE, Yu H: Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Mol Cancer Res* 2010, 8: 35-45.
- Yang H, Ye D, Guan KL, Xiong Y. *IDH1* and *IDH2* mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 2012, 18: 5562-71.
- Yart A, Laffargue M, Mayeux P, Chretien S, Peres C, Tonks N *et al.* A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 2001, 276: 8856-64.
- Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an Immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 2011 24, 1248–53.

Bibliografía

- Yin D, Chen W, O'Kelly J, Lu D, Ham M, Doan NB *et al.* Connective tissue growth factor associated with oncogenic activities and drug resistance in glioblastoma multiforme. *Int J Cancer* 2010, 127: 2257-67.
- Yung WKA, Vredenburgh JJ, Cloughesy TF, Nghiemphu P, Klencke B, Gilbert MR *et al.* Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse glioblastoma: a phase II open-label study. *Neuro-Oncology* 2010, 12:1061–70.
- Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Liang S, Hasegawa K, *et al.* Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 30-kinase family identifies *PIK3R3* as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 5314–21.
- Zhen H, Zhang X, Hu P, Yang T, Fei Z, Zhang JN *et al.* Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* 2005, 104: 2775-83.
- Zhou R, Zhang LZ , Wang RZ. Effect of celecoxib on proliferation, apoptosis, and surviving expression in human glioma cell line U251. *Chin J Cancer* 2010, 29: 294-299.

Publicaciones

García-Claver A, Lorente M, Mur P, Campos-Martín Y, Mollejo M, Velasco G, Meléndez B. **Gene expression changes associated with erlotinib response in glioma cell lines.** *Eur J Cancer* 2013, 49: 1641-53.

García-Claver A, Ruano Y, Campos-Martín Y, Rodríguez de Lope A, Pérez-Magán E, Mur P, Torres S, Lorente M, Velasco G, Mollejo M, Meléndez B. **Copy Number alterations in glioma cell lines.** In: Glioma-Exploring its biology and practical relevance. In Tech, Croatia, 2011. ISBN 978-953-307-379-8



Gene expression changes associated with erlotinib response in glioma cell lines

Aino García-Claver^a, Mar Lorente^b, Pilar Mur^a, Yolanda Campos-Martín^a,
Manuela Mollejo^{a,c}, Guillermo Velasco^b, Bárbara Meléndez^{a,*}

^a *Molecular Pathology Research Unit, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain*

^b *Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain*

^c *Department of Pathology, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain*

Available online 30 January 2013

KEYWORDS

Gliomas
Glioblastoma multiforme
Glioma cell lines
Microarray expression assays
Epidermal growth factor receptor
Erlotinib
Temozolomide
PTEN
PI3K/Akt pathway
MAPK/Erk pathway

Abstract Erlotinib (ERL), a tyrosine kinase inhibitor that acts on the epidermal growth factor receptor (EGFR), is used as a second line treatment for glioma therapy, with controversial findings regarding its response. Here, we analysed the gene expression profiles of a series of human glioma cell lines with differing sensitivities to ERL to identify the gene expression changes associated with ERL response. The varying responses to ERL were associated with different expression levels of specific genes (*HRAS*, *CTFG*, *ERCC5* and *HDAC3*) and genes associated with specific pathways (apoptosis and cell death). PI3K pathway genes were primarily affected by ERL, as we found that PIK3R3 was repressed by ERL treatment in sensitive glioma cell lines. The cell cycle and ubiquitin pathways were also affected by EGFR inhibition, as *GAS5*, *PLK1* and *BIRC5* were the most significantly affected genes. In this study we have identified several genes such as *PIK3R3* and *GAS5*, that can be targeted in order to enhance the response to ERL therapy.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gliomas are the most common primary tumours of the central nervous system (CNS), accounting for 31% of all CNS tumours and 80% of the malignant tumours

in the United States.¹ The most aggressive form is glioblastoma multiforme (GBM) or World Health Organization (WHO) grade IV astrocytoma, which represents more than 50% of primary brain tumours. In spite of therapeutic efforts, patients with these tumours have a low survival rate, with 33% of patients surviving for 1 year and less than 5% living beyond 5 years.¹

The epidermal growth factor receptor (EGFR or ErbB-1/HER1M) is widely involved in various human tumours, including malignant gliomas. In primary

* *Corresponding author.* Address: Molecular Pathology Research Unit, Virgen de la Salud Hospital Avda. Barber 30, 45004 Toledo, Spain. Tel.: +34 925 269 245; fax: +34 925 253 613.

E-mail address: bmelendez@sescam.jccm.es (B. Meléndez).

GBMs, EGFR gene amplification and overexpression are frequent molecular alterations, with approximately 20–50% of EGFR-amplified GBMs expressing the EGFRvIII mutant that is generated from the deletion of EGFR exons 2–7.²

EGFR belongs to the HER receptor family, which is involved in diverse cellular functions, including proliferation and differentiation. EGFR is a transmembrane glycoprotein that consists of an extracellular ligand-binding site, a transmembrane segment and an intracellular tyrosine kinase (TK) domain. After ligand binding, activation of the receptor through phosphorylation of the TK domain involves the initiation of cytoplasmic signalling cascades, mainly the mitogen-activated protein kinases (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt and Jak2/STAT3 pathways. Small inhibitors of EGFR, such as erlotinib (ERL), have been developed as cancer therapeutics. ERL inhibits both EGFR and EGFRvIII by blocking ATP binding, thus inhibiting the TK domain and blocking phosphorylation.

Standard treatment of GBMs involves surgical removal of the tumour, if possible, followed by radiotherapy and adjuvant chemotherapy (primarily carmustine, (bis-chloroethylnitrosourea, BCNU) and temozolomide (TMZ)).^{3,4} Unfortunately, the currently available chemotherapies do not provide a cure, and other second line treatments are under study. Clinical trials using ERL reported a better response in glioma patients that co-expressed phosphatase and tensin homolog (PTEN) and EGFRvIII.^{5–7} However, other studies showed a low rate of response and a lack of predictive value of these molecular markers in GBM patients.^{8–11} Several clinical trials are currently being developed to study the effects of combination treatment with ERL and temsirolimus (TEMS), an inhibitor of mTOR.¹²

The controversial findings reported regarding the response to ERL in gliomas suggest that complex molecular signatures associated with individual tumours need to be identified for clinically effective targeting of the EGFR system in GBMs. Furthermore, the characterisation of the response of GBMs to TK inhibitors (TKIs) is not well defined. In the present study, we analysed the gene expression profiles of a large and commonly used series of human glioma cell lines with differing sensitivities to ERL to understand the mechanisms of ERL resistance and identify several candidate genes that could be targeted to improve the anti-tumour efficacy of EGFR inhibitors.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and cell lines

Erlotinib and temsirolimus were kindly provided by Genentech, Inc. (San Francisco, CA, United States of America (USA)) and Wyeth (Pfizer, New York, NY,

USA), respectively, and diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO) (ERL) or ethanol (TEMS) to generate 20 mM stock solutions. EGF was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and diluted to a final concentration of 10 µg/ml in 10 mM acetic acid, 0.1% bovine serum albumin (BSA) solution. The human glioma cell lines GOS3, U87MG (U87), A172, SW1783, U118 MG (U118), T98G (T98), SW1088, H4, LN18, U373MG (U373) and SF767WL (SF767) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Middlesex, United Kingdom (UK)), DSMZ (Braunschweig, Germany) or kindly provided by Dr. Setién (Catalan Institute of Oncology, Spain). Primary cultures of brain tumour cells were obtained from biopsies donated by the Neurosurgery and Pathology departments of the Virgen de la Salud Hospital (Toledo, Spain).

2.2. Cell cultures and viability assays

Glioma cell lines were cultured in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY) in standard culture conditions. The brain tumour biopsies were mechanically disaggregated, seeded in 25 cm² cell culture flasks and cultured in RPMI medium containing 20% FBS to obtain primary cultures from samples of human gliomas. When possible, the karyotypes of cell lines and primary cultures were obtained to ensure the tumoural condition of the culture. Genomic DNAs were recovered using phenol-based standard procedures.

For the viability assays, the glioma cell lines were seeded in 96-well plates at a final concentration of 5000 cells per well and allowed to adhere for 24 h. The cells were then transferred to a serum-free medium with different concentrations of ERL (0–100 µM) or a combination of ERL at different concentrations and 0.01 µM TEMS (ERL + TEMS). Cells treated with the same amount of DMSO at a final concentration lower than 0.2% v/v served as controls for each experiment. Cell viability was determined after 72 h of ERL or ERL + TEMS treatments using the MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) test (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The IC₅₀ concentration of ERL alone or in combination with TEMS was calculated as the drug concentration that inhibits cell growth by 50% compared to controls using the GraphPad Prism 4 program (GraphPad Software). All values are given as the mean ± SD of at least three independent experiments. Unfortunately, primary cultures derived from human gliomas could not be used for viability assays due to the inherent difficulty of maintaining long-term cultures of these cells. These cultures were therefore only used for microarray expression assays.

For microarray expression assays, three 25 cm² cell-culture flasks of each cell line and primary tumour

culture were maintained in standard culture conditions until they reached confluence. Next, the medium in each flask was replaced with 5 ml serum-free medium supplemented with 50 ng/ml EGF and: (i) DMSO and ethanol (untreated cell line, *flask 1*); (ii) 10 μ M ERL (ERL-treated cell line, *flask 2*); or (iii) 10 μ M ERL and 0.01 μ M TEMS (ERL + TEMS-treated cell line, *flask 3*). After 24 h incubation, the cells were collected and total RNA was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.3. Transfections

T98 and U87 (75% confluent) cells were transfected with control (siC) or human GAS5 (siGAS5) specific siRNAs using the DharmaFECT I siRNA Transfection Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. After 24 h of transfection, cells were trypsinised and seeded in complete medium at a density of 5000 cells per cm². After 8 h, cells were transferred to a serum-free medium for 18 h and the different treatments were performed. The efficacy of silencing was higher than 60% in all the experiments.

2.4. Microarray expression assays and data analysis

Total RNAs from cell lines, tumour cell cultures and three brain (non-tumour) tissues were used for microarray experiments. Non-tumoural brain tissues were obtained, one from an autopsy, and two commercially purchased (Stratagene, La Jolla, CA and Clontech, Mountain View, CA). RNA quality was checked by electrophoresis and quantified using NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). A commercial pool of RNAs from several cell lines (Stratagene) was used as a standard reference in all hybridisations. Expression profiling was performed using human 44 K whole-genome oligonucleotide microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Labelling, hybridisation and washing were performed according to the manufacturer's instructions. The arrays were scanned using an Axon GenePix 4100A confocal scanner (Axon Instruments Inc., Union City, CA), and images were analysed using GenePix Pro 6.0 software (Axon Instruments Inc.). Fluorescence ratios of Cy5/Cy3 were normalised using the print-tip loess method and background subtraction with the Diagnosis and Normalisation Array Data (DNMAD) tool.¹³

After normalising and filtering the data, the replicates were averaged using the Gene Expression Pattern Analysis Suite (GEPAS, version 3.1). We used *t*-tests to identify genes that were differentially expressed between the groups. Genes that showed significantly different relative expression between the two groups, with a false discovery rate (FDR) of less than 0.15, were selected for further analysis. To define the differential expression in

resistant versus sensitive cell lines after ERL treatment, the ERL expression data from each cell line were normalised to the expression data from untreated cells, as previously reported for breast cancer.¹⁴

Functional analyses and overrepresentation calculations were performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resource (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) to generate clusters of overrepresented gene ontology (GO) terms.^{15,16} The pathways related to the differentially expressed genes in resistant and sensitive cell lines, and in treated versus untreated cell lines were identified using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), version 2.0 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index>).¹⁷ The gene sets of the molecular pathways were obtained from the Molecular Signatures Database (MsigDB; <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>).

2.5. Reverse transcription and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis

To verify the selected microarray data, the expression levels of *CTGF*, *HDAC3*, *HRAS*, and *ERCC5* were determined using the ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers and probes for the target genes and an internal control (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) were purchased from Applied Biosystems. One microgram of total RNA was reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) to obtain cDNA. Next, a singleplex reaction mixture with the corresponding TaqMan probes was prepared according to the manufacturer's recommendations. All determinations were performed in triplicate, and the expression levels for each gene were normalised with respect to the endogenous control. Triplicate samples from the same commercial pool of RNAs derived from several cell lines that serve as a standard reference in microarray analyses were used as the biological reference for all experiments. The results were normalised and analysed using the comparative Ct method $2^{-\Delta\Delta C_t}$, which was performed using the Sequence-Detector 7500 system program (version 1.2.3f2; Applied Biosystems).

2.6. Western blot and In-Cell Western[™] analysis

Western blot analysis was performed using standard methods. Total protein was extracted from collected cell cultures and quantified using the Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Fifty micrograms of total sample proteins was run on 10% polyacrylamide gels and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-p PVDF membranes; Millipore[™]) using standard procedures, and the membranes were blocked with Odyssey[®] Blocking Buffer (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE). The PTEN

monoclonal mouse antibody (clone 6H2.1) (DAKO), α -tubulin antibody (Cell Signaling Technology, Boston, MA), and IRDye[®] 800CW-labelled goat anti-mouse secondary antibody (Li-COR Biosciences) were used according to the manufacturer's recommendations. Signal detection was performed by direct infrared-fluorescence detection using the Odyssey[®] Infrared imaging system (Li-COR Biosciences).

The In-Cell Western[™] (ICW) is an immunocytochemical assay performed in a microplate format. Target-specific primary antibodies and infrared-labelled secondary antibodies are used to detect target proteins in fixed cells, and the fluorescent signal from each well is quantified. The direct detection of proteins in their cellular context eliminates variabilities and artefacts caused by cell lysis. Ten thousand cells per well were seeded and allowed to adhere overnight. Next, the cells were incubated with serum-starved medium alone or containing 1 μ M ERL, 10 μ M ERL, or either ERL treatment in combination with 0.01 μ M TEMS (ERL + TEMS) for 24 h. As recommended by the manufacturer and previously reported,¹⁸ the cells were stimulated with 50 ng/ml EGF for 15 min, before performing ICW analyses. The following antibodies were used: anti-phospho-Akt (Ser473) (587F11) (Cell Signaling Technology), anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) (Cell Signaling Technology), anti-Bad (Cell Signaling Technology), anti-BIRC5 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) and IRDye[®] 800CW-labelled goat anti-mouse (Li-COR Biosciences). For cell number normalisation in each well, DRAQ5[™] (BioStatus Limited, UK), a cell-permeable DNA-interactive agent that can stain DNA in live or fixed cells, was used.

2.7. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed as previously reported.^{19,20} Briefly, cell lines were treated for 48 h with 10 μ M ERL, 10 μ M ERL + 0.01 μ M TEMS, or solvent alone in a serum-free medium with 100 ng/ml of EGF, harvested and subjected to flow cytometric cell cycle analysis by propidium iodide staining using PI/RNASE Solution (Kit PI/RNase, Immunostep, Salamanca, Spain) and a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.8. PTEN and EGFR mutational status

Mutations in exons 1–9 of the *PTEN* gene and 18–21 of the *EGFR* gene were screened by direct sequencing in an ABI PRISM 310 DNA Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The polymerase chain reaction (PCR) primers and conditions for *EGFR* amplification were previously described.²¹ The PCR primers and conditions for *PTEN* amplification are available upon request. Analysis of

EGFRvIII was determined using Reverse-transcription PCR (RT-PCR) as previously described.²²

2.9. Copy number quantification

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA[®], Mrc-Holland, The Netherlands) with SALSA MLPA Kit P105 Glioma-2 was carried out on glioma cell lines and primary tumour cultures for copy number quantification of *EGFR*, *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A* and *ERBB2*. MLPA profiles of primary tumour cultures were compared to genomic DNA obtained directly from the tumours to ensure that tumoural features were maintained in culture.

3. Results

3.1. Glioma cell line characterisation

To analyse the molecular features associated with ERL response in glioma cells, we initially characterised the sensitivity of the 11 human glioma cell lines to ERL treatment by studying the effect of ERL on cell viability and growth (Fig. 1a). IC₅₀ data obtained by the MTT viability assay, allowed the classification of the cell lines in two groups: (i) cell lines which had low IC₅₀ values (IC₅₀ < 20 μ M), and were classified as sensitive to ERL treatment (SF767, T98 and H4) and (ii) cell lines with higher IC₅₀ values (>100 μ M), which were classified as resistant to ERL treatment (A172, SW1783, SW1088, LN18, U87, U373, U118 and GOS3) (Fig. 1b).

Genomic alterations of the EGFR/PI3K, RB and TP53 signalling pathways had been reported previously in gliomas. Molecular characterisation of the cell lines detected several genomic alterations that are summarised in Supplementary Table 1. Because the response to EGFR inhibitors is affected by the mutational status of the PTEN phosphatase, we paid particular attention to the genetic alterations present in these two genes, *EGFR* and *PTEN*. Loss of PTEN protein expression was found in seven cell lines that carried either homozygous deletions (three cell lines) or coding mutations (four cell lines) of the *PTEN* gene. In addition, none of the 11 glioma cell lines had mutations in exons 18–21 of *EGFR* or expressed the EGFRvIII mutant as shown by RT-PCR (Supplementary Fig. 1). Likewise, none of the cell lines contained the T790M EGFR mutation that is characteristic of acquired resistance to ERL. It is worth noting that, although the cell lines exhibiting the lowest and the highest sensitivity to erlotinib were PTEN deficient, two of three ERL-sensitive cell lines expressed PTEN, while most of the resistant cell lines (6/8) did not (Fig. 1b, Supplementary Table 1).

Of note, we did not find any correlation between the sensitivity of these cell lines to ERL and sensitivity to other chemotherapeutic agents (BCNU and TMZ) or

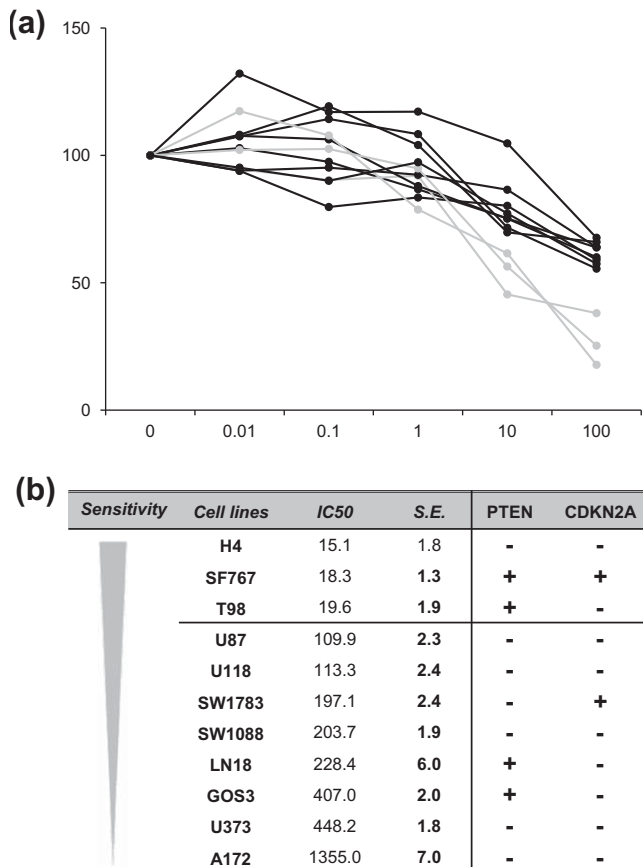


Fig. 1. Classification of human glioma cell lines according to their sensitivity to erlotinib (ERL). (a) Effect of ERL on the viability (as determined by MTT assays) (72 h; mean; $n = 3$) of human glioma cell lines. The y-axis shows the percentage of the cell viability normalised against the control (non-treated cells are considered to have 100% of viability). The x-axis shows ERL concentration. Resistant and sensitive glioma cell lines are plotted in black and grey, respectively. (b) IC₅₀ values for each cell line, standard error (S.E.). The minus symbol indicates that *PTEN* or *CDKN2A* genes were found to be mutated, homozygously deleted or that the protein that encode are lacking in the corresponding cell line.

to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Supplementary Fig. 2). This finding suggests that there are specific mechanisms of resistance to ERL in glioma cell lines that are not associated with the presence of resistance-inducing mutations in EGFR and are distinct from those that promote resistance to other chemotherapeutic drugs.

3.2. Genes and pathways involved in resistance and sensitivity to ERL

To assess the molecular signature of the response of glioma cell lines to ERL, we conducted analysis of gene expression by using microarrays. The minimum ERL concentration that showed a different response between resistant and sensitive cell lines attending to our MTT results (10 μ M) (Fig. 1a), and those of other authors^{5,23} was selected for microarray expression analyses.

We used a supervised method to compare the gene expression profiles of resistant and sensitive cell lines in untreated samples. Using this approach, 1191 genes were differentially expressed (FDR < 0.15) between ERL-sensitive and ERL-resistant cell lines. Among them, a set of 262 genes changed more than fourfold between the two groups of glioma cell lines: 176 of these genes (67.2%) were upregulated and 86 (32.8%) were downregulated in sensitive compared to resistant cell lines (Supplementary Table 2). Fig. 2 shows the different expression profiles between resistant and sensitive cell lines attending to these mentioned 262 differentially expressed genes (DEGs). Moreover, subsequent analyses also showed different gene expression profiles for sensitive and resistant cell lines in response to ERL treatment. Remarkably, none of the sensitive, and five of the resistant cell lines changed the expression of the genes associated to sensitivity/resistance after treatment. On the contrary, three of the resistant glioma cell lines (LN18, SW1088, A172), which showed a profile opposite to that of sensitive cell lines, did change the expression of this gene set after treatment (Fig. 2).

Functional characterisation of the differentially expressed genes revealed enrichment of apoptosis and cell death-related genes, as determined by analysis of GO terms using DAVID. Four of the most differentially expressed genes between untreated ERL-sensitive and ERL-resistant cell lines were selected for quantitative RT-PCR validation: *HRAS*, *CTGF*, *ERCC5* and *HDAC3*. These assays confirmed the microarray expression data, showing higher (*HRAS*, *HDAC3* and *CTGF*) or lower (*ERCC5*) mRNA levels in ERL-resistant compared to ERL-sensitive glioma cell lines (Fig. 3a, Supplementary Fig. 3). Likewise, we confirmed microarray data showing higher *BAD* gene expression in resistant than in sensitive cell lines by analysing *BAD* protein levels by ICW assays (Fig. 3b and c).

Furthermore, to determine which pathways distinguish resistant cell lines from sensitive cell lines, a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was carried out using expression data from untreated cell lines. This analysis revealed that the PI3K pathway was differentially expressed, with enrichment of upregulated genes in this pathway in sensitive cell lines after EGF stimulation ($P < 0.05$) (Fig. 4a). Similarly, the same analysis using expression data of treated cell lines showed that resistant cell lines overexpressed PI3K pathway- and apoptosis-related genes after ERL treatment ($P < 0.01$) (Fig. 4b).

A differential transcriptional analysis of the PI3K pathway genes revealed 10 DEGs between ERL-resistant and ERL-sensitive cell lines (FDR < 0.05) after EGF stimulation (Fig. 4c). Among them, the expression levels of two genes changed after treatment: *PIK3R3* and *E2F1*. The expression of *PIK3R3* was significantly higher in sensitive cell lines than in resistant cell lines, and EGFR inhibition reduced *PIK3R3*

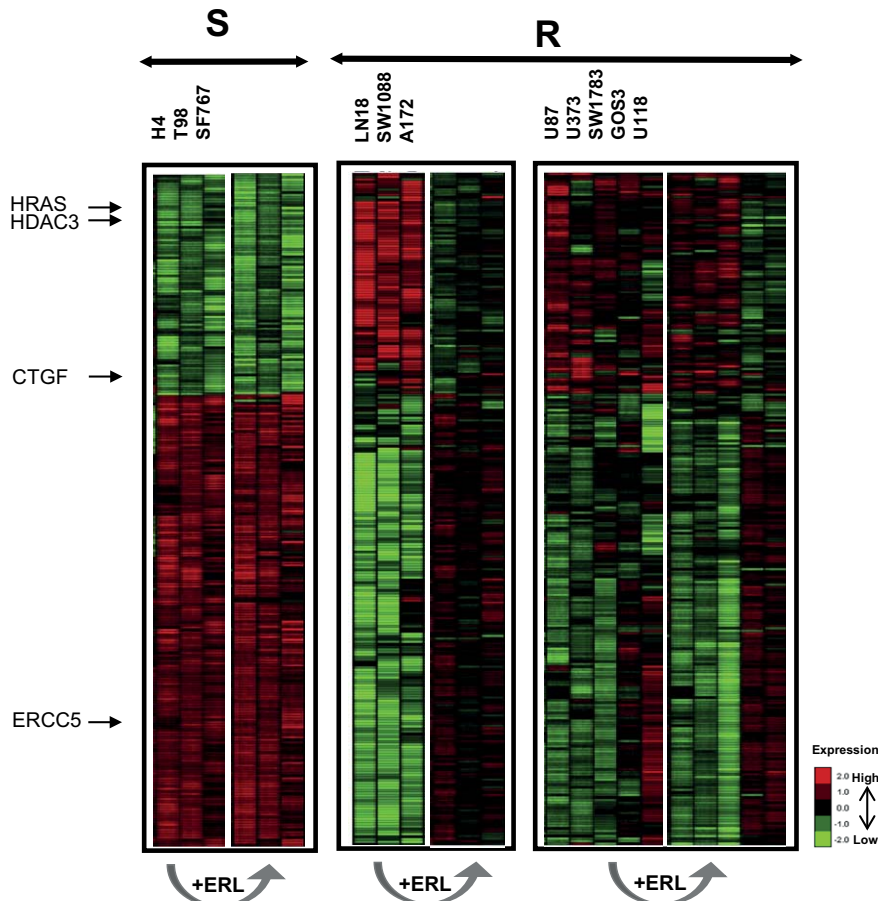


Fig. 2. Gene expression profiles associated with erlotinib (ERL) response. Analysis of the gene expression profile of a panel of glioma cell lines. A set of 262 of the most significantly (false discovery rate, FDR < 0.15) differentially expressed genes (DEGs) between resistant and sensitive cell lines are shown. Left- and right-sided profiles show the gene expression patterns before and after ERL treatment, respectively. Cell lines are grouped according to ERL response (R: resistant; S: sensitive).

expression only in sensitive cell lines but not in resistant cell lines. On the contrary, the *E2F1* gene, which was expressed at higher levels in resistant cell lines than in sensitive cell lines, appeared downregulated in response to ERL treatment in both groups, thus suggesting an important role for this gene in the ERL response (Fig. 4c).

3.3. Effect of ERL treatment on Akt and Erk phosphorylation

The effects of ERL treatment on the EGFR/PI3K/Akt and MAPK/Erk pathways were analysed based on the role of these pathways on well-known promoters of tumour progression in gliomas and other tumours. HRAS, a Ras isoform that is an essential connection between EGFR and the MAPK/Erk pathway, was identified among the most upregulated genes in resistant cell lines (>2-fold). In addition, as mentioned previously, the GSEA revealed the involvement of the PI3K pathway in the differing responses to ERL treatment.

Decrease of p-Akt and p-Erk under baseline levels was detected after ERL treatment in all sensitive cell lines tested, as quantified by ICW (Fig. 5). On the contrary, most of the resistant cell lines tested (4/6) did not have reduced Akt and Erk phosphorylation levels after drug treatment (Fig. 5a). Nevertheless two of the resistant cell lines (GOS3, U118) showed a decrease of p-Akt and p-Erk under baseline levels after ERL treatment (Fig. 5a). ICW assays were validated by western-blot, as shown in Fig. 5b, where equivalent results were obtained. Surprisingly, three cell lines whose p-Akt and p-Erk levels were not reduced after ERL treatment (LN18, SW1088 and A172) presented opposite expression patterns to ERL-sensitive cell lines, particularly when apoptosis-related genes were analysed (Fig. 2).

We observed that most of the PTEN-expressing cell lines (3/4) showed decreased p-Akt and p-Erk levels after ERL treatment (Fig. 5a). PTEN is a modulator of EGFR signalling, and our results suggest that PTEN expression correlated with a better response to ERL of glioma cell lines.

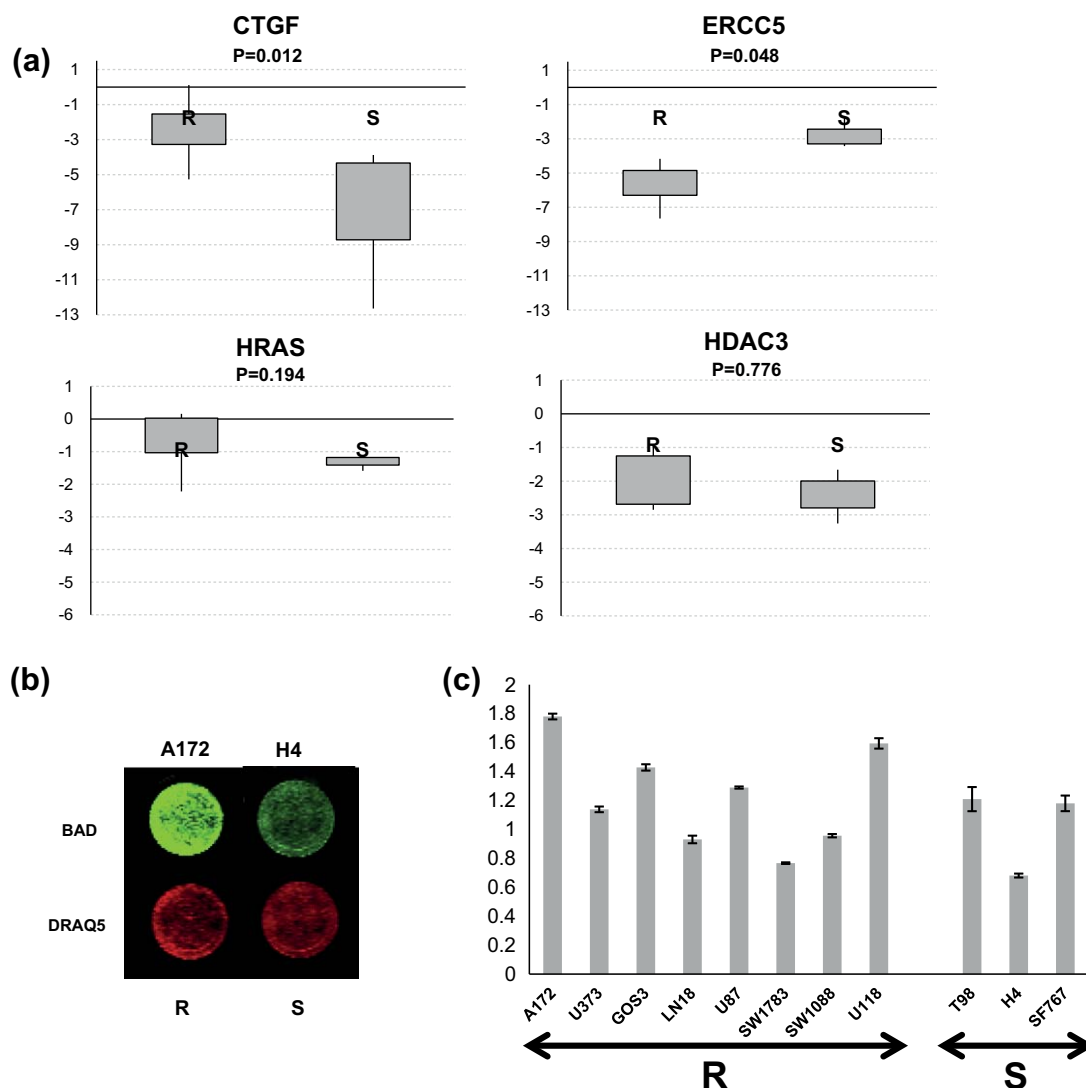


Fig. 3. mRNA and protein levels of genes associated with erlotinib (ERL) differential response in human glioma cell lines. (a) Validation of *CTGF*, *ERCC5*, *HRAS* and *HDAC3* expression levels as determined by reverse transcription and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) (qRT-PCR). Data correspond to mean mRNA levels of each gene in each group (R, resistant; S, sensitive) relative to the endogenous control (*GAPDH*). Box plots indicate the expression values of the 25th and 75th percentiles, and the extremes of the vertical lines represent the maximum and the minimum log₂ expression values. (b) BAD protein expression determined by In-Cell Western (ICW) in two representative cell lines, A172 (ERL-resistant) and H4 (ERL-sensitive). BAD protein (green signal) was normalised relative to DRAQ5 staining (red). (c) Quantification of BAD protein expression as determined by ICW. Data correspond to normalised BAD protein levels (mean \pm s.d.; $n = 3$). Higher BAD expression was observed in resistant cell lines. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. Differential gene expression profiles between treated and untreated cell lines

Comparison of the gene expression profiles of treated and untreated cell lines showed that 44 differentially expressed genes (DEGs) were altered due to ERL treatment (FDR < 0.15) (Supplementary Table 3). Among them, three genes were the most significantly deregulated (FDR < 0.05) in both ERL-resistant and ERL-sensitive cell lines: *GAS5* (overexpressed after ERL treatment), *PLK1* and *BIRC5* (both underexpressed after ERL treatment). *GAS5* and *BIRC5* participate in the regulation of apoptosis, while *PLK1* activates the cell cycle. Involvement

of *BIRC5* in the response to ERL treatment was confirmed by ICW assays that showed diminished expression of *BIRC5* protein after treatment in two representative cell lines (Supplementary Fig. 4).

Intriguingly, knock-down of *GAS5* sensitised T98 but not U87MG cells to submaximal doses of erlotinib (Fig. 6) suggesting that *GAS5* plays a role in the mechanism of resistance of glioma cells to erlotinib, although only under certain genetic contexts.

GSEA was used to investigate the molecular pathways that differed significantly upon comparison of treated and untreated cell lines. Two pathways were repressed after treatment: the cell cycle and ubiquitin

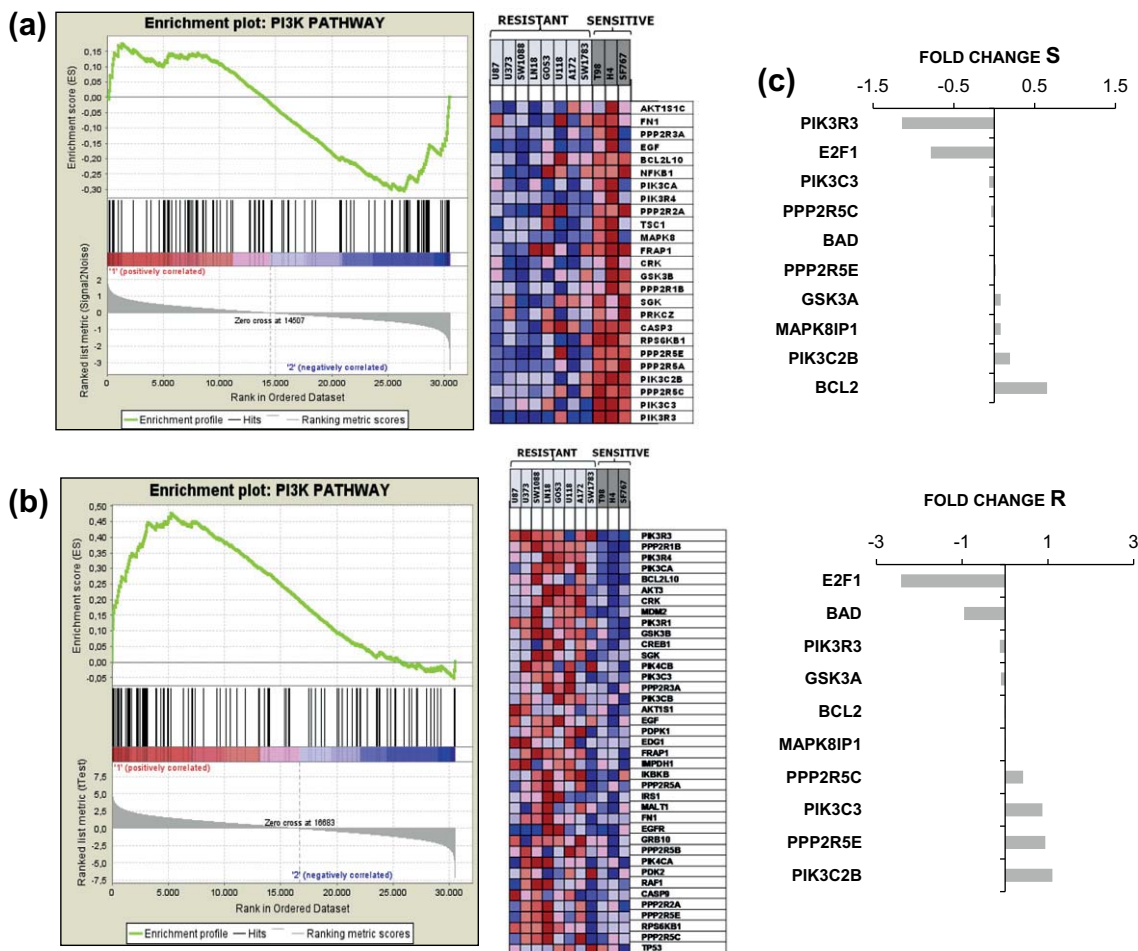


Fig. 4. Functional analyses showed involvement of the PI3K pathway in erlotinib (ERL) response. (a) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showed enrichment of upregulated PI3K pathway genes *before* ERL treatment in sensitive cell lines ($P < 0.05$). Significant upregulated genes of the PI3K pathway (25/100) are shown on the right. (b) GSEA enrichment plot showing significant upregulation of PI3K pathway genes *after* ERL treatment in resistant cell lines ($P < 0.01$). Significant upregulated genes of the PI3K pathway (39/100) are shown on the right. (c) Ten genes of the PI3K pathway were significantly (false discovery rate, $FDR < 0.05$) differentially expressed between resistant and sensitive cell lines. Shown is a schematic representation of the fold changes in expression in sensitive (S) and resistant (R) cell lines following treatment. The greatest changes after treatment were observed for the *PIK3R3* and *E2F1* genes in ERL-sensitive and ERL-resistant cell lines, respectively.

pathways ($FDR < 0.1$) (Fig. 7a). To validate these results, cell cycle analyses were performed using flow cytometry and confirmed an increase in the percentage of cells in G1 phase in treated cell lines compared to untreated cell lines (Fig. 7b).

3.5. Effect of the combined treatment of ERL and temsirolimus

One of the downstream targets of the EGFR/PI3K pathway that plays a crucial role in the control of cancer cell proliferation is the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)^{11,12,24}. Therefore, we selected the mTORC1 protein complex to test whether the cell death-promoting action of ERL can be enhanced by targeting the PI3K pathway downstream of EGFR. In line with this idea, treatment with temsirolimus (TEMS, a selective inhibitor of mTORC1 that is currently

approved for the treatment of renal cell carcinoma) markedly reduced the viability of four of the ERL-resistant cell lines (LN18, U87, U118 and SW1088) (Fig. 8 and data not shown). Moreover, three of these four ERL-resistant cell lines that responded to the combination of ERL + TEMS were PTEN-deficient (U118, U87 and SW1088) (Fig. 8 and data not shown), suggesting that the combined administration of ERL and TEMS can help overcome resistance to ERL.

4. Discussion

Gliomas exhibit a very high resistance to conventional therapies, and consequently, patient outcomes still remain poor. The development of novel treatments that help to improve this situation is therefore promptly needed. One of the therapeutic strategies that is currently under evaluation is the selective targeting of

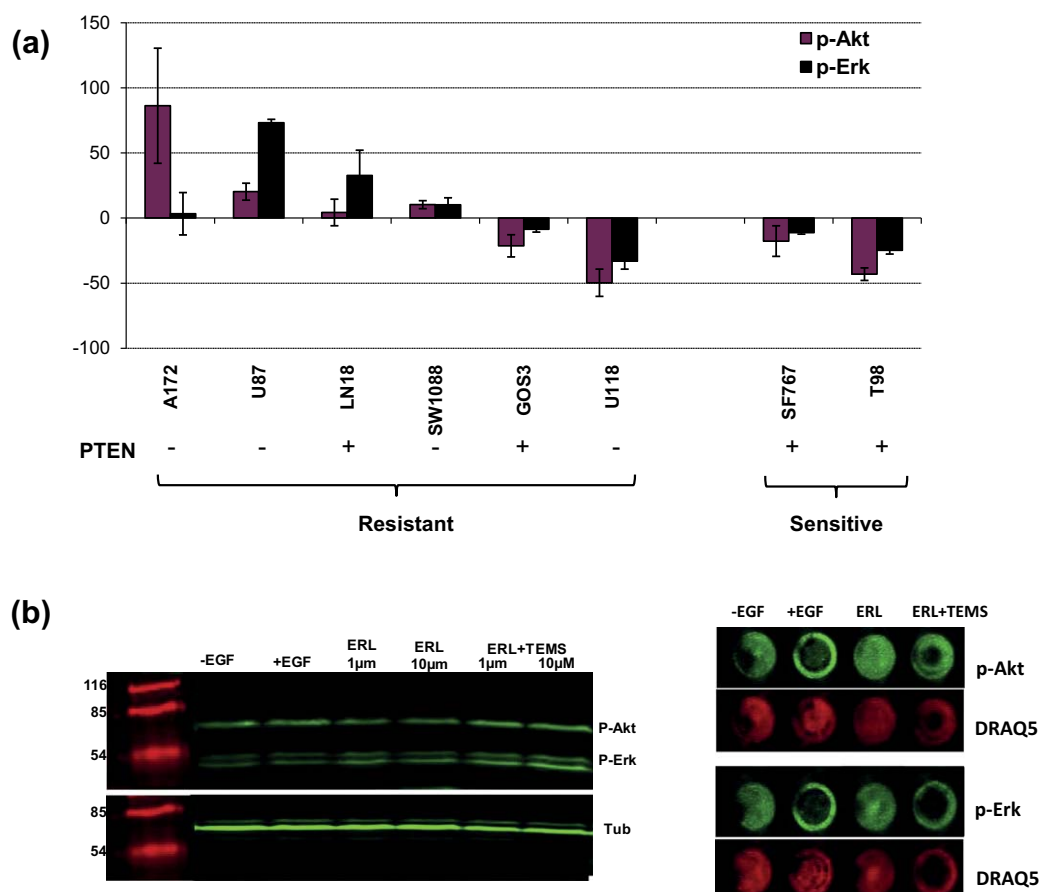


Fig. 5. Effect of erlotinib (ERL) treatment on Akt and Erk phosphorylation. (a) Changes in Akt (purple) or Erk (black) phosphorylation levels in treated cell lines relative to their corresponding non-epidermal growth factor receptor (EGFR) stimulated basal phosphorylation levels (percentage, mean \pm s.d.; $n = 3$) were determined by ICW and quantified. Most of the PTEN-deficient cell lines did not show decreased Akt or Erk phosphorylation levels after treatment. (b) Western blot (WB) and ICW images for the SW1088 cell line. No decrease of Akt or Erk phosphorylation after ERL (10 μ M) or ERL + TEMS (10 μ M + 0.01 μ M) treatment was observed. The same p-Akt and p-Erk antibodies were used for both assays. For normalisation purposes, tubulin and DRAQ5 were used as controls for the WB and ICW experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

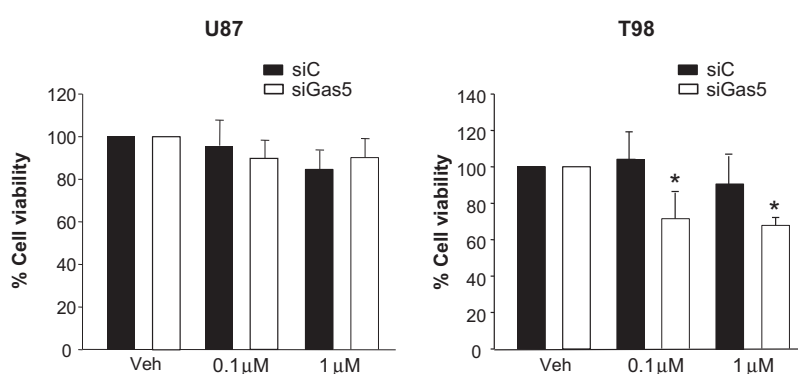


Fig. 6. GAS-5 silencing sensitises T98G cells to ERL treatment. Effect of erlotinib (ERL) on the viability of U87MG and T98 cells transfected with control (siC) or GAS-5-selective (siGas5) siRNA. (mean \pm s.d.; $n = 3$; * $p < 0.05$ from siC-transfected ERL-treated cells).

specific signalling pathways involved in glioma proliferation. For example, inhibition of the EGFR and the PI3K/Akt pathways represents an attractive therapeutic option for the management of malignant glioma due to their frequent dysregulation in this disease. Thus, small-

molecule inhibitors of EGFR, such as erlotinib or gefitinib, are currently being evaluated.²⁵ Unfortunately, several clinical trials performed with various tyrosine kinase inhibitors that target these signalling pathways have not confirmed in glioma patients the initial

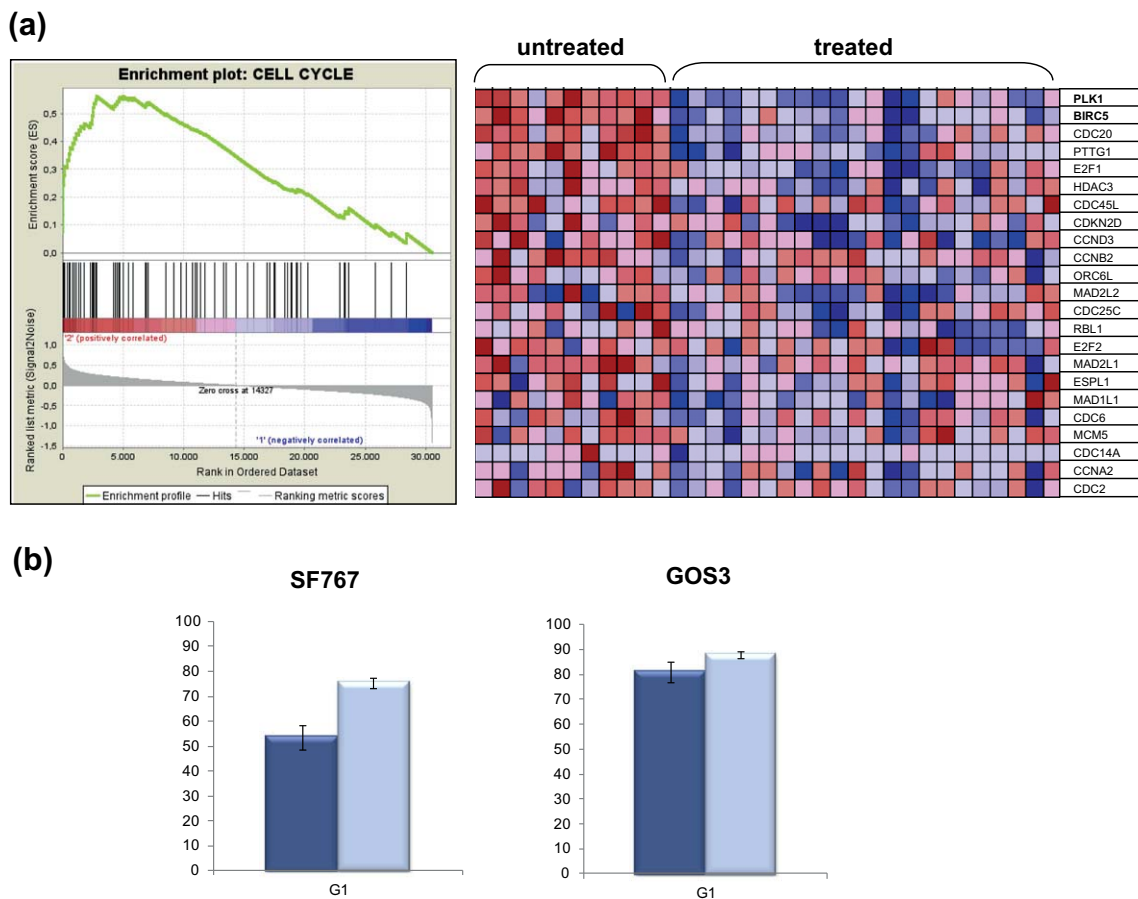


Fig. 7. Differential gene expression analyses between treated and untreated cell lines. (a) GSEA enrichment plot for the cell-cycle pathway (false discovery rate, FDR < 0.1). Twenty-three of 74 genes from this gene set were repressed after treatment, with PLK1 and BIRC5 as the most significantly repressed. (b) Cell cycle analysis of two representative cell lines, SF767 (erlotinib (ERL)-sensitive) and GOS3 (ERL-resistant). Increased percentage of cells in G1 phase, quantified by flow cytometry assays, was observed after treatment (light blue boxes) compared to untreated cell lines (dark blue boxes) (mean percentage of G1 phase cell lines \pm s.d.; $n = 3$).

pre-clinical observations.^{5,9,11,12} suggesting that there could exist specific mechanisms of resistance to the anti-cancer action of these agents in gliomas. Understanding the molecular pathways involved in the resistance to treatments with inhibitors of EGFR is therefore essential for the design of novel combinatorial therapeutic strategies that help to improve the response of gliomas to current treatments.

In the present study, we used a large set of commonly-used glioma cell lines and tumour-derived primary cultures to understand the mechanisms of ERL resistance. An initial clustering analysis revealed that the glioma cell lines grouped together by cell line, independently of treatment (Supplementary Fig. 5). In addition, cell lines with similar responses to ERL as determined by MTT assays also clustered together, suggesting a possible common genetic profile among ERL-resistant and ERL-sensitive cell lines. The cultured tumoural samples clustered with the resistant glioma cell lines, and not with the sensitive cell lines or the non-tumoural brain tissues (Supplementary Fig. 5). This result demonstrates that the cultured samples have a

gene expression pattern more similar to that of resistant glioma cell lines, supporting the idea that the response to drug treatments may be inferred from the gene expression pattern of cultured samples.

Comparison of the gene expression profiles of human glioma cell lines showing differing sensitivities to ERL revealed a set of significant differentially expressed genes (DEGs) between resistant and sensitive cell lines after EGFR stimulation. An important fraction of the most significant DEGs were cell death and apoptosis-related genes, confirming the previous studies in human GBM-derived cell lines that reported putative targets related to apoptosis, proliferation and EGFR pathways, which may enhance the response to ERL.^{26,27}

Further analysis of the gene expression profiles of sensitive and resistant cell lines before treatment with ERL revealed that PI3K/AKT-related genes were overexpressed in ERL-sensitive cell lines. Likewise, a significant overexpression of the PI3K/AKT pathway occurs in resistant cell lines upon treatment with ERL. These observations suggest that the PI3K/AKT pathway becomes inhibited in sensitive cell lines after treatment with ERL.

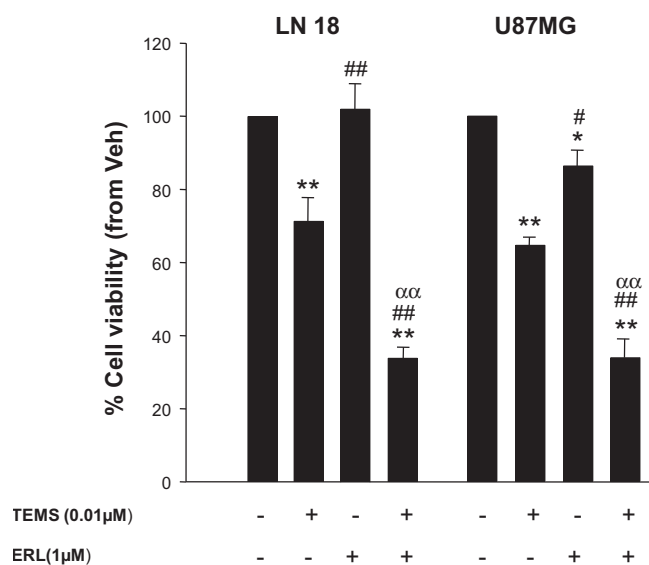


Fig. 8. Temsirolimus enhances erlotinib (ERL) action in glioma cells. Effect of ERL and temsirolimus (TEMS) on the viability (as determined by the MTT assay) of glioma cells. (mean \pm s.d; $n = 3$; ** $p < 0.01$ or * $p < 0.05$ from vehicle-treated cells; ## $p < 0.01$ or # $p < 0.05$ from TEMS-treated cells and; αα $p < 0.01$ from ERL-treated cells).

A detailed analysis of the PI3K/Akt pathway genes revealed 10 highly significant DEGs (FDR < 0.05) between resistant and sensitive cell lines after EGFR stimulation. Among these genes, *PIK3R3* and *E2F1* showed the greatest change in expression after treatment. Strikingly, the *PIK3R3* gene, which was expressed higher in sensitive than resistant cell lines upon EGF stimulation, was repressed after ERL treatment in sensitive but not in resistant cell lines. The *PIK3R3* gene encodes the p55 γ regulatory subunit of the Class I PI3K that binds to activated protein-tyrosine kinases (such as EGFR) through its SH2 domain and regulates their kinase activity. Copy number gain of the *PIK3R3* gene has been described in proliferating GBM, suggesting that increased *PIK3R3* expression may contribute to cancer cell survival.²⁸ In agreement with ovarian cancer cell studies, in which knock down of the *PIK3R3* gene was found to increase apoptosis, we observed reduced expression of *PIK3R3* in sensitive cell lines after EGFR inhibition.²⁹ Most of the resistant cell lines, however, did not show reduced expression of *PIK3R3*. Although further studies are necessary, these results suggest that the *PIK3R3* gene may represent an interesting putative target related to the ERL response.

E2F1 is a member of the well-known E2F transcription factor family that binds preferentially to retinoblastoma protein pRB in a cell-cycle dependent manner. In gliomas, the E2F1 protein functions as a transcription factor that enhances the expression of cell proliferation genes.³⁰ Additionally, the antiangiogenic effects of Ras inhibitors in GBMs are proposed to be mediated by

the downregulation of E2F1.³¹ In our study, the decreased expression of E2F1 after treatment was observed in all cell lines, although this reduction was higher in the resistant cell lines, as it was the gene whose expression changed most after treatment. Our results suggest that E2F1 plays an important role in the response to ERL. Nevertheless, additional studies are required to determine the possible therapeutic benefits of targeting E2F1 to enhance the response to EGFR inhibitors.

Remarkably, the gene expression pattern of most DEGs that distinguish resistant and sensitive cell lines was inverted after ERL treatment in the majority of resistant cell lines. This gene expression pattern change was not observed, however, after ERL treatment in sensitive cell lines, highlighting the relevance of this gene expression signature in the response of glioma cells to the action of ERL.

To note, we observed that erlotinib treatment inhibited the phosphorylation of ERK and AKT in some resistant cell lines, such as in the case of GOS3 and U118, although this treatment did not lead to a significant reduction of cell viability in these cell lines (Fig. 5). One plausible explanation could be that—under certain genetic contexts—a partial inhibition of AKT and p-ERK does not affect cell viability. These results, together with the functional analysis of GO terms, suggest that these cell lines may have additional alterations that could determine the sensitivity to erlotinib inhibition.

Other intracellular pathways in addition to PI3K may also be affected by EGF stimulation, such as the MAPK/Erk pathway.^{32,33} Remarkably, higher Erk activation (p-Erk) was observed in resistant cell lines compared to sensitive cell lines (data not shown). This result can be explained by the enhanced expression of HRAS observed in the resistant cell lines. Thus, although ERL diminished the phosphorylation of Akt and Erk, the increased activation of the Erk pathway in resistant cell lines—that could be due at least in part to a higher expression of HRAS in these cell lines—highlight the importance of the Erk pathway activation in gliomas, and therefore suggest that further studies using Erk inhibitors in gliomas are needed.^{34–36}

In agreement with other studies, we observed a better ERL response in PTEN-expressing glioma cell lines.^{5,23} Similarly, our results showed that the combination therapy of EGFR and mTOR inhibitors has an enhanced benefit in PTEN-deficient glioma cell lines. As previously reported, the lack of PTEN constitutively activates the EGFR/PI3K pathway, and thus the use of a downstream inhibitor of this signalling complex can enhance the effects of ERL.²³ Nevertheless, erlotinib response in glioma cell lines cannot be predicted only attending to PTEN status as we have observed that both the most sensitive and the most resistant cell lines did not express PTEN protein.

The differential gene expression profiles obtained from comparing treated and untreated cells showed three highly significant genes related to ERL response: *GAS5*, *BIRC5* and *PLK1* (FDR < 0.05). *GAS5* is a non-coding RNA whose translation and stability are controlled by the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. Recently, it has been reported that *GAS5* is necessary and sufficient for normal growth arrest in both leukaemic and untransformed human T-lymphocytes, as it is required for the inhibitory effects of rapamycin and its analogues.³⁷ In addition, *GAS5* sensitises cells to apoptosis by suppressing the glucocorticoid-mediated induction of several apoptosis-responsive genes.³⁸ Our results show increased expression of *GAS5* after ERL treatment and cell cycle arrest in treated glioma cell lines. However, silencing of *GAS-5* sensitises T98G but not U87MG glioma cells to treatment with erlotinib, suggesting that under certain genetic contexts this gene can also be involved in resistance to anti-cancer therapies. These observations also support that there are different mechanisms by which glioma cells could elicit resistance to erlotinib treatment.

To conclude, although in our study different ERL concentrations were used for viability assays versus gene expression/protein assays, which might represent a limitation of the study, our results suggest that while ERL treatment affects cell cycle genes in glioma cell lines, the differing responses to ERL treatment depend upon their genetic profiles, especially on the changes observed in the expression of PI3K/Akt pathway-related genes. In addition, our results identify candidate gene products that could be targeted in order to improve the response of glioma cells to EGFR inhibitors.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

This work was supported by Grants PI07/0727 and PI10/01974 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER 2007-2013), and Grant G-2009_E/04 from the Fundación Sociosanitaria de Castilla-La Mancha of the Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. The funding source has no involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, and in the decision to submit the manuscript for publication.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.01.002>.

References

1. Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004–2007. Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS), Hinsdale, IL. <http://www.cbtrus.org/reports/reports.html>.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;**114**:97–109.
3. NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Clinical Practice Guidelines in Oncology. Central Nervous System Cancers. Version 2.2011. <http://www.nccn.org>.
4. Stupp R, Mason WP, Van den Bent M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:987–96.
5. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco Y, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 2005;**2005**(353):2012–24.
6. Preusser M, Gelpi E, Rottenfusser A, et al. Epithelial growth factor receptor inhibitors for treatment of recurrent or progressive high grade glioma: an exploratory study. *J Neurooncol* 2008;**89**: 211–8.
7. Friedman HS, Bigner DD. Glioblastoma multiforme and the epidermal growth factor receptor. *N Engl J Med* 2005;**353**:1997–9.
8. Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, et al. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where we do stand? *Mol Cancer Res* 2009;**7**:1000–12.
9. Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, et al. Phase I/II Trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed Glioblastoma Multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J Clin Oncol* 2008;**26**:5603–9.
10. Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, et al. A phase I trial of erlotinib in patients with nonprogressive glioblastoma multiforme postirradiation therapy, and recurrent malignant gliomas and meningiomas. *Neuro Oncol* 2010;**12**:87–94.
11. Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, et al. A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postirradiation therapy. *Neuro Oncol* 2010;**12**:95–103.
12. Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, et al. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2006;**96**:219–30.
13. Vaquerizas JM, Dopazo J, Diaz-Uriarte R, et al. DNMAID: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 2004;**20**:3656–8.
14. Korde LA, Lusa L, McShane L, et al. Gene expression pathway analysis to predict response to neoadjuvant docetaxel and capecitabine for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;**119**: 685–99.
15. Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;**4**:P3.
16. Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;**4**:44–57.
17. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:15545–50.
18. Liu TJ, Koul D, LaFortune T, et al. NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Mol Cancer Ther* 2009;**8**:2204–10.
19. Costa DB, Halmos BH, Kumar A, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancer with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* 2007;**4**:1669–80.

20. Gong Y, Sonwar R, Politi K, et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med* 2007;**4**:1655–68.
21. Hsieh MH, Fang YF, Chang WC, et al. Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;**53**:311–22.
22. Lee J, Vivanco I, Beroukhi R, et al. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 2006;**3**:2264–73.
23. Wang MY, Lu KV, Zhu S, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006;**66**:7864–9.
24. Thaker NG, Pollack IF. Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies. *Expert Rev Neurother* 2009;**9**:1815–36.
25. Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev* 2006;**32**:74–89.
26. Halatsch ME, Löw S, Hielsher T. Epidermal growth factor receptor pathway gene expressions and biological response of glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. *Anticancer Res* 2008;**28**:3725–8.
27. Halatsch ME, Löw S, Mursch K, et al. Candidate genes for sensitivity and resistance of human glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. *J Neurosurg* 2009;**111**:211–8.
28. Soroceanu L, Kharbanda S, Chen R, et al. Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:3466–71.
29. Zhang L, Huang J, Yang N, et al. Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:5314–21.
30. Alonso MM, Alemany R, Fueyo J, et al. E2F1 in gliomas: a paradigm of oncogene addiction. *Cancer Lett* 2008;**263**:157–63.
31. Blum R, Nakdimon I, Goldberg L, et al. E2F1 identified by promoter and biochemical analysis as a central target of glioblastoma cell-cycle arrest in response to Ras inhibition. *Int J Cancer* 2006;**119**:527–38.
32. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer* 2010;**9**:135–49.
33. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;**4**:988–1004.
34. Lo HW. Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel therapy for malignant gliomas. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;**10**:840–8.
35. Paternot S, Roger PP. Combined inhibition of MEK and mammalian target of rapamycin abolishes phosphorylation of cyclin-dependent kinase 4 in glioblastoma cell lines and prevents their proliferation. *Cancer Res* 2009;**69**:4577–81.
36. Sunayama J, Matsuda K, Sato A, et al. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells* 2010;**28**:1930–9.
37. Williams GT, Mourtada-Maarabouni M, Farzaneh F, et al. A critical role for non-coding RNA GAS5 in growth arrest and rapamycin inhibition in human T-lymphocytes. *Biochem Soc Trans* 2011;**39**:482–6.
38. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* 2010;**3**:ra08.

Copy Number Alterations in Glioma Cell Lines

Ainocha García-Claver et al.*
Virgen de la Salud Hospital, Toledo,
Spain

1. Introduction

Established tumor-derived cell lines are widely and routinely used as *in vitro* cancer models for various kinds of biomedical research. The easy management of these cell cultures, in contrast to the inherent difficulty in establishing and maintaining primary tumoral cultures, has contributed to the wide use of these immortalized cell lines in order to characterize the biological significance of specific genomic aberrations identified in primary tumors. Therefore, it has been assumed that the genomic and expression aberrations of long-term established cell lines resemble, and are representative, of the primary tumor from which the cell line was derived. Indeed, the cell line-based research has been performed, not only for the definition of the molecular biology of several cancer models, but also for the investigation of new targeted therapeutic agents in a prior step to clinical practice. The use of tumor-derived cell lines has been highly relevant for the testing and development of new therapeutical agents, with several cancer cell-line panels having been developed for drug sensitivity screening and new agents' discovery (Sharma et al, 2010).

Controversial concerning the ability of tumor-derived cell lines to accurately reflect the phenotype and genotype of the parental histology has been documented. A previous report of Greshock and coworkers using array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) data of seven diagnosis-specific matched tumors and cell lines showed that, on average, cell lines preserve *in vitro* the genetic aberrations that are unique to the parent histology from which they were derived, while acquiring additional locus-specific alterations in long-term cultures (Greshock et al, 2007). In contrast, a study on breast cancer cell lines and primary tumors highlight that cell lines do not always represent the genotypes of parental tumor tissues (Tsuji et al, 2010). Furthermore, a parallel genomic and expression study on glioma cell lines and primary tumors states that in this specific cancer type, cell lines are poor representative of the primary tumors (Li et al, 2008). Given the importance of the use of cell lines as models for the study of the biology and development of tumors, and for the testing of the mode of action of new therapeutical agents, the knowledge of which genomic alterations are tumor-specific or which are necessary for the maintenance of the cell line in culture, becomes essential.

* Yolanda Ruano¹, Yolanda Campos-Martín¹, Ángel Rodríguez de Lope¹, Elisa Pérez-Magán¹, Pilar Mur¹, Sofía Torres², Mar Lorente², Guillermo Velasco², Manuela Mollejo¹ and Bárbara Meléndez¹

¹Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain

²Universidad Complutense, Madrid, Spain

Sometimes cell line studies are interpreted in the context of artifacts introduced by selection and establishment of cell lines *in vitro*, given the prevalence of documented cell line-specific cytogenetic changes acquired with multiple growth passages which is associated with random genomic instability. Therefore, the ability of glioma cell-line models to accurately reflect the phenotype and genotype of the parental glioma tumors remains unstudied. The aim of this study is to compare the genomic aberrations of the most commonly used glioma cell lines for *in vitro* analysis with those alterations more prevalent in primary glioma tumors.

2. Copy number alterations in glioma cell lines

2.1 High-level DNA copy number alterations in glioma cell lines

2.1.1 Amplifications

Genomic high-level DNA copy number gains (regions of amplification, or amplicons, i.e. chromosome regions that show more than 5- to 10-fold copy number increases) were detected at 4q, 10q and 19q in two of the cell lines: SW1783 (4q12) and SF767 (10q21.2-q23.1 and 19p12) (table 1, figure 1). The MLPA analysis confirmed some of the genomic alterations observed by aCGH, such as the amplification of *PDGFRA* (4q12) which was observed in SW1783 cell line (see below table 3).

CHROMOSOME	GENES	CELL LINE (Region Size Mb)
4q12	CHIC2, GSH2, PDGFRA, KIT, KDR, SRD5A2L, TMEM165, CLOCK, PDCL2, NMU, EXOC1, CEP135, AASDH, PPAT, PAICS, SRP72, HOP, SPINK2, REST, OLR2B, IGFBP7	SW1783 (3.57)
10q21.2 - q23.1	COL13A1, H2AFY2, AIFM2, TYSND1, SAR1A, PPA1, NPFFR1, LRRC20, EIF4EBP2, NODAL, PRF1, ADAMTS14, SGPL1, PCBD1, UNC5B, SLC29A3, CDH23, PSAP, CHST3, SPOCK2, ASCC1, DNAJB12, CBARA1, CCDC109A, OIT3, PLA2G12B, P4HA1, NUDT13, ECD, DNAJC9, MRPS16, TTC18, ANXA7, ZMYND17, PPP3CB, , USP54, MYOZ1, SYNPO2L, SEC24C, FUT11, NDST2, CAMK2G, PLAU, VCL, AP3M1, ADK, MYST4, DUSP13, SAMD8, VDAC2, KCNMA1, DLG5, NAG13, POLR3A, RPS24, ZMIZ1, PPIF, SFTPD, ANXA11, MAT1A, DYDC1, DYDC2, TSPAN14, NRG3	SF767 (13.37)
19p12	ZNF43,SINE-R ,ZNF208,ZNF257	SF767 (0.28)

Table 1. Summary of high-level gains (amplifications) detected by aCGH

Amplification of the *EGFR* gene, located on chromosome 7, and subsequent over-expression of *EGFR* protein, is the most common genetic alteration found in primary glioblastoma (GBM), the most aggressive high-grade glioma. This amplification is detected in about 40% of these tumors, and is present as double-minute extrachromosomal elements (Louis et al, 2007). Amplification of the *EGFR* gene is often associated with structural rearrangements, resulting in tumors expressing both wild-type *EGFR* as well as the mutated *EGFR*. The most common truncated *EGFR* variant is the *EGFRvIII* one, consisting of 801-bp in-frame deletion comprising exons 2-7 of the gene.

Among the cell lines analyzed in this study, some of them derived from primary GBMs, none of them carried either amplification of the *EGFR* gene, nor the *EGFRvIII* mutant form of the receptor (Figure 2). Besides, *EGFR* sequence analysis of exons 18-21, coding for the tyrosine kinase domain, revealed not a mutation in this region, unlike what is found in non-small lung cancer tumors.

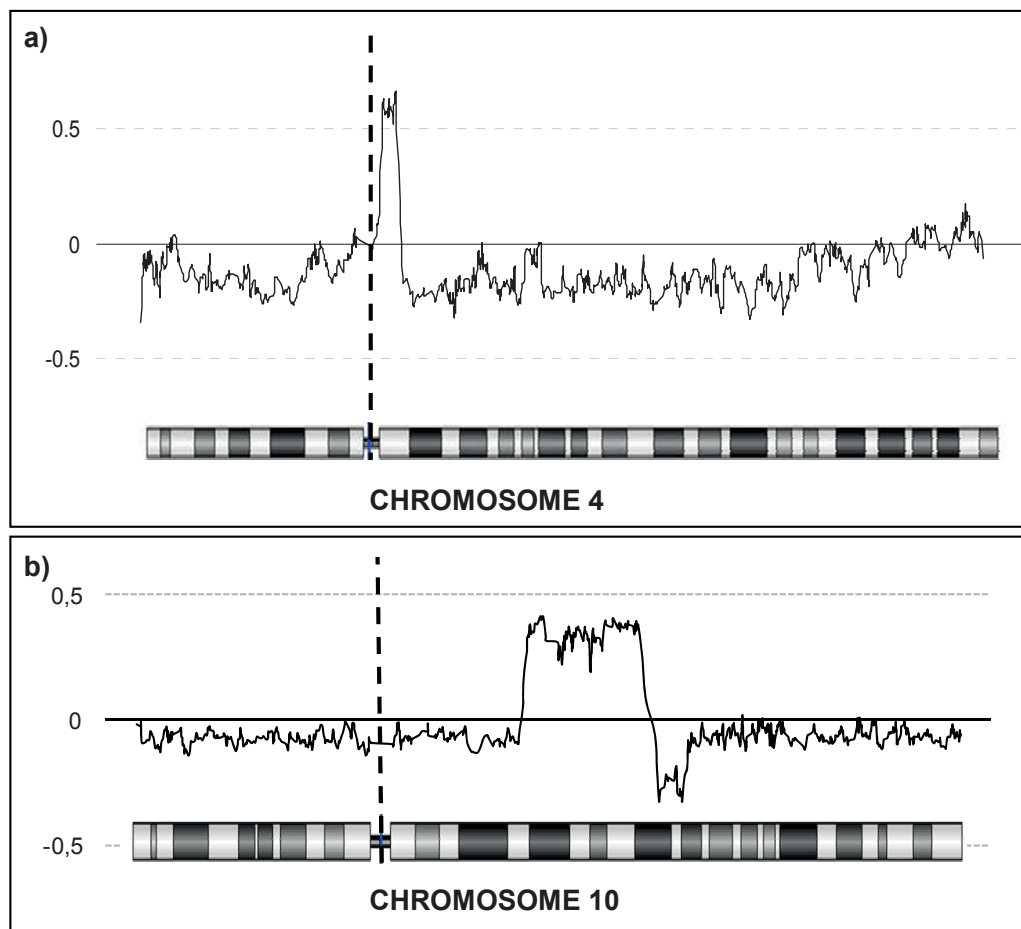


Fig. 1. aCGH results of chromosomes 4 (a) and 10 (b) in SW1783 and SF767 cell lines, respectively. Moving average of log₂-genomic ratios over five neighbouring genes are plotted.

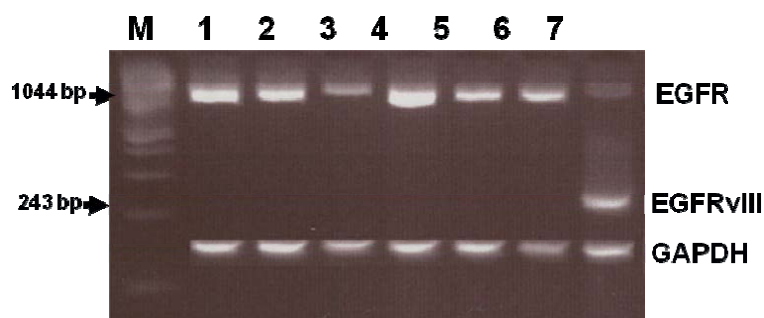


Fig. 2. RT-PCR analysis for the detection of EGFR wild-type (EGFRwt) and EGFRvIII mutant receptor. The inset shows control gene GAPDH results. Line 1: GOS3, 2: A172, 3: U118, 4: SF767, 5: T98, 6: wt EGFR control, 7: EGFRvIII control; M: molecular marker.

2.1.2 Homozygous deletions

Analysis of the high-level copy number changes detected by aCGH in the eleven glioma cell lines revealed higher frequency of genomic losses than gains. A stringent filter was applied in order to detect homozygous deletions.

Genomic homozygous losses were detected at 1p, 1q, 2q, 3p, 4q, 5q, 6q, 7p, 9p, 10p, 10q and 21p (Table 2).

Homozygous losses affecting two or more cell lines were detected at 1p33, 9p21.3-21.1, 10q23.2-23.3 and 21p11.1 (Table 2). Main target genes of these regions were: *CDKN2C* (p18^{INK4c}) on chromosome 1, *CDKN2A* (p16^{INK4a}) and *CDKN2B* (p15^{INK4b}) on chromosome 9, and *PTEN* on chromosome 10. The most frequent homozygous gene loss was the loss of *CDKN2A* (p16^{INK4a}) and *CDKN2B* (p15^{INK4b}), affecting nine (82%) and eight (73%) of 11 glioma cell lines, respectively.

2.1.2.1 Loss of *CDKN2C*

The Cancer Cell Line project (CCL) database from the Genome Cancer Project of the Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines/>) was used to confirm these alterations when possible. Homozygous deletion of *CDKN2C* (1p33) was described in this project for T98 and U87 cell lines. Homozygous deletion of *CDKN2C* on U373 cell line was not reported in this project. By contrast, this deletion was not reported in the study of Li and coworkers for T98 and U87 cell lines (Li et al, 2008).

2.1.2.2 Loss of *CDKN2A* and *CDKN2B*

CDKN2A (9p21.3) loss of cell lines A172, H4, SW1088, T98, U118 and U87 was reported by the CCL project. Similarly, this gene was described as not mutated in SW1783, therefore confirming our results. Data from GOS3, LN18 and U373 were not provided in this database. Deletion of the 9p21 region was also reported in A172 and U87 cell lines by Li and coworkers, again validating our findings. Strikingly, T98 cell line was not deleted in that study (Li et al, 2008). Furthermore, the MLPA analyses performed on the cell lines confirmed the homozygous deletions observed by aCGH (Table 2). Therefore homozygous deletion of the *CDKN2A* gene was present in 9 of the 11 glioma cell lines (Table 2, Figure 3). Remarkably, there were two cell lines that lack any alteration at the *CDKN2A* locus, either by homozygous or hemizygous loss of the region.

2.1.2.3 Loss of *PTEN*

The aCGH analysis revealed homozygous deletion of *PTEN* in SW1088 and H4 cell lines (Table 2), which was confirmed by the MLPA assay (Figure 4). In addition, homozygous deletion of *PTEN* in these cell lines was also reported by the CCL project. *PTEN* hemizygous deletion was detected in SF767 and GOS3 cell lines by aCGH and MLPA. Surprisingly, A172 cell line had homozygous deletion of all the *PTEN* probes of the MLPA assay except those of exons 1 and 2. This loss could not be detected by the aCGH analysis, probably because only two of the three probes included in the microarray were in the deleted part of *PTEN* (homozygous losses were considered as present when three consecutive clones were under the threshold 1.0) (Figure 4).

Further analyses of *PTEN* sequence were performed attending to *PTEN* expression (see Table 5 in section 3). Western-blot analysis showed *PTEN* expression in T98, LN18, GOS3 and SF767 (the two latter carrying hemizygous deletion of the gene). Lack of protein expression was found in 7 of the eleven cell lines, three of them having homozygous deletion of *PTEN*. Therefore, we carried out exon-sequencing analysis of the other four *PTEN* deficient cell lines (U118, U87, U373 and SW1783) in order to detect putative mutations of the genomic sequence that could explain the observed suppression of protein expression. U118 and U87 presented a substitution mutation (G>T) in the splicing site of exons 8 (c.1026+1G>T) and 3 (c.209+1G>T), respectively; U373 showed an homozygous TT insertion in exon 7 causing a shift in the reading frame (c.723_724insTT); and SW1783

showed a substitution in exon 7 (c.691C>T) which results in a stop codon (CGA>TGA). The latter mutation was confirmed with the database from the Cancer Genome Project (CGP, Sanger Institute). The CGP report the same mutation that we found in cell line U373, for the U251 glioma cell line, which is derived from the same tumour as U373, and thus contains the same TT insertion mutation in PTEN.

CHROMOSOME	GENES	CELL LINE (Mb lost)
1p33	FAF1, CDKN2C	U87 (0.17), T98 (0.07), U373 (0.23)
1p31.1	LRRC44, FPGT, TNNI3K, CRYZ, TYW3	U118
1q42.2	DISC1,SIPA1L2,PCNXL2	GOS3 (1.33)
2q42.2	BAZ2B	GOS3 (0.12)
3p24.3	TBC1D5,SATB1,KCNH8, EFHB,RAB5A, SGOL1, PCAF	H4 (4.63)
3p24.1	TGFBR2	SF767 (0.23)
3p12.2-p11.2	IGSF4D,VGLL3,CHMP2B, POU1F1,HTR1F, CGGBP1	LN18 (6.32)
4q34.1	FBXO8,HPGD,GLRA3	U118 (0.40)
5q14.1	THBS4, SERINC5	SF767 (0.13)
6q22.2	ROS1,DCBLD1	U118 (0.17)
7p21.2-p21.1	ETV1, DGKB, MEOX2, OSTDC1, ANKMY2, BZW2, TSPAN13, AGR2, BCMP11, AHR, SNX13, HDAC9	SF767 (5.09)
9p22.1-p21.1	SLC24A2	LN18 (6.37)
9p21.3-p21.1	MLLT3, IFNB1	U118 (10.86), U87 (3.52), LN18
	IFNW1	U118, U87, LN18, H4 (1.22)
	KLHL9,IFNA2,IFNA8	U118, U87, LN18, H4, SW1088 (7.22)
	IFNE1,MTAP	U118, U87, LN18, H4, SW1088, A172 (0.71)
	CDKN2A	U118, U87, LN18, H4, SW1088, T98, U373, A172, GOS3 (0.18)
	CDKN2B	U118, U87, LN18, H4, SW1088, U373, A172, GOS3
	ELAVL2	U118, LN18, SW1088
	hel-N1	U118, LN18
10p11.21	PLAA, IFT74, LNG01784, TEK, MOBKL2B, LRRN6C	U118, SW1088
	LINGO2	U118
10p11.21	PARD3	T98 (0.11)
10q23.2 - q23.31	MINPP1	H4 (0.73)
	PAPSS2, ATAD1, PTEN	H4, SW1088
	LIPF, ANKRD22, STAMBPL1, ACTA2, FAS, CH25H, LIPA	SW1088 (1.50)
10q25.2	TCF7L2	T98 (0.16)
12q21.2	PAWR	GOS3 (0.14)
21p11.1	BAGE4, BAGE5, BAGE3, BAGE2, BAGE	H4 A172, U118, GOS3 (0.04)

Table 2. Homozygous losses detected in glioma cell lines by aCGH

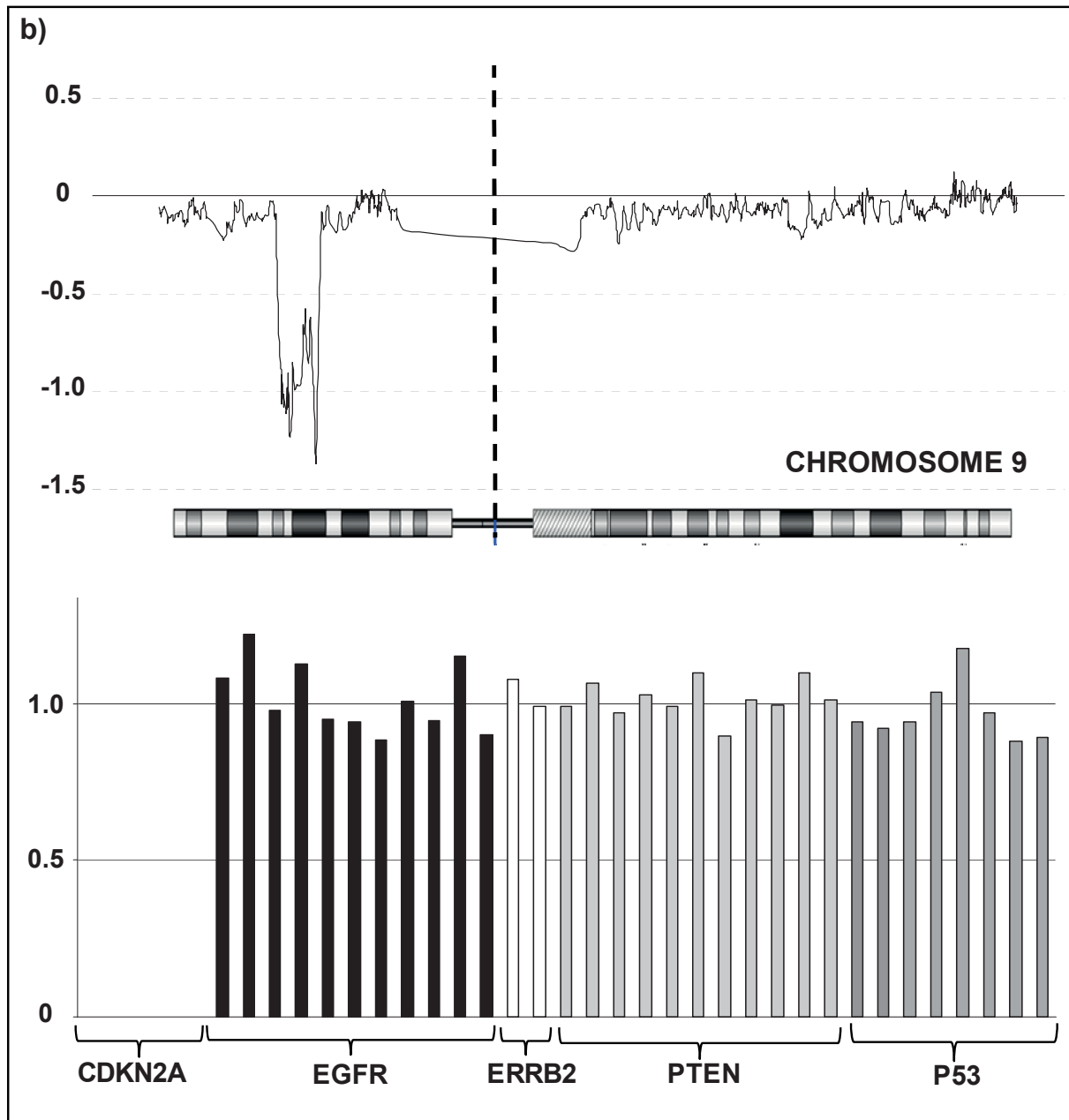


Fig. 3. Homozygous loss detected on chromosome 9 (including *CDKN2A* locus) in two representative cell lines: U118 (a) and LN18 (b). Upper panel: aCGH plot (moving average of \log_2 -genomic ratios over five neighbouring genes); Lower panel: MLPA graph (each bar represents a probe of the MLPA assay).

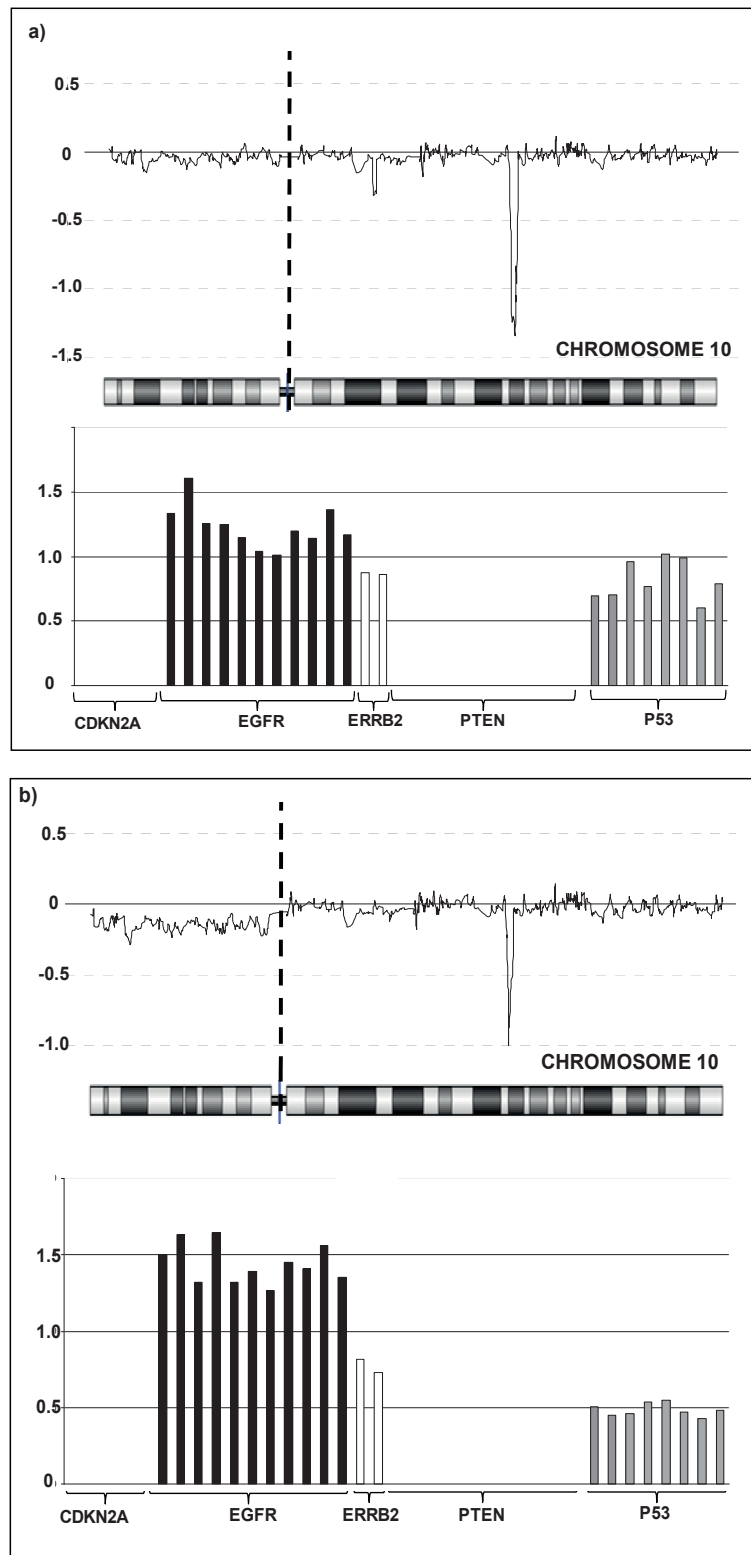


Fig. 4. Homozygous loss detected on chromosome 10 (including *PTEN*) in two representative cell lines: SW1088 (a) and H4 (b). Upper panel: aCGH plot (moving average of \log_2 -genomic ratios over five neighbouring genes); Lower panel: MLPA graph (each bar represents a probe of the MLPA assay).

2.2 Low-level DNA copy number alterations in glioma cell lines

Analyses of the DNA copy number changes in 11 of the most commonly used glioma cell lines revealed higher frequency of genomic losses than gains. While 22.15% of the analyzed probes were lost, only 12.35% of them presented gains. Chromosomes containing frequently gained probes among all the cell lines included chromosomes 7, 16, 17, 19 and 20. Similarly, chromosomes containing frequently lost probes included chromosomes 4, 6, 10, 13, 14 and 18 (Figure 5). Surprisingly, chromosome 9, presenting loss of the *CDKN2A/CDKN2B* locus in most of the cell lines (9 out of 11 cell lines) presented a similar percentage of gained and loss probes. This result may be explained due to this loss is relatively small in most of the cell lines, and to the low-level DNA copy number gain of most of chromosome 9 in SF767 cell line (data not shown).

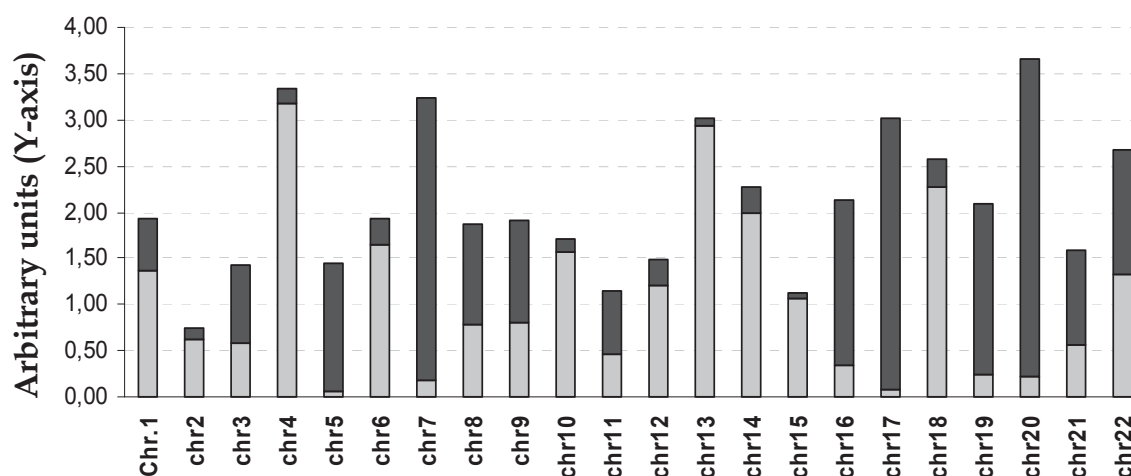


Fig. 5. Percentage of low-level DNA copy number gains (black) and losses (grey) relative to the analyzed probes in the microarray per chromosome.

Chromosome 7 was one of the most gained chromosomes, with complete or almost complete chromosome 7 gain in SW1088 and GOS3 cell lines, or with relative wide regions of gain in H4, U373, U118 or A172 cell lines. Gain of the *EGFR* gene (located at 7p12) was evaluated by MLPA assays, showing *EGFR* low-level copy number gain in 8 out of the 11 cell lines (table 3).

Other gains detected by MLPA analysis were *PI3KCA*, *BRAF* and *BIRC5*. Three of the cell lines presented a *PI3KCA* gain (3q). *PIK3CA* is one of the three genes encoding components of PI3K which is involved in activation of AKT signaling. Amplification of *PIK3CA* has been observed in various types of cancer, including gliomas (Karakas, 2006; Kita, 2007; Vogt, 2006). *BRAF* oncogene (7q34) was gained in five of the cell lines. *BRAF* is a serine/threonine kinase that is frequently activated in many types of cancer by a specific mutation (V600E). In pilocytic astrocytomas, *BRAF* is frequently activated by tandem duplication and rearrangement of part of the gene, resulting in fusion proteins containing the kinase domain (exons 9-18). Activation of *BRAF* through these mechanisms of duplication or fusion is infrequent in diffusely infiltrating astrocytic gliomas (Bar et al, 2008; Riemenschneider et al, 2010). All the cell lines analyzed in this study were obtained from adult patients with high grade gliomas.

BIRC5 or survivin (17q) was gained in five of the cell lines. Survivin, which promotes cell proliferation, angiogenesis and inhibits apoptosis, is frequently overexpressed in proliferating tissues and tumors (Zhen et al, 2005). In gliomas, survivin overexpression is significantly associated with tumorigenesis and progression, and with a worse prognosis of patients (Shirai et al, 2009). Previous studies revealed, as well, BIRC5 gain and overexpression in oligodendroglial tumors (Blesa et al, 2009). High expression of BIRC5 in nervous system tumors have been already reported (Das, 2002; Hogdson, 2009; Sasaki, 2002).

As a summary, at the gene-level, the most represented gains and losses in the 11 analyzed cell lines are shown in table 4.

	CHROMOSOME	GENE NAME	CELL LINE
HOM LOSS	9p21	<i>CDKN2A</i>	U373, U118, SW1088, GOS3, A172, H4, T98, U87, LN18
	10q23	<i>PTEN</i>	A172, SW1088, H4
HEMI LOSS	1p13.2	<i>NRAS</i>	A172, H4
	10q23	<i>PTEN</i>	SF767, GOS3
GAIN	1p13.2	<i>NRAS</i>	U373
	1q32	<i>PI3KC2B</i>	A172
	2q35	<i>IGFBP2</i>	SW1088
	3q26.3	<i>PIK3CA</i>	A172, SW1783, H4
	7p12	<i>EGFR</i>	U373, U118, SW1088, GOS3, A172, H4, T98, SF767
	7q34	<i>BRAF</i>	U87, U373, SW1088, GOS3, T98
	17p11.2	<i>TOM1L2</i>	LN18
	17q25	<i>BIRC5</i>	H4, LN18, T98, U373, SW1783
	21q22.3	<i>RUNX1</i>	H4, A172, T98
A	4q11	<i>PDGFRA</i>	SW1783

Table 3. Summary of gene-specific MLPA-validated copy number alterations (HOM LOSS: homozygous loss; HEMI LOSS: one copy loss; GAIN: low-level copy number gains; A: amplifications).

GAIN		HOMOZYGOUS DELETION	
Gene (location)	Total	Gene (location)	Total
EGFR (7p12)	8	CDKN2A (9p21)	9
BRAF (7q34)	5	CDKN2B (9p21)	8
BIRC5 (17q25)	5	MTAP (& others; 9p21)	6
PI3KCA (3q26.3)	3	BAGE (21p11.1)	4
		PTEN (10q23)	3
		CDKN2C (1p33)	3

Table 4. Summary of the alterations most represented on the eleven glioma cell lines studied. (Total: number of cell lines presenting the alteration described)

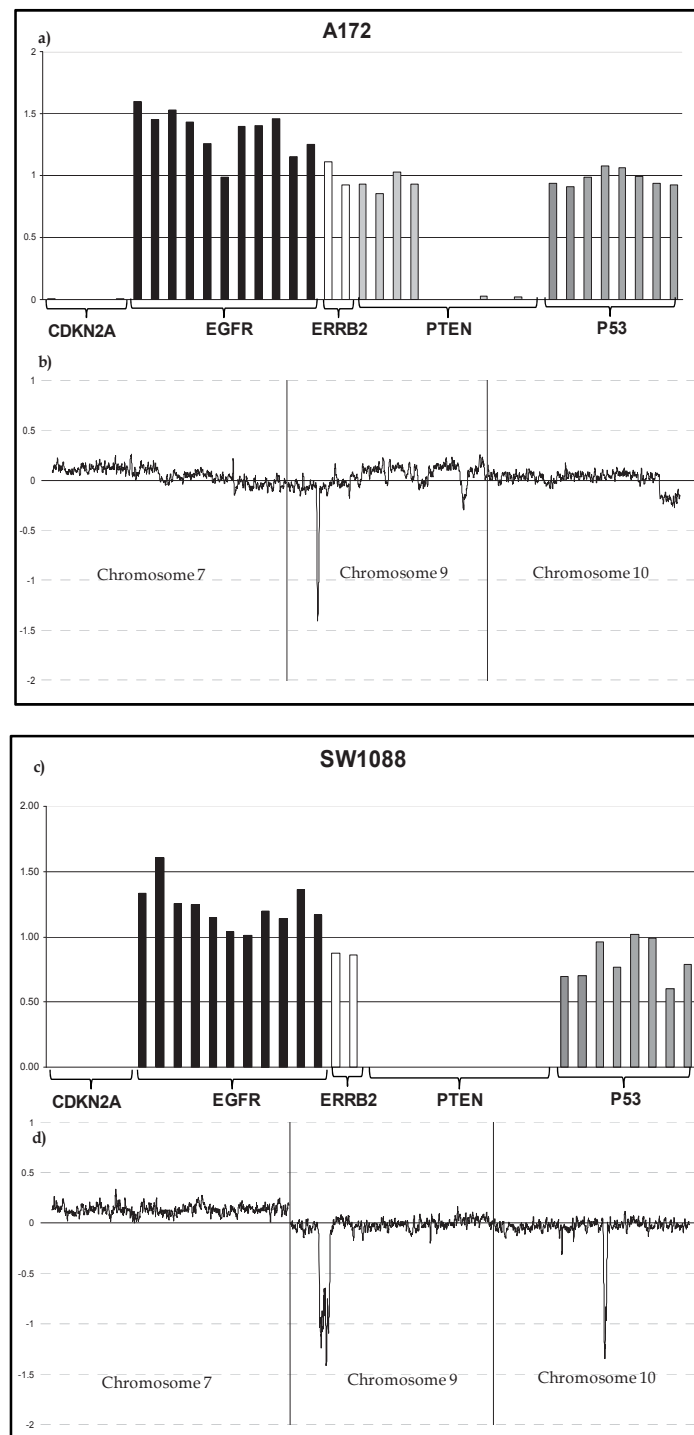


Fig. 6. Genomic analysis of A172 (a, b) and SW1088 cell lines (c, d). a) MLPA analysis (each bar represents a probe of the MLPA assay) showing *EGFR* gain, *CDKN2A* homozygous deletion, and *PTEN* homozygous deletions except for exons 1 and 2. b) aCGH analysis (moving average of log₂-genomic ratios over five neighbouring genes) of chromosomes 7, 9 and 10. c) MLPA analysis showing *EGFR* gain, and homozygous deletions of *CDKN2A* and *PTEN* d) aCGH analysis of chromosomes 7, 9 and 10. Observe that no *PTEN* deletions (10q23.2) were detected in A172 cell line compared to SW1088.

3. Comparison between copy number alterations in glioma cell lines and primary tumors

Gliomas are the most frequent primary brain tumors, and include a variety of different histological tumor types and malignancy grades. High-grade gliomas are those graded as III or IV according to the criteria of the World Health Organization (WHO) classification system (Louis et al, 2007), including anaplastic astrocytoma (WHO grade III) and GBM (WHO grade IV). High-grade gliomas may arise from diffuse astrocytoma WHO grade II or III, or *de novo*, i.e. without evidence of a less malignant precursor lesion. GBM is the most frequent primary brain tumor. Primary GBM manifest rapidly *de novo*, while secondary GBM develops slowly from diffuse or anaplastic astrocytomas.

It is important to note that most of the cell lines used in this study derived from astrocytoma tumors of high-grade (8 cell lines: T98, LN18, U373, SW1088, H4, SW1783, U118, and A172), with the exception of GOS3 cell line that was derived from a high-grade mixed tumor with oligodendroglial component.

From a genetic point of view, progression to malignancy in gliomas is a multistep process, driven by the sequential acquisition and accumulation of genetic alterations. Distinctions between the genetic alterations identified in primary and secondary GBM have been made, with *TP53* mutations occurring more commonly in secondary GBMs and *EGFR* amplifications, and *PTEN* mutations occurring more frequently in primary GBMs. However, none of these alterations sufficiently distinguishes between primary and secondary GBM.

Recently, a comprehensive sequencing and genomic copy number analysis of GBM tumors showed that the majority of the tumors analyzed had alterations in genes encoding components of each of the *TP53*, *RB1*, and *PI3K* pathways, previously known to be altered in GBMs (Parsons et al, 2008). In these tumors, all but one of the cancers with mutations in members of a pathway did not have alterations in other members of the same family, suggesting that such alterations are functionally equivalent in tumorigenesis. Opposite to what is found in primary and secondary GBMs, glioma cell lines usually harbor functional alterations of the three pathways simultaneously (e.g. SW1088, SW1783 or U118, table 5).

Alteration mutations of the tumor suppressor gene *TP53* (located at 17p13.1) and loss of heterozygosity on chromosome arm 17p are frequent in secondary GBM. While *TP53* copy number analysis showed no gains or losses in the cell lines tested, neither by CGH nor by MLPA, point mutations have been reported by the Sanger database in some of the analyzed cell lines (Table 5).

Primary GBM, on another hand, characterises by *EGFR* amplification or overexpression, *PTEN* mutation, trisomy of chromosome 7, monosomy of 10 and genomic gains of 12p, 19q and 20q (Riemenschneider et al, 2010).

Regarding alterations of *PTEN* gen (*PI3K* pathway), loss of chromosome 10 is one of the most frequent alteration in primary GBM tumors (60-80% of cases). While many tumors show loss of one entire copy of chromosome 10, loss of heterozygosity (LOH) studies have reported the involvement of several regions of LOH, suggesting several potential tumor suppressor genes in addition to *PTEN*. The cell lines analyzed in our study frequently presented alteration of *PTEN* gene (nine out of 11 cell lines), either by mutation or genomic loss. Absence of *PTEN* protein expression in these cell lines was confirmed in seven of these cell lines by western blot (data not shown).

Concerning amplifications, *EGFR* high-level copy number gain is the most frequent alteration found in primary GBM. As mentioned before, this alteration is present as double-

minutes, i.e. small and circular fragments of extrachromosomal DNA that are replicated in the nucleus of the cell during cell division but that, unlike actual chromosomes, lack centromere or telomere. This EGFR amplification has not been detected in any of the analyzed glioma cell lines, probably due to the difficulty in maintaining a highly unstable extrachromosomal fragment that lacks centromere, in long-term cultures. A recent report, however, describes another type of EGFR gain in which extra copies (in small numbers) of EGFR are inserted in different loci of chromosome 7 (Lopez-Gines et al, 2010). The presence of this type of gain in glioma cell lines remains to be studied.

	RB pathway		PI3K pathway			TP53 pathway	
	CDKN2A	PTEN	PTEN seq	EGFR	EGFRvIII	Tp53	p53 mut
T98G	del HOMO	N	-	G	No	N	p.M237I
LN18	del HOMO	N	-	N	No	N*	nd
SF767	N	del HEMI	-	G	No	N*	nd
U373	del HOMO	N*	c.723_724insTT	G	No	N	nd
U87MG	del HOMO	N*	c.209+1G>T	N	No	N*	nd
SW1088	del HOMO	del HOMO*	-	G	No	N	p.R273C
H4	del HOMO	del HOMO*	-	G	No	N*	nd
SW1783	N	N*	c.691C>T	N	No	N	p.R273C
U118	del HOMO	N*	c.1026+1G>T	G	No	N	p.R213Q
GOS3	del HOMO	del HEMI	-	G	No	N	nd
A172	del HOMO	del HOMO* [#]	-	G	No	N*	nd

*Protein expression not detected (Western-blot or Immunohistochemistry, data not shown) #deletion except for exons 1 and 2. del HOMO: homozygous deletion; del Hemi: hemizygous deletion; G: Gain; N: No copy number change; No: EGFRvIII mutation not detected; p53 mut: data from the Sanger database; nd: no data from available.

Table 5. Alterations of the RB, TP53 and PI3K pathways.

Thus, at least for what concerns to the EGFR amplification, glioma cell lines seem not to resemble primary tumors. This result contrast to what is found in breast cancer cell lines, where amplification of *ERBB2* (17q12) is detected indeed more frequently in cell lines that in primary tumors (Tsuji et al, 2010). Of note, amplification of *ERBB2* takes place within homogeneously staining regions, where the extra copies of the gene are integrated within the chromosome, thus allowing its maintenance in established cell lines.

Similarly, other amplifications reported in primary GBM tumors have not been found in these cell lines, such as those of 1q (*MDM4*, *PIK3C2B*), 7q (*MET*, *PEX1*, *CDK6*), 12p (*CCDN2*) 12q (*MDM2*, *GLI*, *CDK4*) or 13q (Rao et al, 2010; Ruano et al, 2006). The only common amplification detected in glioma cell lines and tumors was that of 4q (*PDGFRA*) which was detected in SW1783 cell line. *PDGFRA* encodes for a cell surface tyrosine kinase receptor of the members of the platelet-derived growth factor family. These growth factors are mitogens for cells of mesenchymal origin and activate intracellular signaling through the MAPK, PI3K and PKCgamma pathways with roles in the regulation of many biological processes including embryonic development, angiogenesis, cell proliferation and differentiation. On the other hand, to our knowledge, amplifications of 10q and 19p detected in SF767 cell line have not been reported before in glioma tumors.

Digital karyotyping for eight tumor-derived cultured samples and one bulk tumor was used by Rao and coworkers (2010) to describe genomic alterations in GBM. This group described

amplifications in 1q, 7p, 8q and 12q, and homozygous deletions in 1p, 9p and 9q. However 7p11.2-12.1 (*EGFR*), 8q24.21 (*MYC*) and 12q15 (*MDM2*) amplifications were found just in case of the tumor sample, consistent with previous observations that adherent GBM cells tend to lose *EGFR* amplification during culturing. The most frequent amplifications found by this group was 12q13.3-q14.1, which targeted *GLI1* and *CDK4* oncogenes, affecting 3 samples. Two of the samples showed amplification of *PI3KC2B* and *MDM4* in 1q32.1. Table 6 shows comparison of our results with those published by Rao and coworkers (2010). Low-level copy number gains (e.g. *PI3KC2B*: A172 cell lines; *EGFR*: 8/11 cell lines) but not amplifications were detected in the cell lines.

The p16ink4a/*CDK4*/*RB1* pathway is important for the control of progression through G1 into the S phase of the cell cycle. In GBM tumors, alterations affecting this pathway are found at an overall frequency of 40-50% (Louis et al, 2007). Homozygous deletions affecting *CDKN2A* locus (9p21) were described by digital karyotyping in 44% of cultured samples (four out of nine) (Rao et al, 2010). Our study reveals 82% (9/11) and 73% (8/11) of cell lines carrying homozygous deletions for *CDKN2A* and *CDKN2B* genes, respectively (Table 6).

Chromosome band	Target oncogene	Rao % (n=9)	Our group % (n=11)
Amplifications/Gains (G)			
1q32.1	PIK3C2B	22	9 (G)
1q32.1	MDM4	22	0
7p11.2-12.1	EGFR	11	73 (G)
8q24.21	MYC	11	45 (G)
12q13.3-q14.1	GLI1,CD4	33	18 (G)
12q14.1	Unknown	22	9 (G)
12q15	MDM2	11	0
Homozygous deletions			
1p36.31-p36.23	TP73, LRRC47, DFFB	33	18
9p21.3-22.3	CDKN2A, CDKN2B	44	82, 73
9q34.3	CACNA1B	44	0

Table 6. Comparison of results obtained by Digital Karyotyping (Rao et al, 2010) with aCGH alterations observed in glioma cell lines. Only amplification data from Rao's study was available.

Finally, regarding the number of DNA copy number alterations in cell lines, the lost probes almost doubled the gained ones, with an average of losses and gains per cell line of 9,908 and 5,072 probes, respectively. This result contrast to what is observed in primary GBM tumors, having similar numbers of gains and losses (Ruano et al, 2006). Accordingly, similar results were obtained in tumor-derived cell lines from other histologies (Greshock et al, 2007) and specifically in breast cancer cell lines (Tsuji et al, 2010; Naylor et al, 2005), with more alterations found in cell lines than in tissue specimens, as a general trend. In fact, genomic losses in breast cancer cell lines almost doubled the gains (Tsuji et al, 2010). These observations may suggest the accumulation of genomic alterations in long-term cultures that are not present in primary tissues.

4. Cell culture specific aberrations

Several of the frequent genomic alterations detected in glioma cell lines are not found in primary tumors, suggesting that some of the commonly seen alterations *in vitro* could be artifacts secondary to the selection pressure for optimal cell growth *in vitro* following years of passage. This observation has been reported previously in gliomas (Li et al, 2008), but the presence of acquired locus-specific alterations in culture has also been recognized in tumors and cell lines of other histologies (Greshock et al, 2007). For example, genome-specific copy number alterations of chromosomes 5 (gained), 8, 11 and 18 (lost) in glioma cell lines have been attributed exclusively to the phenotype of established cell lines. Furthermore, other copy number alterations not commonly found in cell lines, such as those of specific areas of chromosomes 2, 3, 6 and 8 have been rarely observed in primary tumors.

Our findings (Figure 5) have identified areas of low-level gain on chromosomes 5, 16 and 17 affecting between 5 and 7 cell lines, which do not feature GBM tumors. In addition, areas of loss of chromosomes 6, 8, 11, and, most importantly, loss of chromosome 18 have been identified in most of cell lines. These alterations seem to be culture-associated changes present in cell lines and suggest a genomic instability phenotype in established cell lines that is not present in primary tumor tissues.

Absence of chromosome 13 deletions in glioma cell lines, which were commonly found in primary GBMs, was reported by Li and coworkers (2008) as a striking discrepancy between cell lines and tumors. Our study, however, did detect chromosome 13 losses (Figure 5). In the present study, complete loss of chromosome 13 was identified by aCGH in H4, LN18, U373, SW1088 and U118 cell lines, while partial loss was detected in U87, SF767, SW1783 and A172 cell lines. No loss was observed in T98 and GOS3 cell lines. Curiously, cell lines analyzed in common by our study and that of Li, had partial chromosome 13 loss in our study and partial chromosome 13 LOH in the study of Li and coworkers (U87 and A172), or no chromosome 13 loss in both studies (T98).

5. Material and methods

5.1 Cell lines and cell culture

The human glioma cell lines GOS3, U87MG (U87), A172, SW1783, U118 MG (U118), T98G (T98), SW1088, H4, LN18, U373MG (U373) and SF767WL (SF767) were kindly provided by Dr. Velasco (Complutense University of Madrid, Spain) or Dr. Setién (Catalan Institute of Oncology, Spain). These cell lines were maintained in RPMI medium containing 10% FBS (Gibco, Grand Island, NY) in standard culture conditions. Total DNA and RNA were extracted from cell cultures according to standard phenol-chloroform and Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) techniques, respectively. Nucleic acids obtained were quantified using NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE).

5.2 Comparative genomic hybridization

Copy number analyses of the 11 glioma cell lines were screened by array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) in the Microarrays Analysis Service of the CIPF (Centro de Investigación Principe Felipe, Valencia). "Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis" protocol Version 4.0 (Agilent Technologies, Palo Alto, California USA. p/n G4410-90010) was followed to obtain labeled DNA. 2000 ng of DNA from samples and reference DNA (pool of sex-matched normal brain DNA) was

fragmented and labeled (Cyanine 3-dUTP for the cell lines DNA and cyanine 5-dUTP for the reference DNA) according to the “Agilent Genomic DNA labeling kit plus” protocol. Labeled DNA was hybridized with Human Genome CGH Microarray 44 k (Agilent p/n G4426B-014950) containing 45,214 probes with 42,494 distinct biological features. Arrays were scanned in an Agilent Microarray Scanner (Agilent G2565BA). Data was analyzed using DNA Analytics 4.0 CGH Module (Agilent Technologies). Genomic alterations were detected using an ADM-2 algorithm with two different filters: one, used to detect low level alterations, detects those alterations affecting to three consecutive probes with a ratio above or below to 0.25; the other, used to obtain amplifications or homozygous deletion, included in 2.1 section, detects only three consecutive probes above or below a ratio of 1.0.

5.3 MLPA analysis

Specific gene alterations were validated by Multiple ligation probe assay experiments (MLPA®, Mrc-Holland, The Netherlands) with SALSA MLPA kit P105 Glioma-2 for EGFR, PTEN, CDKN2A and p53. Besides, SALSA® MLPA® kit P173 was used to detect copy number alteration of several genes which are frequently altered in several tumors, such as: BCL2L11, BIRC5, BRAF, ERBB4, JAK2, NRAS, PDGFRA, PIK3C2B, PIK3CA. MLPA assays were carried in total DNA from the eleven cell lines, obtained by standard methods, following manufacturers’ conditions. Polymerase chain reaction products were separated and quantified on an ABI PRISM 310 DNA sequencer (Applied Biosystems), and electropherograms were analyzed using GeneMapper v.3.7 software (Applied Biosystems). Three nontumor reference samples were included in each run.

5.4 EGFRvIII analysis

Presence of EGFR vIII variant was determined by RT-PCR from total RNA of the cell cultures. cDNA was obtained from 1µg of total RNA using the Superscript System (Gibco®). Primers and PCR conditions used were previously described (Lee et al, 2006). Amplifications products were visualized in bromure ethidium 2% agarose gel.

5.5 EGFR and PTEN sequence analysis

Mutations in exons 1 to 9 of PTEN gene and 18 to 21 of the EGFR gene were screened by direct sequencing in an ABI PRISM 310 DNA Analyser (Applied Biosystems) according to the manufacturer’s instructions. PCR primers and conditions for EGFR amplification were previously described (Hsieh et al, 2006).

Exon	Upstream primer 5'-3'	Downstream primer 5'-3'	Annealing T (°C)
1	TCCTCCTTTTCTTCAGCCAC	GAAAGGTAAAGAGGAGCAGCC	56
2	GCTGCATATTTCAATCAAATAA	ACATCAATATTTGAAATAGAAAATC	54
3	TGTTAATGGTGGCTTTTG	GCAAGCATACAAATAAGAAAAC	56
4	TTCCTAAGTGCAAAAGATAAC	TACAGTCTATCGGGTTTAAGT	56
5	TTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTAT	GAAGAGGAAAGGAAAAACATC	51
6	AGTGAAATAACTATAATGGAACA	GAAGGATGAGAATTTCAAGC	54
7	AATACTGGTATGTATTTAACCAT	TCTCCAATGAAAGTAAAGTA	56
8	TTTTTAGGACAAAATGTTTCAC	CCCACAAAATGTTTAATTTAAC	54
9	GTTTTCAATTTAAATTTTCTTTC	TGGTGTTTTATCCCTCTTG	54

Table 7. PTEN sequence and annealing temperature used for PCR reactions of nine exon primers

6. Conclusion

High-level copy number alterations have been observed in cell lines of different sources such as breast, melanoma or lung tumors. Some authors suggest that some of the commonly seen alterations in the glioma cell lines can be due to the *in vitro* cell growth process following long term passage cultures. These observations are based on (i) the comparison of the genomic alterations of glioma and other non glioma cancer cell lines: some of these alterations are common between established cancer cell lines from different origin and uncommon in glioma tumors (Li et al, 2008). ii) Differential expression analyses suggest that established cancer cell lines share an underlying molecular similarity more closely related to their *in vitro* culture conditions than to their original tumor type of origin. Although some functional signalling pathways are up-regulated both in glioma tumors and glioma cell lines (epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor receptor, p53, PI3K pathway), there are some others gene expression sets whose up-regulation is just seen in cancer cell lines (cell cycle, proteasome activity, purine metabolism, mitochondrial activity). Our findings show that established glioma cell lines and glioma tumours have differences in genomic alterations, concluding that glioma cell lines may not be such an accurate representation or model system for primary gliomas as would be desirable. As opposed to primary tumors, glioma cell lines did not present either *EGFR* amplification, or presence of *EGFRvIII* variant, events that are frequent in high-grade gliomas. Homozygous *CDKN2A* deletion was frequently observed in glioma cell lines, as occur in cell lines derived from other histologies and in glioma tumors. Chromosome 7 gain and *PTEN* deletions represent the most specific glioma alterations present in these cell lines.

The easy of management of glioma cell lines make these cell lines as good candidate models for exploring basic glioma biology and for the use and discovery of therapeutic agents in preclinical screens. However, it is of interest that cell cycle-related alterations of gene expression are importantly affected in these cell lines, and that most drugs have been tested for cytotoxicity against rapidly dividing cells. Therefore, selection bias toward the identification of therapeutic agents involved in molecular functions more related to the long term culture than to glioma biology could occur.

On the other hand, many efforts are being done to create adequate culture conditions that allow the maintenance of the genomic profiles of the original tumor, such as glioma stem-like cell cultures, which may be more representative of their parent tumors. Several reports have demonstrated that glioma cultures under serum free conditions and stimulated with mitogens, epidermal growth factor and fibroblast growth factor, grow as neurospheres and maintain a phenotype and genotype closer to that typical of primary tumours compared to traditional serum-derived cell lines and culture techniques (Fael Al-Mayhany et al, 2009; Ernst et al, 2009). Perhaps, the standardization of this culture method could enhance and improve the research with cell lines in brain tumors.

7. Acknowledgment

We gratefully acknowledge Drs. G. Velasco and F. Setien for kindly providing cell lines. This work was partially supported by grants G-2009_E/04 from Fundación Sociosanitaria de Castilla-La Mancha and the Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha; and FIS PI07/0662, FIS10/01974 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

8. References

- Bar, E.E, Lin, A., Tihan, T., Burger, P.C. & Eberhart C.G. (2008) Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (September 2008) Vol. 67, No. 9, pp 878-887. ISSN 0022-3069
- Blesa, D., Mollejo, M., Ruano, Y, Rodriguez de Lope, A., Fiaño, F., Ribalta, T., García, J., Campos-Martin, Y., Hernandez-Moneo, J., Cigudosa, J., Melendez, B. (2009) Novel genomic alterations and mechanisms associated with tumor progression in oligodendroglioma and mixed oligoastrocytoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. Vol.68, No.3, (March 2009), pp 274-285 ISSN ISSN 0022-3069
- Das, A., Tan, W.L., Teo, J. & Smith, D.R.(2002) Expression of survivin in primary glioblastomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, (June 2002), Vol. 128, No. 6, pp 302-306. ISSN: 1432-1335
- Ernst, A., Hofmann, S., Ahmadi, R., Becker, N., Korshunov, A., Engel, F., et al. (2009). Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival. *Clinical Cancer Research*. Vol. 15, No. 21, (November 2009), pp 6541-6550, ISSN 1078-0432
- Fael Al-Mayhania, T., Balla, S., Zhaoa, J., Fawcetta, J., Ichimurab, K., Collins, P. & Watts, C. (2009) An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours . *Journal of Neuroscience Methods* (July 2008), Vol.176, pp 192-199. ISSN 0165- 0270
- Greshock, J., Nathanson, K., Martin, AM, Zhang, L., Coukos, G., Weber, BL. & Zaks, Z. (2007) Cancer Cell Lines as Genetic Models of Their Parent Histology: Analyses Based on Array Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research*. Vol. 67, No. 8, (April 2007), pp. 3594-3600, ISSN 0008-5472
- Hsieh, MH., Fang, YF., Chang, WC., Kuo, H., Lin, S.Y., Liu, H., Liu, C., Chen, HC., Ku, Y., Chen, Y.T., Chang, Y.H., Chen, Y.T., His, B., Tsai, S., Huang, S.F. (2006) Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* (September 2006), Vol.53, No.3, pp 311-322. ISSN 0169-5002
- Karakas, B., Bachman, K.E. & Park, B.h. (2006) Mutation of the PI3KCA oncogene in human cancers *British Journal of Cancer* (January 2006), Vol. 94, pp 455-459, ISSN 1532-1827
- Kita, D., Yonekawa, Y., Weller, M. & Ohgaki, H. (2007) PI3KCA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica* (January 2007), Vol. 113, pp 295-302. ISSN 1432-0533
- Lee, J., Vivanco, I., Beroukhim, R., Huang, J., Feng, W., DeBiasil, R. et al. (2006) Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLOS Medicine* (December 2006), Vol. 3, No.12. pp 2264-2273. ISSN 15491676
- Li, A., Walling, J., Kotliarow, Y., Center, A., et al. (2008) Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Molecular Cancer Research* (January 2008), Vol. 6, No.1, pp 21-30. ISSN 1541-7786

- Lopez-Gines, C., Gil-Benso, R., Ferrer-Luna, R., Benito, R., Serna, E., Gonzalez-Darder, J., Quilis, V., Monleon, D., Celda, B., Cerdá-Nicolas, M. (2010) New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathology* (June 2010), Vol.23, No.6, pp 856-865. ISSN 0893-3952
- Louis, DN., Ohgaki, H. Wiestler, OD., Cavenee, WKK. (2007). *WHO classification of tumours of the central nervous system*, (3rd edition), IARC Press, ISBN 9789283224303, Lyon, France.
- Naylor, T.L., Greshock, J., Wang, Y., Colligon, T., Yu, Q.C., Clemmer, V., Zaks, T.Z., Weber, B.L. (2005) High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast Cancer Research* (October 2005), Vol. 7, No.6, pp 1186-1198, ISSN 1465-5411
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, LA., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R., Marie, S., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G., Bigner, D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* (September 2008) Vol.26, No.321, pp 1807-1812. ISSN 1095-9203
- Rao, S., Edwards, J., Joshi, A., Siu, M., Riggins, G (2009) A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *Journal of Neuro-oncology* (July 2009) Vol. 93, pp 169-179. ISSN: 1573-7373
- Riemenschneider, MJ., Jeuken, JWM., Wesseling, P., Reifenberger, G. (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica*, (July 2010) Vol. 120, No. 5 , pp 567-584, ISSN 1432-0533
- Ruano, Y., Mollejo, M., Ribalta T., et al. (2006) Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Molecular Cancer*. (September 2006), Vol. 5, No.39, pp 44-55, ISSN 1476-4598
- Sasaki, T., Lopes. M.B., Hankins, G.R. & Helm, G.A. (2002) Expression of surviving, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathologica* (July 2002), Vol. 104, No.1, pp 105-109, ISSN 1432-0533
- Sharma, SV., Haber DA. & Settleman, J.(2010) Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, (April 2010), Vol. 10, No. 4, pp.241-253. ISSN:1474-1768
- Shirai, K., Suzuki, Y., Oka, K., Noda, S., Katoh, H., Suzuki, Y., Itoh, J., Itoh, H., Ishiuchi, S., Sakurai, H., Hasegawa, M., Nakano, T. (2009) Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 91, No.3, (February 2009) pp 353-358. ISSN: 1573-7373
- Vogt, P.K., Bader, A.G. & Kang, S. (2006) PI3-Kinases, Hidden Potentials Revealed. *Cell cycle* (May 2006), Vol. 5, No.9 pp 946-949, ISSN: 1551-4005

Zhen, H., Zhang, X., Hu, P., Yang, T., Fei, Z. et al. (2005) Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* (April 2005) Vol. 104, pp 2775-2783, ISSN: 1097-0142