



Anàlisi “ex vivo” de mecanismes d’inducció d’apoptosi i resistència al tractament en gliomes malignes

Ruth Villalonga Planells

ADVERTIMENT. La consulta d’aquesta tesi queda condicionada a l’acceptació de les següents condicions d’ús: La difusió d’aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d’investigació i docència. No s’autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d’un lloc aliè al servei TDX. No s’autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you’re accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it’s obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
Programa de Doctorat "Biomedicina"

Ruth Villalonga Planells

**Anàlisi "ex vivo" de mecanismes d'inducció d'apoptosi i
resistència al tractament en gliomes malignes**

DIRECTORS DE LA TESI

Dra. Avelina TORTOSA I MORENO
Dra. Josefa GIMÉNEZ BONAFÉ

Data de lectura: 14 de setembre de 2011

Discussió

El GBM és una de les neoplàsies més agressives dels adults i malgrat els esforços realitzats en millorar el seu tractament tant des del punt de vista de noves tècniques en neurocirurgia, millores en el tractament amb radioteràpia i estudis clínics amb noves molècules, la supervivència dels pacients continua sent desfavorable amb una mitjana de 12-14 mesos després del diagnòstic (Stupp R, 2005). Els treballs que conformen aquesta tesi han permès establir cultius primaris de GBM com a model *ex vivo* per analitzar la resposta a nous tractaments en glioblastoma humà això com ampliar els coneixements en la resposta *in vitro* a noves teràpies (Nultina-3a i YM155) en línies cel·lulars humanes i cultius primaris de glioblastoma.

1. Establir cultius primaris de gliomes malignes a partir de mostres humanes en fresc

El primer dels objectius de la present tesi doctoral va ser l'establiment de cultius primaris de glioblastoma com a model *ex vivo* per a l'estudi de la resposta al tractament amb noves molècules. Aquest abordatge comportaria un pas intermig entre l'ús de línies cel·lulars comercials i models animals *in vivo*. Es varen establir 2 tipus de cultius cel·lulars: cultius primaris sembrats en un medi amb sèrum i cultius primaris de TICs (Tumor Initiating Cells) desenvolupades en un medi lliure de sèrum.

Les línies cel·lulars comercials formen part de la rutina d'un laboratori de biologia molecular, i el seu ús permet múltiples estudis entre els que s'inclouen l'anàlisi de la resposta a noves substàncies o teràpies. La manipulació de les línies cel·lulars al laboratori és relativament fàcil degut a que tenen un ritme de creixement continu i regular, el que permet l'obtenció d'un gran nombre de cèl·lules en poc temps. El treball amb línies cel·lulars facilita l'estudi de diversos paràmetres en unes condicions totalment regulades (Bigner D, 1981). Les línies cel·lulars, però, mostren una adaptació en el temps a la proliferació cel·lular *in vitro*, en part deguda a la pressió selectiva de l'entorn, que les condueix fins a un estat d'homogeneïtzació cel·lular que sovint acaba derivant en una pèrdua de les característiques

pròpies del tumor original del qual derivaven, a més de l'adquisició de noves mutacions genètiques i canvis en el nombre de cromosomes (Vogel TW, 2005).

Per tal d'evitar aquests problemes de les línies cel·lulars estables, diversos laboratoris han treballat en models de cultius primaris. Els cultius primaris aporten l'avantatge de reflectir de manera més fidedigne les característiques i funcionament del tumor de procedència. El fet d'establir cultius primaris de glioblastoma ha permès l'estudi *ex vivo* de la sensibilitat a la quimioteràpia i a la radioteràpia (Gil-Salú JL, 2002). L'estudi de patrons d'expressió proteica en glioblastoma va posar de manifest les diferències existents entre cèl·lules de cultius primaris i línies cel·lulars, on el guany o la pèrdua proteica com a conseqüència de la pressió que genera l'ambient, influirà en el creixement cel·lular, en la resistència terapèutica, la capacitat d'invasió i la migració (Vogel TW, 2005). Per evitar la pèrdua de característiques semblants a les del tumor d'origen, és necessari a l'hora de treballar amb cultius primaris limitar el nombre de passes màxim per evitar l'adquisició de noves alteracions gèniques. La importància de treballar a passes baixes es posa de manifest en un estudi realitzat per De Witt i col·laboradors on mesurant per microarray els canvis genòmics en cultius primaris de glioblastoma al llarg del temps, van observar que l'estabilitat genòmica varia progressivament després de 12 setmanes de cultiu (De Witt PC, 2007). Amb la finalitat d'evitar canvis en el comportament biològic dels cultius primaris amb sèrum utilitzats durant la realització del present treball de tesi, sempre vàrem avaluar la resposta al tractament (Nutlina-3a o YM155) dintre dels 6 primers passes dels cultius. D'aquesta manera, la morfologia, el ritme de creixement i la resposta a un determinat fàrmac es va mantenir estable en cada cultiu analitzat.

En l'establiment dels cultius primaris, tant amb medi amb sèrum com amb medi sense sèrum vàrem identificar una sèrie paràmetres que limitaven el seu èxit. En primer lloc, el factor limitant més important va ser la histologia. Sols les mostres amb un diagnòstic histològic de glioblastome multiforme varen créixer correctament en cultiu tant amb sèrum com sense sèrum. Cap altre de les histologies de glioma maligne (astrocitoma anaplàstic, oligodendroglioma anaplàstic i oligoastrocitoma anaplàstic) que vàrem intentar cultivar van créixer amb èxit. Per tant, podem concloure que, en les condicions de cultiu utilitzades en el nostre laboratori, sols es possible establir cultius primaris de glioblastoma multiforme.

El segon factor limitant pel creixement dels cultius primaris en les dues condicions avaluades va ser la mida de la mostra. Les mostres procedents de biòpsia esterotàxica o amb un pes inferior a 100 mg no varen créixer de forma adequada en cultiu. Per tant, és important sensibilitzar als clínics en quan a la necessitat de, sempre que sigui possible, obtenir la major

quantitat de mostra tumoral possible per establir els cultius primaris, tenint en compte que l'obtenció del cultius primaris mai ha de limitar la quantitat de mostra que el patòleg necessita per efectuar el correcte diagnòstic del pacient. En aquest sentit, és molt important la coordinació de totes les persones implicades: neurocirurgians, patòlegs i l'investigador que durà a terme el cultiu primari. Voldríem destacar que aquesta tesi ha permès establir una col·laboració estable entre l'HUB i la Universitat de Barcelona per a dur a terme cultius primaris de glioblastoma. Aquesta col·laboració ha permès, a més, poder correlacionar els resultats obtinguts *ex vivo* amb paràmetres clínics, neuroradiològics i de seguiment dels pacients amb glioblastoma multiforme.

El tercer factor limitant per a l'establiment de cultius primaris ha estat la de necrosi de la mostra tumoral. El GBM és un tumor que es caracteritza per la presència de necrosi macroscòpica i microscòpica, el que comporta que, malgrat la mida de la mostra sigui gran, en alguns casos el nombre de cèl·lules viables és menor a l'esperada. Aquest factor s'ha superat, en part, gràcies a la estreta col·laboració amb el patòleg, el qual seleccionava la part de la mostra menys necròtica macroscòpicament. A més, en el laboratori l'ús de tampó de lisi de eritròcits també va disminuir l'impacte negatiu de la necrosi.

Una altre factor limitant observat en alguns dels cultius primaris establerts va ser un alentiment progressiu del creixement fins a cessar completament la proliferació cel·lular i aparèixer signes morfològics de senescència. El concepte de senescència replicativa va ser desenvolupat per Hayflick i Moorehead l'any 1961, els quals van observar que les cèl·lules en cultiu després d'un nombre finit de divisions experimentaven una parada de cicle cel·lular irreversible que impedia la proliferació (Hayflick L, 1961). Una possible explicació de l'activació de senescència en els cultius primaris podria estar relacionada amb el fet de tractar-se de línies no immortalitzades a diferència de les línies cel·lulars, i això podria condicionar un nombre limitat de divisions per la pèrdua d'activitat telomerasa (escurçament telomèric) que finalment conduiria a l'activació de la senescència. No obstant, el grup de Dipascuale i col·laboradors va observar que a mesura que les cèl·lules adquireixen un nombre més elevat de passes, la taxa de creixement torna a augmentar en línies cel·lulars que provenien de cultius primaris (Dipascuale B, 1990). Aquest fenomen podria estar relacionat amb la recuperació de l'activitat telomerasa observada en alguns cultius primaris després de molt passes, donant lloc a la immortalització dels mateixos (Lee J, 2006). De totes formes, és important destacar que, tal com ja s'ha comentat, si els cultius primaris és mantenen durant un període temps prolongat, augmenta la possibilitat d'adquirir noves alteracions genètiques i cromosòmiques que

l'allunyarien del tumor original del qual procedeixen (Lee J,2006) i per tant es perdria l'avantatge d'utilitzar un cultiu primari enfront una línia comercial establerta.

Finalment voldríem fer referència a factors limitant no relacionats amb el propi cultiu, sinó amb la manipulació del mateix o amb altres factors externs com les sobreinfeccions bacterianes o de fongs, i problemes derivats d'un mal funcionament dels aparells de cultiu. En quan a la vulnerabilitat dels cultius primaris a les contaminacions bacterianes o per fongs cal tenir en compte que aquests cultius tenen una taxa de proliferació baixa el que comporta la necessitat que el mateix cultiu es mantingui durant períodes llargs a l'incubador, augmentant la probabilitat de contaminació. En aquest sentit és molt recomanable i necessari extremar les mesures higièniques a l'hora de manipular-los.

En relació als cultius de cèl·lules iniciadores de tumors o TIC en medi sense sèrum, una de les limitacions més importants és el petit nombre de cèl·lules amb aquesta capacitat dins de la massa tumoral. Així, en un GBM no totes les cèl·lules disposen de la mateixa capacitat per proliferar i mantenir el creixement tumoral i només una petita subpoblació té l'habilitat de dividir-se i autorenovar-se (Singh SK, 2004). El grup de Galli i col·laboradors, van observar que aquestes cèl·lules aïllades de GBMs i cultivades *in vitro* tenien les característiques que defineixen a una cèl·lula mare (autorenovació, multipotencialitat i generació de diferents progenitors) a més de ser capaces d'iniciar tumors al injectar-les en ratolins immunodeficients. Els tumors que creixien en els ratolins recapitulaven las característiques histològiques dels glioblastomes originals (Galli R, 2004).

El descobriment de les TIC va representar la identificació d'una nova diana terapèutica per a l'aplicació de substàncies noves o clàssiques. Un dels atractius d'aquest tipus cel·lular és la resistència inherent a fàrmacs (Morrison R, 2011), probablement deguda, entre altres, a una alta expressió de proteïnes ABC (ATP binding cassette) les quals bloquegen el pas intracel·lular de fàrmacs o augmenten la seva expulsió (Vescovi AL, 2006; Dean M, 2005). A més, diversos estudis demostren que les TICs presenten una elevada resistència al tractament amb radiacions ionitzants (Bao S, 2006; Wang J, 2010; Zhuang W, 2011; Zhuang W, 2011). Per altra banda, la inducció de la diferenciació de les TICs a través de diferents substàncies podria representar una nova aproximació per al tractament dels glioblastomes. En aquest sentit, estudis previs han demostrat que el tractament de TICs de glioma amb BMP4 (Piccirillo SJ,2006) o amb àcid retinoic (Campos B, 2010; Wang J, 2010) va induir la diferenciació de les TIC i va disminuir la seva capacitat proliferativa i d'inducció de tumors *in vivo*. Per tant, els

cultius de TIC poden representar un model *ex vivo* per a l'estudi de la resposta al tractament amb radioteràpia, quimioteràpia o noves molècules en el GBM.

Un dels aspectes limitant d'aquesta tesi en quan a l'establiment de cultius primaris de TIC és el fet de no haver pogut comprovar mitjançant la injecció en ratolins immunodeprimits la capacitat d'induir tumors de les TIC cultivades. Aquesta metodologia, donada la seva complexitat i el fet que per a la realització d'aquesta tesi sols es varen utilitzar cultius primaris amb sèrum, es va posposar per a la seva realització en un futur en el nostre laboratori.

2. Estudiar l'efecte del l'inhibidor de MDM2 Nutlina-3a en línies cel·lulars i cultius primaris de glioblastoma i avaluar la seva capacitat de radiosensibilització.

La millora de les teràpies en càncer ha permès conduir al desenvolupament de nous compostos dianes de canvis moleculars presents en els tumors. *TP53* és el gen més freqüentment mutat en càncers humans. En els glioblastomes primaris, que representen més de 90% del glioblastomes, s'observa la presència de mutacions en el gen *TP53* o deleció homocigòtica de 17p en menys del 30% casos. En els glioblastomes secundaris, que representen entre un 5-10% del total de glioblastomes la presència de mutacions en p53 es situa al voltant del 65% (Ohgaki H, 2007; Kanu OO, 2009,). El tractament amb inhibidors de MDM2 podria ser una nova opció terapèutica pels pacients amb glioblastoma.

Les Nutlines prevenen la unió de p53 al seu regulador negatiu MDM2, estabilitzant p53 i activant la via de senyalització *downstream* de p53 tant *in vivo* com *in vitro* (Vassilev LT, 2004). Els resultats de l'objectiu 2 demostren que Nutlina-3a estabilitza i activa la proteïna p53 en línies cel·lular de glioblastoma, així com també en cultius primaris de glioblastoma amb el gen *TP53* wt, on promou l'aturada de cicle cel·lular, apoptosi i senescència. A més, els resultats també indiquen que les cèl·lules de glioblastoma amb p53 wt aturen el cicle cel·lular com a primera mesura a la resposta a la inhibició de MDM2, mentre que la inducció d'apoptosi varia substancialment entre les diferents mostres avaluades. De fet, aquests resultats concorden amb estudis previs on la activitat antitumoral de Nutlina-3a va ser demostrada en una gran

quantitat de cèl·lules neoplàsiques de tumors sòlids (Logan IR, 2007; Drakos E, 2007; Vanderborght A, 2006) i tumors hematològics (Coll-Mulet L, 2006; Stuhmer T, 2005; Kojima K, 2005) amb p53 wt. En tumors sòlids l'efecte més comú va ser l'aturada de cicle cel·lular. Així, els resultats obtinguts demostren que, en cèl·lules de glioblastoma, Nutlina-3a induïx primer una aturada de cicle cel·lular, i posteriorment senescència i, en menor grau, apoptosi.

Els resultats proporcionen evidències directes que tant l'aturada en el cicle cel·lular, com la senescència i l'apoptosi induïda pel tractament amb Nutlina-3a són conseqüència de l'activació de la via de p53. p53 promou l'aturada cel·lular en la fase G1 a través de la inducció de l'expressió de la proteïna p21 (Hofseth LJ, 2004). En cèl·lules de glioblastoma amb p53 wt, els nivells de les proteïnes p53 i p21 incrementen amb el tractament amb Nutlina-3a. A més, la silenciament de l'expressió de p53 mitjançant l'ús de siRNA va restaurar la viabilitat cel·lular i va provocar una disminució dels nivells de p21 a valors basals. La silenciament de p53 també va disminuir els nivells d'apoptosi i la inducció de les proteïnes proapoptòtiques PUMA i caspasa 3 activa, demostrant que l'aturada de cicle i l'apoptosi induïda per la Nutlina-3a eren dependents de p53. El fet que la línia cel·lular T98G i els cultius primaris de glioblastoma amb un p53 mutat siguin resistents al tractament amb Nutlina-3a reforça el concepte abans comentat.

La inhibició de MDM2 també induïx senescència en cèl·lules de glioblastoma p53 wt. Després d'eliminar la Nutlina-3a del medi de cultiu, les cèl·lules de glioma amb p53 wt no varen poder reprendre el seu potencial proliferatiu, perdent gairebé de forma completa la seva capacitat per formar colònies, i adquirint una morfologia estesa i plana amb expressió positiva per al marcador de senescència SA- β Gal. La inducció de senescència per Nutlina-3a ha estat prèviament descrita en fibroblasts, en cèl·lules de fibrosarcoma (Demidenko ZN, 2010), en cèl·lules T de leucèmia (Korotchkina LG, 2009) i en cèl·lules de neuroblastoma (Korotchkina LG, 2010). No obstant, és la primera vegada que es demostra que la Nutlina-3a induïx senescència en cèl·lules humanes de glioblastoma.

Malgrat que p53 ha estat considerat com l'inductor canònic de la senescència (Vogelstein B, 2000), estudis recents han demostrat que p53 també pot regular negativament la inducció de senescència. Probablement, el mecanisme pel qual Nutlina-3a induïx senescència depèn de dos factors: l'aturada de cicle induïda per p53 i la regulació per part de p53 de la via de mTOR. De fet, dependent del tipus cel·lular i d'altres factors, l'activació de p53 pot resultar en apoptosi o en aturada de cicle, la qual pot ser reversible (quiescència) o irreversible (senescència) (Vogelstein, Lane et al. 2000; Itahana, Dimri et al. 2001). Els mecanismes que condicionen l'elecció entre l'apoptosi i la aturada de cicle han estat

àmpliament estudiats, però la regulació de l'elecció entre la quiescència i la senescència segueix sent un fenomen no del tot elucidat. En aquest sentit, Korotchkina i cols. han descrit la possible interrelació de la via p53 i mTOR en la regulació de la senescència (Korotchkina LG, 2010). L'activació de p53 inhibeix la via mTOR i, tal com hem comentat, la via mTOR participa en la regulació de la senescència cel·lular (Demidenko ZN, 2010; Demidenko ZN, 2008; Demidenko ZN, 2009). L'aturada de cicle cel·lular mediada per p53 pot ser reversible sempre que l'activació de p53 comporti també una inhibició de la via de mTOR. El contrari, quan l'activació de p53 no pugui inhibir la via mTOR, llavors s'induirà una aturada irreversible del cicle cel·lular i, com a conseqüència, senescència (Korotchkina LG, 2009; Korotchkina LG, 2010; Long JS, 2010; Poyurovsky MV, 2010; Serrano M, 2010). D'acord amb els mecanismes abans esmentats, els resultats obtinguts amb el tractament amb Nutlina-3a suggereixen que la inducció de senescència en cèl·lules de glioblastoma amb p53 wt està relacionada amb l'activació de p53 i, al mateix temps, amb el manteniment de la via mTOR activa. Nutlina-3a és incapaç d'inhibir la via de mTOR en les cèl·lules humanes de glioblastoma.

El tractament amb Nutlina-3a de cèl·lules de glioblastoma amb p53 wt va disminuir significativament els nivells d'expressió del mRNA i de la proteïna Survivina. Survivina és un membre de les IAPs que actua com a reguladora de la mitosis i de la mort programada en cèl·lules normals. Survivina juntament amb altres molècules IAP (com hepatitis B X-interacting -HIAP o la proteïna X-linked IAP-XIAP), bloquegen selectivament l'apoptosi a nivells de les caspases efectores (Altieri DC, 2003; Mita AC, 2008). La funció de Survivina varia en les cèl·lules tumorals en les quals el promotor de Survivina es troba freqüentment activat. La sobreexpressió de Survivina ha estat descrita en diverses neoplàsies i el seu increment s'associa amb mal pronòstic i recurrència tumoral (Tam I, 2000; Altieri DC, 2003). L'expressió de la Survivina a més, també s'associa amb la progressió tumoral en gliomes de baix grau i es reconeguda com a factor de mal pronòstic en pacients amb gliomes malignes (Chakravarti A, 2004; Kajiwara Y, 2003). L'expressió diferencial de Survivina entre cèl·lules normals i cèl·lules tumorals sembla estar relacionada amb la hiperactivitat de determinades vies oncogèniques (STAT3 i NFκβ) que activen la sobreexpressió de Survivina juntament amb la pèrdua de funció de gens supressors, com *TP53* i *PTEN* que de forma constitutiva silencien el gen de la *Survivina* (Guha M, 2009; Guha M, 2009).

La proteïna p53 regula l'expressió transcripcional de Survivina i la inhibeix (Guha M, 2009; Guha M, 2009). La disminució de Survivina induïx un bloqueig de la entrada en la fase S i aturada de cicle cel·lular en fase G2/M (Sullivan A, 2004). El grup de Uchida i col·laboradors (Uchida H, 2004) van observar que la silenciació de Survivina amb siRNA era

capaç d'induir apoptosi i suprimir la proliferació cel·lular tan *in vitro* com *in vivo* en les cèl·lules de glioma U251. Sorprenentment en el nostre treball la sobre-expressió ectòpica de Survivina no va ser capaç de rescatar les cèl·lules U87-MG dels efectes citotòxics ocasionats per la inhibició de MDM2. Estudis previs havien demostrat que la sobre-expressió ectòpica de Survivina ocasionava una reducció de la mort cel·lular en les cèl·lules U87MG després de la incubació amb TRAIL-quercetina (Siegelin MD, 2009). El nostre estudi suggereix que després de l'exposició amb Nutlina-3a , la regulació a la baixa de la Survivina podria ser redundant juntament amb l'inducció d'altres canvis,i la sobre-expressió ectòpica d'aquesta proteïna seria incapaç per si sola d'abolir l'aturada de cicle cel·lular i revertir l'apoptosi en les cèl·lules U87MG.

En el nostre estudi vàrem observar que el pretractament amb Nutlina-3a sensibilitza a les cèl·lules U87MG en front a la radioteràpia. Les radiacions ionitzants activen p53, provocant aturada de cicle cel·lular i posteriorment apoptosi. Per altre banda, la radioteràpia també indueix l'expressió de MDM2 depenent de p53, atenuant la resposta de cicle cel·lular i l'activació d'apoptosi induïda per p53 (Chen J,1996). L'activació de MDM2 pot jugar un paper crític prevenint la mort cel·lular induïda per p53 en resposta a la radiació (Cao C, 2006). Un estudi de Grunbaum i col·laboradors suggereix que la restauració del balanç entre MDM2 i p53 pot augmentar la sensibilitat cel·lular a la radiació (Grunbaum U, 2001). Els nostres resultats mostren que la Nutlina-3a fa augmentar la resposta a la radiació en línies cel·lulars de glioma amb p53 wt disminuint la seva capacitat de formació de colònies. Aquests resultats concorden amb estudis previs realitzats en línies de càncer de pulmó el qual Nutlina-3a radiosensibilitzava les cèl·lules induint parada de cicle i apoptosi (Cao C, 2006). Seria necessari ampliar els estudis de Nutlina-3a i radioteràpia per tal de poder dilucidar els mecanismes moleculars implicats en aquesta radiosensibilització.

En el cultiu primari 35/1506 vàrem observar que aquest no responia al tractament amb INutlina-3a i la seqüenciació del gen *TP53* tan sols va detectar la presència d'un polimorfisme R72P. Aquest polimorfisme, localitzat en la regió codificant rica en prolines de *TP53*, és important per a la inhibició de la proliferació i per la regulació de la funció apoptòtica de p53, indicant que les variants Arg72 i Pro72 actuen bioquímicament i biològicament de forma diferent (Pietsch EC, 2006). La variant Arg72 té un potencial apoptòtic més gran que la variant Pro72, degut a que té una major interacció amb MDM2 el que facilita l'exportació nuclear i probablement també la localització mitocondrial de p53 (Dumont P, 2003). La presència d'aquest polimorfisme podria ser l'explicació més plausible de l'absència de resposta a la inhibició de MDM2 del cultiu primari 35/1506. No obstant, aquest cultiu primari mostrava

altres alteracions genètiques relacionades amb un augment de la proliferació i supervivència cel·lular. Així, el cultiu 35/1506 era portador d'una activació de la via de *EGFR* per dos mecanismes: amplificació del gen salvatge i presència de la mutació EGFRvIII que comporta una activació constitutiva del receptor independent de lligant. La via EGFR és una de les vies que es troba més afectada en els glioblastomes (88% dels casos) i que afavoreix la supervivència i la proliferació cel·lular (Chin L, 2008).

Les 2 vies més comunament activades per EGFR son la via de Ras/RAF/MEK/ERK, que controla sobretot cicle cel·lular, transcripció gènica i proliferació cel·lular i, la via PI3K-Akt, que activa una cascada de senyals de supervivència i antiapoptòtiques (Ciardiello F, 2008). Els resultats obtinguts mostren que el cultiu primari 35/1506 té una activació d'ambdues vies, el que comporta un augment de la proliferació cel·lular i supervivència i a l'hora inhibeix l'apoptosi. La presència de la variant Pro72, juntament amb una activació constitutiva de la via d'EGFR podrien actuar de forma conjunta ens els mecanismes subjacents a la resistència al tractament amb Nutlina-3a observada en el cultiu primari 35/1506.

Globalment, els resultats d'aquest objectiu 2 demostren que la Nutlina-3a té una activitat pleiotròpica en les cèl·lules de glioblastoma humà degut a que és capaç d'induir aturada de cicle cel·lular, senescència i apoptosi. A més, Nutlina-3a radiosensibilitza les cèl·lules de glioblastoma. Tot això suggereix que l'ús d'inhibidors de MDM2 podria ser una nova estratègia terapèutica, de forma individual o combinada amb radioteràpia, en el tractament dels pacients amb glioblastoma multiforme p53 wt.

3. Determinar l'efecte de l'inhibidor de Survivina YM155 en línies cel·lulars i cultius primaris de glioblastoma.

Survivina és una petita proteïna de la família de les IAPs la qual participa en múltiples vies pel manteniment de l'homeòstasi cel·lular. Des d'un punt de vista de biologia del càncer, Survivina és una de les molècules més tumor- específiques, i entre les seves funcions en les cèl·lules tumorals destaca la seva capacitat d'antagonitzar l'apoptosi, de promoure l'angiogènesis associada a tumors, i d'actuar com a factor de resistència en varies teràpies antitumorals (Altieri DC, 2008). Survivina s'expressa a nivells elevats durant el desenvolupament del teixit embrionari i fetal, mentre que en teixits adults la seva expressió és

pràcticament inapreciable excepte en la placenta, el testicle i les cèl·lules de divisió ràpida com els progenitors hematopoètics CD34+ (Fukuda S, 2001). Diversos estudis han demostrat una sobreexpressió de survivina en un elevat nombre de càncers humans entre els que s'inclouen el càncer de pulmó (Monzo M, 1999), càncer gàstric (Lu CD, 1998), carcinoma hepatocel·lular (Ito T, 2000), carcinoma d'ovari (Cohen C, 2003), gliomes (Chakravarti A, 2002) i càncers hematològics (Mori A, 2002).

L'atractiu de Survivina com a marcador i diana de noves teràpies resideix en el fet de tractar-se d'una proteïna nodal involucrada en múltiples mecanismes que faciliten el manteniment tumoral. A més, nivells elevats d'expressió de Survivina s'han associat a una menor supervivència i a un augment de les recurrències en càncer colorectal (Sarela AI, 2000), càncer d'esòfag (Ikeguchi M, 2002), carcinoma hepatocel·lular (Ikeguchi M, 2002), càncer de pulmó (Monzo M, 1999), glioma (Chakravarti A, 2002), leucèmia (Mori A; 2002) i altres tipus de càncer (Yamamoto H, 2008). Els nivells d'expressió de Survivina s'han descrit també elevats en gliomes en general, i molt més en glioblastomes, el que suggereix que l'expressió de Survivina augmenta amb el fenotip maligne dels tumors glials. A més, els pacients amb tumors que sobre-exprimeixen Survivina tenen una menor supervivència global en relació a aquells que són negatius per aquesta proteïna (Chakravarti A, 2002). Per tan, l'estudi de la inhibició de la Survivina en glioblastomes permet obrir una nova porta en el tractament dels pacients amb GBM.

Durant els darrers anys s'han desenvolupat múltiples teràpies que tenen com a diana l'expressió o funció de la Survivina, bé per unió i inhibició del seu promotor (YM155), o bloquejant la seva traducció proteica (oligonucleòtids antisentit i siRNA) o per interferència amb les seves funcions (dominants negatius) (Ryan BM, 2009). El tercer objectiu d'aquesta tesi ha estat analitzar l'efecte antitumoral d'una petita molècula inhibidora de Survivina anomenada YM155. Es tracta d'una substància imidazòlica identificada per cribratge d'alt rendiment de llibreries químiques amb inhibidors de l'activitat del promotor del gen de la Survivina.

Els resultats obtinguts mostren que el tractament amb YM155 en línies cel·lulars i en el cultiu primari 35/1506 provocà una disminució en la viabilitat cel·lular mesurada per assaig de MTT, així com inducció de mort cel·lular programada tipus apoptosi de forma dosi i temps dependent. La reducció de la viabilitat i l'augment d'apoptosi s'acompanyaven d'una disminució dosi dependent dels nivells proteics de Survivina en totes les línies cel·lulars de glioma avaluades. La màxima reducció de viabilitat, inducció d'apoptosi i disminució de Survivina es va

observar a les 48 hores de tractament. És important destacar que la dosi en la qual s'inhibia l'expressió de Survivina va ser diferent per a cada línia cel·lular i coincidia amb la dosi en la qual s'indueïa els nivells màxims d'apoptosi.

La disminució de Survivina es va acompanyar d'una inducció de la proteïna p53. Existeix una important interrelació entre les proteïnes p53 i Survivina. En aquest sentit, p53 pot reprimir l'expressió de Survivina a través de la inhibició del factor de transcripció Sp1 que s'uneix al promotor de la Survivina (Estève PO, 2006). Per altra banda, Survivina pot influir en l'activitat de p53 a través de la regulació de MDM2 i del proteasoma i, per tant, una disminució dels nivells de Survivina possiblement permetria l'alliberació i inducció de p53 (Wang Z, 2004).

En la línia cel·lular T98G es va requerir una dosi molt elevada de YM155 (400nM), en relació a les altres línies avaluades, per induir apoptosi i disminuir els nivells de Survivina. Malgrat estudis previs en un ampli ventall de línies tumorals humanes mostren que l'efecte citotòxic de YM155 es independent de l'estat de p53 (Nakahara T, 2011), els resultats de la present tesi suggereixen que la resistència parcial a la inducció d'apoptosi observada en la línia cel·lular T98G podria estar en part relacionada amb la presència d'una mutació en p53. Seria necessari sobreexpressar p53 wt en aquesta línia cel·lular per comprovar si la presència de p53 wt disminueix la dosi necessària per disminuir la viabilitat i induir mort per apoptosi.

És important destacar que en les línies U87MG i ANGM, a les dosi més elevades de YM155, s'observà una recuperació en l'expressió de Survivina que s'acompanyà d'una menor inducció de p53. Aquest resultat suggereix que quan les dosi de YM155 utilitzades són massa elevades en relació a la dosi d'inhibició de Survivina específica per a cada línia cel·lular, es produeixen efectes inespecífics més enllà de la inhibició del promotor de Survivina. A més, la presència de l'augment en els nivells proteics de Survivina a dosi de 100nM en les línies U87MG i ANGM, suggereix que, en aquestes línies cel·lulars, els efectes inespecífics de YM155 a dosi elevades acaben ocasionant l'efecte contrari al desitjat, es a dir l'augment de l'expressió de Survivina i la disminució de la inducció de p53.

La incubació de les línies cel·lulars i del cultiu primari de glioma 35/1506 amb YM155 va induir canvis en el patró del cicle cel·lular, provocant una aturada en la fase G0/G1 o un augment de la fase S depenent de la línia cel·lular avaluada. En aquest sentit, YM155 va induir una aturada en G0/G1 en la línia T98G i en el cultiu primari 35/1506, i un augment de la fase S en la línia cel·lular U87EGFRvIII. En la línia cel·lular U87EGFRvIII i en el cultiu primari 35/1506 aquesta aturada de cicle sembla ser depenent de p53 però independent de p21, ja que

l'expressió de mRNA de p21 no es va modificar significativament amb el tractament amb YM155. En la línia cel·lular T98G la parada del cicle cel·lular és independent de p53 i de p21.

La inducció d'apoptosi provocada pel tractament amb YM155 s'acompanya de canvis en el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi. En quan als gens proapoptòtics els canvis més destacables van ser la inducció del mRNA de PUMA i de Bmf en totes les línies cel·lulars. PUMA és una diana específica de p53, pel que la inhibició de Survivina comportaria una inducció de p53 el qual activaria la via intrínseca de l'apoptosi i induiria un augment en l'expressió de PUMA. La inducció d'aquesta proteïna promourà la inhibició de proteïnes de la família Bcl-2, desencadenant el mecanisme d'apoptosi (Willis SN, 2005). Sorprenentment, es produeix una inducció de PUMA també en la línia cel·lular T98G amb p53 mutat, suggerint que PUMA pot actuar independentment de p53, tal com es descriu en l'estudi de Yu J (Yu J, 2008). No obstant, l'augment dels nivells de PUMA en la línia T98G no van ser tant elevats com en les altres línies avaluades i, a més, s'acompanyava d'un augment del mRNA de Bcl-w i BCL-2, ambdues proteïnes amb funció antiapoptòtica. El resultat en quan a la inducció d'apoptosi en la línia T98G estarà probablement relacionat amb el balanç final entre les proteïnes proapoptòtiques i antiapoptòtiques induïdes per YM155.

Bmf és una proteïna proapoptòtica de la família de BCL-2 amb un sol domini BH3, que es troba localitzada en proteïnes del citoesquelet i quan s'activa per fosforilació s'uneix i inhibeix determinades proteïnes antiapoptòtiques de la família BCL-2 per iniciar el procés apoptòtic (Puthalakath H, 2001). Les proteïnes d'un sol domini BH3 poden activar-se en front determinades teràpies antitumorals. En aquest sentit, s'ha descrit que Bmf s'activa amb el tractament amb inhibidors de l'histona deacetilasa (HDAC) (Willis SN, 2005). Les troballes del nostre estudi suggereixen que l'activació de Bmf pot ser una de les dianes moleculars de l'inhibidor de Survivina YM155 en cèl·lules de glioblastoma humà.

La línia cel·lular U87-EGFRvIII mostra disminució en la viabilitat cel·lular a les 24 hores i inducció d'apoptosi a les 48 hores a una dosi de tractament més alta que les U87MG, les quals tenen el mateix perfil de DNA excepte per la manca de EGFRvIII. Aquests resultats suggereixen que la mutació del receptor de l'EGF confereix una resistència al tractament amb YM155. Estudis previs demostraren que l'expressió d'EGFRvIII en U87MG provocà un increment en la proteïna anti-apoptòtica Bcl-XL i per tant resistència a mort cel·lular per apoptosi en resposta a quimioteràpia (Nagane M, 1998).

Finalment, el pretractament amb YM155 abans de la radioteràpia va induir un augment en el nombre de focus de γ -H2AX i una persistència dels focus fins a 24 hores després

del tractament. En aquest sentit, es coneix que l'exposició cel·lular a la radioteràpia augmenta els nivells de Survivina el que comporta un increment en la radioresistència. A més estudis previs han demostrat que la Survivina augmenta la capacitat de reparació de DSB en cèl·lules de carcinoma escamós (Jiang G, 2009). Els resultats de l'objectiu 3 suggereixen que la inhibició de Survivina podria ser una nova estratègia terapèutica per augmentar la sensibilitat a la radioteràpia en els pacients amb GBM.