

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

IDH-TAU-EGFR
DETERMINAN EL FENOTIPO VASCULAR
Y LA PATOLOGÍA DEL GLIOMA

Berta Segura Collar

Directores: Dr. Pilar Sánchez Gomez y Dr. Ricardo Gargini

Unidad de Neurooncología, Instituto de Salud Carlos III,
Majadahonda (Madrid)

Año 2019



Memoria presentada por BERTA SEGURA COLLAR para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid, en el programa de doctorado de Neurociencia.

Pilar Sánchez Gómez, Doctora en C.C. Químicas y científica titular del Instituto de Salud Carlos III, y **Ricardo Gargini**, Doctor en Biología Molecular e Investigador Joven de la AECC-Instituto de Salud Carlos III,

Hacen constar que Dña. **Berta Segura Collar**, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a la Tesis Doctoral titulada "IDH-TAU-EGFR determinan el fenotipo vascular y la patología del glioma"

Consideramos que dicho trabajo ha sido ejecutado satisfactoriamente, y manifestamos nuestra conformidad con la presentación de esta tesis para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Madrid, a 1 de Octubre de 2019.

Pilar Sánchez-Gómez

Ricardo Gargini

Tesis financiada por el proyecto

"Resistencia mediada por el microambiente en glioblastoma: Caracterización y relevancia biológica y propuesta de aproximaciones terapéuticas sinérgicas"

Convocatoria de proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Código: SAF2015-65175-R (MINECO/FEDER)

Entidad de realización: Unidad funcional de Investigación de Enfermedades Crónicas. Unidad de Neuro-oncología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid).

IP: Pilar Sánchez Gómez.

Todos los procedimientos animales llevados a cabo en este trabajo de tesis fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de investigación y Bienestar Animal (CElyBA) de la institución, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) (PROEX 002/16), de acuerdo con las directrices nacionales y de la unión Europea.

Las muestras de tejido tumoral humano utilizado en este trabajo han sido cedidas por el servicio de Neurocirugía del Hospital 12 de Octubre de Madrid. En todos los casos el tejido se obtuvo después del consentimiento por escrito del paciente y con la aprobación de los Comités de Ética del Instituto de Salud Carlos III (CEI PI 85_2015).

AGRADECIMIENTOS

En aquel momento me planteé iniciar un camino hacia algo entonces difícil de concretar tanto en su objetivo final como en su recorrido. Cierta miedo acompañaba a una inmensa ilusión antes de dar los primeros pasos. Miedo a errar el objetivo, miedo a perderme entre uno de los tantos caminos que nos ofrece la investigación y miedo a dar muchos pasos sola... No ocupó demasiado tiempo esta preocupación en la experiencia vital que comencé pues antes de que mi primer pie tocara el suelo ya sentí la primera mano para acompañarme y escuche el primer susurro de ánimo. Nunca más estuve sola y gracias a tantos he llegado a algo que se parece a un final, aunque los científicos, investigadores o incluso artistas (como alguien me dijo una vez) sabemos que es simplemente un primer paso para comenzar otro camino.

Ha sido mucho tiempo y muchas ayudas. No quiero hacer un listado de todas aquellas manos que me encontré en el camino porque espero que cada una de ellas en cada momento compartido haya sentido mi aprecio y agradecimiento. Espero que en este trabajo veáis vuestro reflejo como yo lo veo en lo aprendido.

Desde aquel primer paso y hasta aquí me habéis acompañado como directores vosotros, Pilar y Ricardo, y me habéis tratado como una más. ¡Me habéis ensanchado y allanado el camino en tantas ocasiones! Gracias por lo enseñado, y porque habéis convertido un laboratorio en algo lleno de personas más que de aparatos y tubos de ensayo...

Y gracias a todas esas personas que lo han llenado de algo más que ciencia durante todo este tiempo, consiguiendo que nunca haya parecido demasiado largo, es más, ahora parece haber sido demasiado corto. Todos sois parte de este trabajo.

Gracias al Instituto Carlos III y su unidad de Neuro-Oncología y al Hospital 12 de Octubre por todos los medios materiales, ayudas, indicaciones, sugerencias... también os encontré en el camino a vosotras las instituciones, pero sobre todo a las personas que estáis detrás.

Todos habéis estado conmigo durante casi 6 años desde aquel primer paso y habéis llegado a formar parte de este recorrido y formareis parte de la continuación. Pero hay manos que ya me acompañaban antes, gracias a las que pude llegar al inicio y me encuentro en este no final; Pilar y JuanRa, mis padres, y Marta mi hermana, junto al resto de mi numerosa familia, mis amigos y amigas de siempre (sabéis quienes sois sin nombraros) y también los que durante esta investigación nos hemos encontrado.

Todos estáis presentes en alguna de las etapas de este viaje, en la forma de ver las cosas, en lo aprendido y en lo que intento enseñar, en mis huellas y en mi memoria. Gracias.



JUANRENO©

La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada.

Karl Popper

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	15
ABSTRACT	16
ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	21
1. El cerebro, un nicho especial para el desarrollo de tumores	23
2. Gliomas	23
2.1. Gliomas de bajo grado (LGG)	24
2.2. Gliomas de alto grado, Glioblastoma (GB)	25
2.3. Clasificación de los GB	26
3. Vasculatura de los gliomas.....	28
4. Manejo clínico de los gliomas.....	29
5. EGFR en gliomas.....	31
6. IDH en gliomas.....	35
7. Células madre tumorales en gliomas.....	37
8. Alzheimer y cáncer, ¿dos enfermedades opuestas?	39
9. Proteína tau asociada a microtúbulos	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. Muestras de pacientes.....	61
2. Cultivos celulares	61
2.1. Establecimiento y mantenimiento de cultivos primarios de GB	61
2.1.1 Establecimiento de cultivos primarios a partir de las muestras tumorales	61
2.1.2 Mantenimiento y expansión de los cultivos primarios	62
2.1.3 Criopreservación y descongelación de los cultivos	62
2.2. Transducción de cultivos celulares con lentivirus	63
2.2.1 Vectores lentivirales y retrovirales	63
2.2.2 Mantenimiento y expansión de los cultivos de células empaquetadoras 293T	63
2.2.3 Transfección de células 293T para la producción de retrovirus y lentivirus ...	64
2.2.4 Transducción de los cultivos primarios de GB con retrovirus y lentivirus	64
2.3. Modelos de glioma de ratón.....	65
2.3.1 Modelo SVZ.....	65
2.3.2 Modelo NPA.....	65
2.3.3 Modelo GL261	66
3. Análisis de expresión.....	66
3.1. Análisis de expresión génica por medición de ARN mensajero	66

3.1.1 Extracción de ARN total.....	66
3.1.2 Obtención de ADN complementario (ADNc)	66
3.1.3 qRT-PCR.....	66
3.2. Análisis de la presencia de la mutación génica del gen EGFR por secuenciación	67
3.3. Análisis de expresión proteica por Western Blot (WB)	67
3.3.1 Preparación de muestras para la extracción proteica.....	67
3.3.2 Extracción y cuantificación de proteínas.....	68
3.3.3 Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia proteica a membrana de nitrocelulosa	68
3.3.4 Inmunodetección proteica y revelado	69
3.3.5 Cuantificación por densitometría.....	69
4. Ensayos <i>in vivo</i>	70
4.1. Trasplante de células tumorales	70
4.1.1 Anestesia, analgesia y reversión de la anestesia	70
4.1.2 Trasplantes subcutáneos. Ensayo de dilución límite.	70
4.1.3 Trasplantes intracraneales	71
4.2. Tratamientos farmacológicos.....	71
4.2.1. Tratamiento con Sunitinib	71
4.2.2 Tratamiento con Etoposilone D	72
4.3. Determinación de la integridad de la Barrera Hematoencefálica (BBB)	72
4.4. Obtención de imágenes mediante Resonancia magnética nuclear (MRI) en ratones	72
4.5. Cell Sorting	73
4.6. Procesamiento histológico del tejido	74
4.6.1 Preparación del tejido con microtomo	74
4.6.2 Técnica de inmunofluorescencia (IF)	74
4.6.3 Técnicas de inmunohistoquímica (IHQ)	75
5. Análisis Bioinformático	75
5.1. Herramientas utilizadas	75
5.2. Análisis de supervivencia	75
5.3. Análisis de expresión génica	76
5.4. Análisis de correlación de la expresión génica	76
5.5 Análisis de correlación de las variaciones genéticas	76
5.6 Análisis de funcionalidad	76
5.7. Análisis de metilación del gen MAPT y de la unión de CTCF por Chip-seq ..	77
6. Análisis estadístico.....	77
RESULTADOS	79
1. Análisis de la expresión de Tau en gliomas	81

1.1.	Los gliomas de menor grado presentan mayor expresión de Tau que los GB	82
1.2.	Correlación entre la expresión de Tau y la progresión de la patología	82
2.	Relación entre la expresión de Tau y las mutaciones en IDH	86
2.1.	Distribución de las principales alteraciones genéticas de los gliomas en relación a la expresión de Tau	86
2.2.	Correlación entre los niveles de expresión de Tau y el estado de IDH1	88
3.	IDH mutante induce la expresión de Tau mediante la metilación de su promotor	90
4.	Tau controla la agresividad tumoral a través de la actividad de EGFR	93
4.1.	Distribución excluyente entre altos niveles de Tau y las mutaciones en EGFR	93
4.2.	Tau inhibe la actividad de EGFR	95
5.	Caracterización de los gliomas EGFR wt/amp y EGFR mut	98
5.1.	Las mutaciones en EGFR favorecen la generación de tumores más agresivos.	98
5.2.	Los tumores con mutaciones en EGFR están más vascularizados	99
5.3.	Los tumores con mutaciones en EGFR presentan un menor grado de rotura de la barrera hematoencefálica (BBB)	101
6.	Diferencias en la función pericítica entre gliomas EGFR wt/amp y gliomas EGFR mut	103
6.1.	Las mutaciones en EGFR inducen una mayor capacidad de la célula tumoral para transformarse en pericito	103
6.2.	Los pericitos muestran una mayor capacidad para unirse al endotelio en los tumores EGFR mut	104
6.3.	La mutación de EGFR favorece la incorporación del pericito al vaso mediante la expresión de CXCR4 y Cx45 y la consecuente activación de p-PDGFR β	105
7.	Tau normaliza la vasculatura en gliomas con amplificación de EGFR	109
7.1.	Tau bloquea la transformación de la célula tumoral a pericito en los gliomas EGFR wt/amp	109
7.2.	La inhibición del marcador pericítico CD248, genera el mismo efecto que Tau en gliomas EGFR wt/amp	112
8.	Tau normaliza la vasculatura bloqueando la capacidad mesenquimal de las células tumorales	114
8.1.	Tau inhibe la capacidad mesenquimal de las células tumorales a través de la vía EGFR/NF- κ B/TAZ	114
8.2.	La inhibición de la capacidad mesenquimal de las células tumorales impide su transformación a pericito	119
9.	Validación de los resultados en muestras de pacientes con glioma	120
DISCUSIÓN		123
1.	IDH y gliomas. Regulación epigenética de la expresión de Tau	125
2.	Tau y EGFR	127

3. EGFR y vasculatura	128
4. Papel de los pericitos tumorales en gliomas. Regulación por EGFR.	129
5. Tau y mesénquima.....	132
6. Efecto de Tau en la vasculatura del Alzheimer y de los gliomas.	134
7. Propuesta de una nueva estratificación de los gliomas según el fenotipo vascular	134
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143
ANEXOS.....	161

RESUMEN

Los gliomas difusos son los tumores cerebrales primarios más agresivos que existen. Su pronóstico sigue siendo muy desfavorable debido a su localización, las limitaciones en su tratamiento y la falta de conocimiento acerca de la fisiología del tumor. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para mejorar la caracterización molecular de esta patología. Esto ha permitido la incorporación de nuevos marcadores moleculares a la última clasificación de la OMS de los gliomas, como es el caso de las mutaciones en los genes **IDH**, que se expresan en los tumores de menor grado. En este trabajo describimos como los niveles y el estatus genético de **IDH** regula la expresión de **Tau** en gliomas. La proteína **Tau** se ha asociado clásicamente con la enfermedad de Alzheimer, aunque nuestros resultados indican que también podría jugar un importante papel en estos tumores, ya que podría ser responsable de la inhibición de la agresividad tumoral. Además, los resultados aquí presentados nos permiten proponer que moléculas con capacidad para estabilizar los microtúbulos (como el taxol y sus derivados) podrían emular la función de **Tau** y frenar la progresión de los gliomas.

Por otro lado, el gen de **EGFR** se encuentra mutado y/o amplificado en casi la mitad de los gliomas, especialmente en los más agresivos. Aunque previamente se han descrito numerosas funciones pro-tumorales de **EGFR**, nuestros resultados indican que dicho receptor está implicado en la transformación de la propia célula tumoral a pericito, así como en la regulación de su localización, lo que determina el fenotipo vascular de los gliomas. Así pues, la presencia de alteraciones en **EGFR** (ya sean mutaciones puntuales o la delección vIII) favorece que los pericitos tumorales se localicen en los vasos, induciendo la generación de tumores altamente vascularizados, proliferativos y muy agresivos. Por el contrario, la amplificación de **EGFR** "wild-type" genera tumores menos agresivos, caracterizados por presentar una red vascular más frágil, con rotura generalizada de la barrera hematoencefálica.

Profundizando acerca de la función de **Tau** en los gliomas, nuestros resultados muestran que **Tau** impide la diferenciación de las células tumorales a pericitos al bloquear la vía de señalización de **EGFR** y los reguladores mesenquimales **NF- κ B-TAZ**, normalizando la vasculatura y bloqueando la progresión de los gliomas. Sin embargo, la presencia de mutaciones en **EGFR** hace que esta vía de señalización esté más activa y sea independiente de **Tau**.

En conjunto, **nuestros resultados indican que la triada EGFR-IDH-Tau determina la agresividad del tumor modificando la vasculatura, especialmente a través del control de la diferenciación de las células tumorales a pericitos**. Por ello, proponemos una nueva estratificación de los gliomas basada en las diferentes alteraciones vasculares, la cual podría mejorar significativamente tanto las herramientas diagnósticas como el diseño de nuevos abordajes terapéuticos

ABSTRACT

Diffuse gliomas are the most aggressive primary brain tumors. They still have a very unfavorable prognosis due to their location, to limitations in their treatment, and to our uncomplete knowledge of this special type of cancer. In recent years, many studies have been made in order to improve the molecular characterization of this pathology. This has allowed the incorporation of new molecular markers into the last WHO glioma classification. In particular, the identification of mutations in **IDH**, which are present in lower grade tumors. In this work we describe how the balance between the levels of the wild type and the mutant form of IDH regulates the expression of Tau in gliomas. Tau protein has been classically associated with Alzheimer's disease, although our results indicate that it could also play an important role in these tumors. Hence, it could be responsible for the inhibition of the tumor aggressiveness in the presence of IDH mutations. In addition, the results presented here allow us to propose that microtubule-stabilizing drugs (such as taxol and its derivatives) could emulate the function of Tau and slow down glioma progression.

On the other hand, the **EGFR** gene is mutated and/or amplified in almost half of the gliomas. Although several pro-tumoral functions of EGFR have been previously described, our results indicate that this receptor is involved in the transformation of tumor cells into pericytes, as well as in the regulation of its location, which determines the vascular phenotype of gliomas. Thus, the presence of alterations in EGFR (either point mutations or the VIII deletion) favors the location of these tumor pericytes in close contact with the vessels, inducing the generation of a very aggressive glioma, with abundance of well-structured vessels and high levels of proliferation. By contrast, the amplification of wild-type EGFR generates a less aggressive tumor phenotype, characterized by a more fragile vascular network, with a leaky blood-brain barrier.

Regarding the role of **Tau** in gliomas, our results show that Tau impairs the transformation of glioma cells into pericytes through the blockade of the EGFR signaling pathway and the mesenchymal regulators, NF- κ B-TAZ. Thus, it favors the vascular normalization and blocks glioma progression. However, the presence of EGFR mutations further activates this signaling pathway, making it Tau-independent.

Altogether, **our results indicate that the EGFR-IDH-Tau triad determines the tumor aggressiveness by modifying the vasculature, especially by controlling the differentiation of tumor cells into pericytes.** Therefore, we propose a novel stratification of gliomas based on the different vascular alterations, which could significantly improve the diagnosis and the design of novel therapeutic approaches.

ABREVIATURAS

2-HG: 2-Hydroxiglutarato

5-ALA: Ácido 5-aminolevulínico

α -KG: α -Ketoglutarato

A: Astrocitoma

ABC: Transportador dependiente de ATP (del inglés *ATP-binding cassette*)

AD: Enfermedad del Alzheimer (del inglés *Alzheimer's Disease*)

ATRX: *Alpha thalassemia/mental retardation syndrome x-linked*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico

ALDH: Aldehído deshidrogenasa (del inglés *aldehyde dehydrogenase*)

AMP: Amplificado

APS: Persulfato de amonio (del inglés *ammonium persulfate*)

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNsh: ácido ribonucleico "short hairpin"

AKT o PKB: *Protein kinase B*

AZA: Azacitidina

BBB: Barrera hematoencefálica (del inglés *Blood Brain Barrier*)

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

BSA: *bovine serum albumin*

CDK: *Cyclin dependent kinase*

CDKN2A: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CHI3L1: *Chitinase-3-like protein 1*

CL: Clásico

COX-2: *Cyclooxygenase 2*

CTCF: *cohesin and CCCTC-binding factor*

CSCs: *cancer stem cell*

DBA: tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina

DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase*

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSO: *dimetil sulfóxido*

EC: *región extracelular*

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*

EGF: *Epidermal growth factor*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

ELA: *Esclerosis lateral amiotrófica*

EMT: *Transición epitelio-mesénquima (del inglés Epithelial-to-Mesenchymal Transition)*

ERK: *Extracellular-signal-regulated kinase*

FACS: *Fluorescence activated cell sorting*

FBS: *Fetal bovine serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

bFGF: *Basic Fibroblast growth factor*

FGFR: *Fibroblast growth factor receptor*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

GABRA1: *Gamma-aminobutyric acid type A receptor Alpha1 subunit*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

G-CIMP: *Glioma CpG island Methylator Phenotype*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GSEA: *Gen Set Enrichment Analysis*

GB: *Glioblastoma*

GSCs: *Glioma stem cell*

GSK: <i>Glycogen synthase kinase</i>	MRI: Imagen de Resonancia Magnética (del inglés <i>Magnetic resonance imaging</i>)
GTP: <i>Guanosine-5'-triphosphate</i>	mTOR: <i>Mammalian target of rapamycin</i>
HB-EGF: <i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>	Mut: mutante
HBS: <i>Hepes buffered saline</i>	MW: Marcador de peso molecular (del inglés <i>Molecular weight</i>)
HDAC: <i>Histone deacetylase</i>	N: Neural
HDM: <i>Histone demethylase</i>	NAP+: Nicotinamide adenine phosphate
H&E: Hematoxilina-eosina	NADP+: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
HGF: <i>Hepatocyte growth factor</i>	NADH: <i>Nicotinamide adenine phosphate reduced</i>
HGFR: <i>Hepatocyte growth factor receptor</i>	NADPH: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced</i>
HIF-1α: <i>Hypoxia inducible factor 1 subunit Alpha</i>	NEFL: <i>Neurofilament light</i>
HPRT: <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	NF1: <i>Neurofibromin 1</i>
IDH: <i>Isocitrate dehydrogenase</i>	NF-κB: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
IF: Inmunofluorescencia	NLS: <i>Nuclear localization signal</i>
IHQ: Inmunohistoquímica	NSC: <i>Neural stem cell</i>
iNOS: <i>Inducible nitric oxide synthase</i>	O: Oligodendrogliomas
IP3: <i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>	OA: Oligoastrocitomas
JAK2: <i>Janus kinase 2</i>	o/n: <i>Over night</i>
JNKs: <i>c-Jun N-terminal kinases</i>	OMS: Organización Mundial de la Salud
L1CAM: <i>L1 cell adhesion molecule</i>	PB: <i>Phosphate buffer</i>
LGG: Gliomas de bajo grado (del inglés <i>low grade glioma</i>)	PBS: <i>Phosphate buffered saline</i>
LIF: <i>Leukemia inhibitory factor</i>	PCNA: <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
LOH: <i>Loss of heterozygosity</i>	PD: Enfermedad del Parkinson (del inglés <i>Parkinson's Disease</i>)
mAb: <i>monoclonal antibodies</i>	PDGF: <i>Platelet derived growth factor</i>
MAPK: <i>Mitogen activated protein kinase</i>	PDGFR: <i>Platelet derived growth factor receptor</i>
MC: Medio completo	PDX: Glioma derivado de una muestra de paciente (del inglés <i>Patient Derived Xenograft</i>)
MC-SUP: Medio completo suplementado	PET: <i>Positron emission tomography</i>
MDM2: <i>Mouse double minute 2</i>	PFA: Paraformaldehído
MES: Mesenquimal	
MTIC: <i>Monometil triazenoimidazol carboxamida</i>	
MGMT: <i>Methylguanine methyltransferase</i>	

PI3K: <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>	SPRY2: <i>Sprouty 2</i>
PIP3: <i>Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate</i>	STAT: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
PKC: <i>Protein kinase C</i>	SVZ: <i>Zona Subventricular</i>
PLCγ: <i>Phospholipase C, gamma isotype</i>	SYT1: <i>Synaptotagmin 1</i>
PMSF: <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>	TAC: <i>Tomografía axial computerizada</i>
PN: <i>Proneural</i>	TAZ o WWTR1: <i>WW domain-containing transcription regulator 1</i>
PTB: <i>Phosphotyrosine-binding domain</i>	TBS: <i>Tris-buffered saline</i>
PTEN: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>	TCGA: <i>The Cancer Genome Atlas</i>
qRT-PCR: <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>	TEMED: <i>Tetramethylethylenediamine</i>
QT: <i>Quimioterapia</i>	TET: <i>Ten elven translocation</i>
Rb: <i>Proteína del retinoblastoma</i>	TERT: <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
REST: <i>RE1-Silencing Transcription factor</i>	TFF: <i>Tumor Treating Fields</i>
RFP: <i>Red fluorescent protein</i>	TGF-α: <i>Transforming growth factor alpha</i>
ROS: <i>Especies reactivas de oxígeno (del inglés reactive oxygen species)</i>	TIC: <i>Tumor initiating cell</i>
RPM: <i>Revoluciones por minuto</i>	TK: <i>Tyrosine kinase</i>
RT: <i>Radioterapia</i>	TKIs: <i>Tyrosine kinase inhibitor</i>
RTK: <i>Receptor tyrosine kinase</i>	TKR: <i>Tyrosine kinase receptor</i>
S6K: <i>Ribosomal protein S6 kinase</i>	Tm: <i>melting temperatura</i>
SB: <i>Sleeping Beauty transposón system</i>	TMZ: <i>Temozolomida</i>
SDS: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Tp53: <i>Tumor protein p53</i>
SEM: <i>Standard error of the mean</i>	uPAR: <i>Plasminogen activator urokinase receptor</i>
SFK: <i>Src family kinase</i>	VEGF: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
SH2: <i>Src homology 2</i>	VEGFR: <i>Vascular growth factor receptor</i>
SHH: <i>Sonic hedgehog</i>	WB: <i>Western Blot</i>
SLC12A5: <i>Solute Carrier family 12 member 5</i>	WHO: <i>World Health Organization</i>
SNC: <i>Sistema nervioso central</i>	Wt: <i>Forma salvaje (del inglés Wild type)</i>
SPECT: <i>Single-photon emission computed tomography</i>	



INTRODUCCIÓN

1. El cerebro, un nicho especial para el desarrollo de tumores

El cerebro es un órgano con características muy particulares, principalmente por su compleja estructura y composición celular. Esto ha supuesto un desafío para la ciencia, tanto para entender el funcionamiento en condiciones fisiológicas, como para el estudio de las diversas patologías cerebrales, incluyendo el cáncer. Es importante destacar que es un tejido con un alto contenido en matriz extracelular y que además dicha matriz tiene una composición distinta a la del resto de tejidos ya que cuenta con una elevada presencia de proteoglicanos, glucoproteínas y glicosaminoglicanos. Asimismo, se ha descrito que proteoglicanos como el heparán sulfato y el ácido hialurónico son acumulados en determinadas zonas, favoreciendo la formación de nichos vasculares. Aparte del componente molecular, también hay células que residen únicamente en el cerebro como son la microglía, los astrocitos, los oligodendrocitos y las neuronas (Quail and Joyce, 2017). Sin embargo, otras células, como los fibroblastos o numerosas células inflamatorias, tienen una presencia residual en el cerebro en condiciones normales. Por otro lado, el cerebro presenta una vasculatura especial, caracterizada por una alta densidad de vasos, un ratio pericito/endotelio muy elevado, así como por la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *blood brain barrier*) (Rustenhoven et al., 2017). Todo ello es relevante tanto para el inicio como para el desarrollo posterior de los tumores cerebrales, diferenciándolos del resto de cánceres y añadiendo complejidad a la búsqueda de terapias frente a los mismos.

2. Gliomas

Los tumores cerebrales primarios de adulto constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que derivan de distintos linajes celulares. Entre ellos, los gliomas representan el grupo más frecuente. Según la morfología de las células tumorales y en función de su similitud con las diferentes células gliales se pueden distinguir dos tipos de gliomas: los **astrocitomas (A)** (con células similares a los astrocitos) y los **oligodendrogliomas (O)** (con células similares a los oligodendrocitos) (Martin-Villalba et al., 2008). Hasta hace unos años se clasificaban como **oligoastrocitomas (OA)** a aquellos gliomas con un fenotipo mixto, pero la nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reserva este término para situaciones muy puntuales donde los marcadores moleculares, que describiremos más adelante, no permiten un diagnóstico diferencial. Tanto la antigua como la nueva clasificación de los gliomas de la OMS establecen una gradación de los gliomas en base a criterios histológicos: presencia de atipia celular, células mitóticas, proliferación vascular y áreas de necrosis (Louis et al., 2007). A medida que estos signos se hacen más evidentes aumenta el grado de malignidad del tumor. Los astrocitomas de grado I, o astrocitomas pilocíticos, son tumores diferentes al resto, ya que están bien delimitados, tiene baja actividad mitótica y constituyen una forma benigna de

glioma. Estos tumores representan el 5% de todos los gliomas, apareciendo con mayor frecuencia en personas jóvenes. El resto de gliomas son tumores invasivos e infiltran el parénquima cerebral. Aquí hablaremos de dos grandes grupos de gliomas difusos, los **gliomas de menor grado (“Lower Grade Gliomas”, LGG)** (que incluye gliomas de grado II y grado III) y los **glioblastomas (GB)** (gliomas de grado IV). Aparte de la clasificación histológica, en los últimos años se han realizado números estudios que han permitido una mejor caracterización molecular de los gliomas. Esto ha permitido la incorporación de algunos biomarcadores moleculares en la nueva clasificación de los gliomas de la OMS (Louis et al., 2016), consiguiendo así una categorización más definida y específica que describiremos más adelante (**Figura I1**).

2.1. Gliomas de bajo grado (LGG)

Los LGG representan el 10-15% de los gliomas en adultos, ocurren a edades más tempranas que los gliomas de alto grado (en torno a los 40 años), siendo el pronóstico de estos pacientes más favorable. A pesar de ello la supervivencia es variable (entre 3 y 7 años) ya que en muchos casos evolucionan a tumores de mayor grado, sin que hasta la fecha se hayan descrito marcadores predictivos de dicha transformación. Como ya hemos mencionado se clasifican como oligodendrogliomas o astrocitomas en función de su fenotipo histológico.

Los **oligodendrogliomas** son tumores con células con un núcleo redondeado con presencia de un halo claro perinuclear que recuerda a la forma típica de un “huevo frito”, además de presentar una rica red de vasos sanguíneos finos y ramificados. Ocasionalmente se observa la presencia de microquistes (especialmente en los O de grado III,) y células de citoplasma amplio y eosinófilo con un núcleo excéntrico. De manera adicional, los OIII muestran una mayor capacidad proliferativa, proliferación vascular (definida como la proliferación de las células vasculares y perivasculares) y áreas de necrosis. A nivel molecular se caracterizan por la presencia de mutaciones en los genes *IDH1/2* (del inglés *Isocitrate dehydrogenase 1,2*), así como por la codelección de los brazos cromosómicos 1p y 19q (**Figura I1**).

Los **astrocitomas** son más frecuentes que los oligodendrogliomas. Según su grado de malignidad se clasifican como astrocitomas difusos de grado II (AII) o astrocitomas anaplásicos de grado III (AIII). Los AII poseen una baja actividad mitótica, así como escasa hiper celularidad y atipia citológica. Debido a su carácter infiltrante suelen producir un ensanchamiento y distorsión de las estructuras anatómicas afectadas, lo que imposibilita en muchos casos su resección completa. Los AIII son también astrocitomas difusos e infiltrantes, pero tienen una mayor densidad celular y potencial proliferativo, así como atipia nuclear más marcada y anaplasia, acompañada de un aumento en el número de células mitóticas. Este tipo de tumores tiene una gran tendencia a progresar a gliomas de grado IV. A nivel molecular

los astrocitomas de bajo grado (AII-AIII) se caracterizan por la presencia de mutaciones en *IDH1/2*, *ATRX* (del inglés *Alpha thalassemia/mental retardation síndrome x-linked*) y *TP53* (Figura 11).

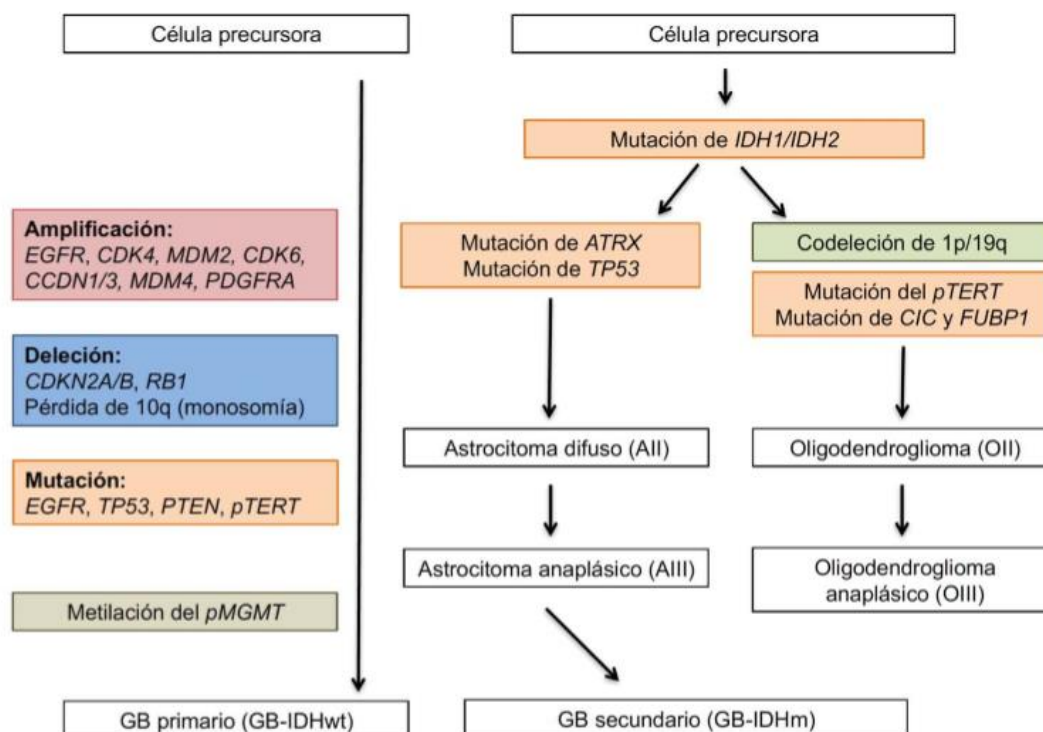


Figura 11. Esquema temporal de cómo podrían ir apareciendo las principales alteraciones moleculares en los diferentes tipos de gliomas.

2.2. Gliomas de alto grado, Glioblastoma (GB)

El GB es el tipo de glioma más frecuente y agresivo, llegando a suponer el 60-75% de todos los tumores astrocitarios. Se estima que la tasa de incidencia anual en Europa es de 5 casos por cada 100.000 habitantes, siendo ligeramente superior en hombres (ratio hombre/mujer de 1,5) (Colen et al., 2015). La edad media del diagnóstico se sitúa en torno a los 62 años y la supervivencia media de los pacientes es de unos 14 meses de vida (Ostrom et al., 2017). Histológicamente estos tumores se caracterizan por un escaso grado de diferenciación, elevada actividad mitótica y gran heterogeneidad celular que se plasma en la presencia de las células de tamaño y morfología extremadamente variable con fuerte capacidad invasiva. Además, en estos tumores son habituales la presencia de áreas de necrosis, frecuentemente denominada como **necrosis en pseudoempalizada**. Éstas se caracterizan por la aparición de un área necrótica central rodeada de un conjunto de células de carácter altamente proliferativo. Los GB presentan asimismo zonas con una elevada tasa de **proliferación**

microvascular, que consisten en un acúmulo de capas endoteliales de aspecto glomeruloide (Louis et al., 2007).

Desde un punto de vista molecular, los GB se caracterizan por la presencia de múltiples alteraciones genéticas. Entre ellas caben destacar las amplificaciones en numerosos receptores tirosina-quinasa (RTKs, del inglés *Receptor Tyrosin Kinases*) como el receptor para el factor de crecimiento derivado plaquetas (*PDGFR*, del inglés *Platelet Derived Growth Factor Receptor*), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (*HGFR*, del inglés *hepatocyte growth factor receptor*, también llamado *MET*) y, especialmente, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*), en el que también se ha detectado otras mutaciones en su dominio extracelular que conllevan su activación constitutiva (descrito en más detalle en un apartado posterior). Estas alteraciones en RTKs confluyen en la estimulación de vías de señalización intracelulares como PI3K (del inglés Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-Kinase) /AKT y RAS, que también pueden encontrarse sobre-activadas por la presencia de mutaciones en inhibidores claves de estas vías como PTEN (del inglés Phosphatase and Tensin Homolog) y NF1 (del inglés Neurofibromin-1). Del mismo modo, se han encontrado alteraciones en componentes de aquellas rutas que regulan la proliferación y el ciclo celular como la vía p53 y la proteína del retinoblastoma (pRb) (Brennan et al., 2013).

2.3. Clasificación de los GB

Los GB pueden clasificarse como tumores primarios o secundarios. La mayor parte de los GB diagnosticados son **GB primarios**, es decir, son diagnosticados directamente como glioma de grado IV sin evidencias clínicas o histológicas de la existencia previa de lesiones de menor grado. Los **GB secundarios** (tan solo un 5-10% de los GB) progresan a partir de gliomas de menor grado y tienen un mejor pronóstico (Ohgaki and Kleihues, 2013). Aunque histológicamente no se han encontrado diferencias entre estos dos subtipos, sí son diferentes en cuanto a su incidencia y a la edad de detección: mientras los primarios se diagnostican principalmente en pacientes mayores de 60 años, la edad media del diagnóstico de GB secundarios está en torno a los 45 años. También las alteraciones moleculares que presentan difieren en ambos casos. En los GB primarios son frecuentes las amplificaciones y mutaciones en *EGFR*, la sobre-expresión de *MDM2* (del inglés *mouse double minute 2*), las mutaciones en el promotor de *TERT* (del inglés *Telomerase reverse transcriptase*) y *PTEN* y las deleciones en *CDKN2A* (del inglés *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*). Por otro lado, los GB secundarios muestran alteraciones en *Tp53* e *IDH1/2* en dos tercios de los casos, así como mutaciones en *ATRX*. Asimismo, el silenciamiento epigenético de genes como *MGMT* (del inglés *Methylguanine methyltransferase*), *p14ARF* y *p16INK4a* es más frecuente en los GB secundarios que en los primarios (Ohgaki and Kleihues, 2007) (**Figura 11**).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios que han hecho uso de las plataformas de análisis masivo de expresión génica. Esto ha permitido la descripción detallada de las alteraciones moleculares presentes de forma habitual en los GB y también clasificarlos en varios subtipos tumorales en base a los patrones transcripcionales. Así, por ejemplo, el análisis de expresión de 840 genes en una cohorte de 200 muestras de pacientes diagnosticados con GB y depositados en el TCGA (del inglés *The Cancer Genome Atlas*) dividió a los gliomas en 4 subgrupos: clásico (CL), mesenquimal (MES), neural (N) y proneural (PN) (Verhaak et al., 2010) (**Figura I2A**). En este estudio se caracterizaron también las alteraciones génicas presentes en cada uno de los subtipos, incluyendo las variaciones en el número de copias y las mutaciones. El **subtipo PN** se caracteriza por una elevada frecuencia de amplificación y/o mutación de *PDGFRa* y mutaciones en *IDH1/2* y *Tp53*. Además, este subtipo de GB presenta un aumento en la expresión de genes asociados al desarrollo de oligodendrocitos como *PDGFRa*, *Sox2* y *Olig2*. Asimismo, estos tumores suelen ser G-CIMP positivos (del inglés *Glioma CpG island Methylator Phenotype*), término utilizado para definir un perfil de gliomas caracterizado por una metilación masiva en el ADN. El subtipo PN se detecta en la mayoría de GB secundarios de edad joven, por lo que se asocia con un buen pronóstico (**Figura I2B**). El **fenotipo CL** se relaciona con una elevada frecuencia de alteraciones en el gen *EGFR*, en forma de amplificación o mutación, así como la delección homocigota de *CDKN2A* y la baja expresión de p16INK4A. La expresión de marcadores de célula madre neural como Nestina, así como los componentes de las vías de señalización de Notch y de Shh (del inglés *Sonic Hedgehog*) son también muy prevalentes en los tumores de este subtipo. En el **subtipo MES** son frecuentes los tumores que presentan mutaciones en el gen *NF1*, *Tp53* y *PTEN* y altos niveles de expresión de marcadores de células mesenquimales como *CHI3L1* (del inglés *Chitinase-3-like protein 1*), *MET* y *CD44*. Por último, el **fenotipo N** presenta marcadores característicos neuronales como *NEFL* (del inglés *neurofilament light*), *GABRA1* (del inglés *gamma-aminobutyric acid type A receptor Alpha1 subunit*), *SYT1* (del inglés *synaptotagmin 1*) y *SLC12A5* (del inglés *solute Carrier family 12 member 5*), con diferenciación astrocitaria y oligodendrogliol. Dado que presentan un perfil similar al de los cerebros no tumorales utilizados como control, existe controversia acerca de la existencia real de este subtipo tumoral.

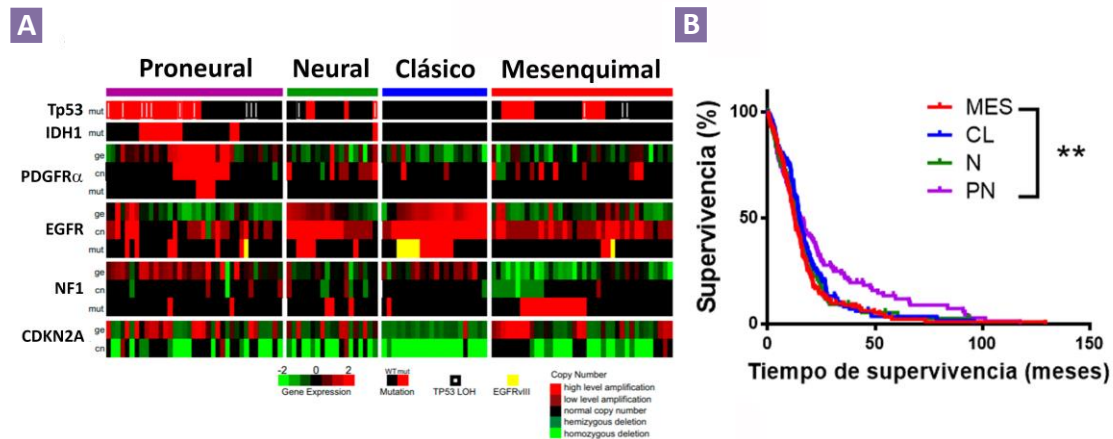


Figura 12. Características de los distintos subtipos moleculares de GB. (A) Alteraciones genómicas y de expresión en los diferentes subtipos de GB (Imagen adaptada de (Verhaak et al., 2010)). (B) Índice de supervivencia de los GB según el subtipo tumoral (Imagen adaptada de Gargini et al., 2019 datos no publicados)

3. Vasculatura de los gliomas

Los gliomas, en especial los de mayor grado, se caracterizan por mostrar una vasculatura muy abundante y aberrante. De hecho, la proliferación vascular es un factor de pronóstico negativo. Hay diversos factores que regulan el proceso angiogénico en los gliomas, siendo el principal el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF del inglés *vascular endothelial growth factor*), además de otros factores secretados con alta capacidad angiogénica, como la angiopoyetina 1 y 2 (*Ang-1* y *Ang-2*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*, del inglés *platelet derived growth factor*), Interleuquina-8 (*IL-8*) o el factor de crecimiento de hepatocitos (*HGF*, del inglés *hepatocyte growth factor*) (Hardee and Zagzag, 2012). El proceso de vascularización de los gliomas es complejo y poco entendido. Se postula que en los primeros pasos de la gliomagénesis, donde el rápido crecimiento del tumor propicia la demanda de nutrientes y oxígeno, las células tumorales se agrupan alrededor de los vasos pre-existentes (**Asociación vascular**). Más adelante, se empiezan a formar nuevos vasos a partir de vasos ya formados (**Neoangiogénesis**), siendo la hipoxia el principal inductor de este proceso a través de la activación de *HIF-1α* (del inglés *hypoxia inducible factor 1 subunit Alpha*) (Dewhirst et al., 2008), lo que genera una respuesta angiogénica robusta mediada en parte por el incremento de expresión y secreción de VEGF y IL-8. Tras los procesos anteriores, la vascularización en gliomas puede incrementarse por diversos procesos como la **Vasculogénesis**, que consiste en el reclutamiento y diferenciación de progenitores endoteliales procedentes de la médula ósea (Ahn and Brown, 2009). Estudios recientes demuestran como los procesos hipóxicos mencionados anteriormente inducen también este mecanismo a través de *TIE-2* y de la ruta *SDF-1/CXCR4* (Aghi et al., 2006). Otro de los procesos relevantes en la formación de la vasculatura de los gliomas de mayor grado es el llamado

Mimetismo vascular, basado en la capacidad de las células tumorales de formar redes vasculares funcionales similares a los vasos (Yue and Chen, 2005). De hecho, las células tumorales son capaces de diferenciarse a células endoteliales (Soda et al., 2011) y a células murales, también llamadas pericitos, que son necesarios para el sustento y protección del endotelio (Cheng et al., 2013). El resultado de todo este proceso angiogénico es una vasculatura aberrante, con vasos dilatados y tortuosos, además de tener un endotelio permeable y una menor cobertura de pericitos (Cheng et al., 2013; Hardee and Zagzag, 2012). Este defecto en el reclutamiento y funcionalidad en los pericitos contribuye a una formación anormal de la BBB, sello distintivo de los gliomas más agresivos que permite además su diagnóstico debido a la visualización, mediante resonancia magnética (MRI, del inglés *magnetic resonance imaging*), de la extravasación del agente de contraste Gadolinio (Gd) (Park et al., 2017).

4. Manejo clínico de los gliomas

La sintomatología de los pacientes con gliomas varía en función del tamaño y la localización del tumor, el grado de invasión y la presencia de inflamación en el tejido cerebral adyacente. No obstante, los síntomas más frecuentes son: alteraciones de las funciones mentales (cognitivas y sensoriales), dolores de cabeza, convulsiones y síntomas epilépticos y debilidad en alguna zona del cuerpo. Además, la mayor parte de los tumores cerebrales provocan un aumento de la presión intracraneal debido a su tamaño. Ante la sospecha de un tumor cerebral, las pruebas diagnósticas que se realizan son la exploración física y neurológica del paciente, seguida de técnicas de imagen más sofisticadas para determinar la extensión del tumor, el número de lesiones, las zonas afectadas y la presencia de complicaciones secundarias (como la hemorragia). Las principales técnicas que permiten realizar un diagnóstico diferencial son la tomografía axial computarizada (TAC), la MRI, la tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*) y la tomografía por emisión de positrón único (SPECT, del inglés *single-photon emission computed tomography*). Por último, el análisis inmunohistoquímico del tumor (ya sea una muestra obtenida por biopsia estereotáctica o tras la extirpación del mismo) permite confirmar con seguridad el diagnóstico definitivo.

La primera fase del tratamiento es la **extirpación quirúrgica** del tumor, que tiene como principal objetivo la eliminación de la mayor parte del tejido tumoral, compatible con el mantenimiento de la mejor función neurológica posible. Una resección óptima es el mejor predictor de la supervivencia global de los pacientes (Lacroix et al., 2001), por lo que este proceso se ha perfeccionado en los últimos años mediante la utilización de compuestos como el ácido de 5-aminolevulínico (5-ALA) y la introducción de la cirugía asistida por

neuronavegador, que permiten una mejor distinción entre regiones sanas y tumorales. Sin embargo, esta resección suele ser incompleta debido al carácter infiltrante del tumor, por lo que se requiere la aplicación de un tratamiento complementario.

La terapia estándar postquirúrgica incluye la administración combinada de **radioterapia (RT)** y **quimioterapia (QT)** con el fármaco temozolomida (TMZ). La TMZ es administrada por vía oral con una dosis diaria de 75 mg/m²/día durante 6 semanas, concomitante con la RT. Los 6 meses siguientes se continúa con un tratamiento adyuvante de 150-200 mg/m² de TMZ en ciclos de 5 días seguidos cada 28 días. A este tratamiento estándar se le denomina "Protocolo Stupp" (Stupp et al., 2005). La TMZ es un agente alquilante con capacidad de atravesar la BBB y sufrir una rápida conversión no enzimática a pH fisiológico para formar el metabolito activo MTIC (del inglés *Monometil triazenoimidazol carboxamida*). Este compuesto actúa generando aberraciones genéticas en las células tumorales mediante la adición de grupos metilo a las bases de purina del ADN (en las posiciones O6 y N7 de la guanina y la posición N3 de la adenina). La formación de O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) inhibe la replicación e induce la apoptosis de la célula tumoral (Zhang et al., 2012). Su efectividad depende de la presencia de la enzima MGMT que cataliza la eliminación de los grupos metilo inducidos en las guaninas del ADN tras el tratamiento con TMZ. Una alta expresión de MGMT se ha asociado con resistencia a la inducción de la apoptosis promovida por este fármaco. Cuando el promotor MGMT se encuentra metilado, la expresión de la enzima se reduce drásticamente, lo que se relaciona con una mayor sensibilidad de las células del tumor a la acción de la TMZ. Así, la metilación del promotor MGMT constituye a día de hoy el principal factor predictivo de la respuesta a TMZ (Hegi et al., 2005).

Aparte del tratamiento convencional con el protocolo de Stupp, se han llevado a cabo numerosos **ensayos clínicos** en los últimos años. Uno de los tratamientos para el GB que ha generado mayores esperanzas se basa en la utilización de campos eléctricos con polaridad alterante (TFF, del inglés *Tumor Treating Fields*), capaces de interferir en el proceso de las mitosis de células en división. Este tratamiento ha sido aprobado por la FDA (del inglés *Food and drug administration*) en 2015 como tratamiento en primera línea para pacientes con GB. Se ha demostrado que en combinación con la radio-quimioterapia convencional incrementa 3 meses tanto la supervivencia libre de progresión como la supervivencia global de pacientes, sin mostrar efectos secundarios indeseados relevantes en el paciente (Stupp et al., 2017). Sin embargo, su alto precio, así como reticencias por parte de los pacientes para utilizar de manera continua el sistema generador de los TFF, está dificultando su uso.

Además de las terapias citotóxicas, se está testando la eficiencia de diferentes moléculas que interfieren con las rutas de señalización más frecuentemente alteradas en este tipo de tumores. Sin embargo, hasta la fecha todas las moléculas han mostrado un beneficio limitado, probablemente debido a la dificultad que tienen para atravesar la BBB. Por otro lado, también

se generó mucha expectación con la posibilidad de combinar el protocolo Stupp con Bevacizumab, anticuerpo inhibidor de VEGF. Sin embargo, se ha demostrado que este fármaco produce una mejora de la calidad de vida de los pacientes, pero no un incremento en la supervivencia general de los mismos (NCT0094382) (Geraldo et al., 2019).

A pesar del agresivo tratamiento que se aplica a los pacientes con GB, cerca de un 95% de ellos sufren recidivas en un periodo corto de tiempo (6-12 meses). Actualmente no existe un tratamiento estándar de segunda línea bien definido. En estos casos se individualiza la decisión para cada paciente, basándose en su edad, su estado general, la extensión de la resección inicial del tumor, el tipo de tratamiento inicial y la respuesta al mismo, el tiempo transcurrido desde el diagnóstico y el tipo de recurrencia (local o difusa). También, siempre que es posible, se les ofrece a estos pacientes entrar en algún ensayo clínico con nuevos fármacos. Sin embargo, la mayoría de las opciones puestas en práctica hasta la fecha para tratar un glioma recidivado: una nueva cirugía, la utilización de otros agentes quimioterapéuticos como las nitrosueras o las sales platino (Westphal et al., 2003), los inhibidores de topoisomerasas o la administración de anticuerpos monoclonales como el bevacizumab (Kreisl et al., 2009) han fracasado a la hora de producir un incremento de la supervivencia de estos pacientes.

5. EGFR en gliomas

EGFR, también llamado *HER1* o *ErbB1*, pertenece a la familia de receptores quinasa tipo I. *EGFR* es el receptor de ligandos extracelulares de la familia EGF entre las que se hallan el propio *EGF* (del inglés *Epithelial growth factor*), el factor de crecimiento transformante alfa (*TGF- α* , del inglés *Transforming growth factor alpha*), anfirregulina, betacelulina, epirregulina y el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (*HB-EGF*, del inglés *Heparin-binding EGF-like growth factor*) (Yarden, 2001). *EGFR* está codificado por un gen de gran tamaño localizado en la región cromosómica 7p11-13, que consta de 28 exones. La proteína de 1.186 aminoácidos consta de tres regiones principales: la extracelular (EC), la transmembrana (TM) y la intracelular (IC), esta última con actividad tirosina quinasa (TK) (Zhang et al., 2006). Se estima que ***EGFR* está amplificado en el 30-40 % de los gliomas y sobre-expresado en aproximadamente el 50 % de los tumores** (Furnari et al., 2007) (Riddick and Fine, 2011). Esta amplificación es poco frecuente en pacientes jóvenes, siendo la media de edad de los pacientes con dicha alteración de 62 años (Ohgaki and Kleihues, 2013). Como ya hemos mencionado, la amplificación de *EGFR* es relativamente común en GBs del subtipo clásico (69 %) (Hatanpaa et al., 2010). Desde el punto de vista neuropatológico, la identificación de la amplificación de *EGFR* o de otras mutaciones en el receptor son indicios

de que el tumor es un GB o de que debería ser tratado como tal, aunque no se detecten necrosis y proliferación vascular en la biopsia (Heimberger et al., 2005).

Existen varios mecanismos de activación de la vía de señalización de EGFR. En primer lugar, la sobre-expresión del receptor podría generar por sí misma una acumulación local del dominio quinasa capaz de desencadenar su activación, de forma similar a la sobre-expresión y/ o amplificación génica de sus ligandos (Endres et al., 2011) (Yung et al., 1990). En segundo lugar, muchos de los gliomas con *EGFR* amplificado presentan mutaciones adicionales en dicho gen, siendo muy frecuentes las deleciones que originan las variantes EGFRvI a EGFRvV (Endres et al., 2011) (Zawrocki and Biernat, 2005), con una actividad alterada y capaces de promover el crecimiento tumoral (Nicholas et al., 2006) (Zawrocki and Biernat, 2005). En particular, **la forma mutante EGFRvIII representa el 50 % de las mutaciones existentes en gliomas** y se halla en el 30 % de los tumores. Se caracteriza por la deleción de los exones 2 a 7 del dominio EC y codifica un receptor que carece de los aminoácidos 6 a 273, con una nueva conformación terciaria del dominio EC (Frederick et al., 2000). Se ha propuesto que el efecto oncogénico de EGFRvIII se debe a su actividad quinasa constitutiva, de hecho, se ha descrito una señalización particular para la forma EGFRvIII (Ramnarain et al., 2006), capaz de activar de forma selectiva o constitutiva las rutas que implican a PI3K (Narita et al., 2002) (Zhu et al., 2009), Ras (Prigent et al., 1996), JNKs (del inglés *c-Jun N-terminal kinases*) (Antonyak et al., 1998), SFKs (del inglés *Src family kinases*) (Lu et al., 2009), uPAR (del inglés *Plasminogen activator urokinase receptor*) (Hu et al., 2011) y NF-κB (del inglés *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Puliyappadamba et al., 2013). Asimismo, la expresión de EGFRvIII se produce exclusivamente junto con la amplificación de *EGFR* (Frederick et al., 2000), sugiriendo la existencia de una comunicación entre el receptor mutante y el salvaje en las células tumorales que podría regular la acción oncogénica de ambos receptores (Li et al., 2014). También se han identificado mutaciones puntuales sin sentido en la región extracelular del receptor que favorecen su dimerización y poseen actividad oncogénica (Nicholas et al., 2006). Sin embargo, la presencia de mutaciones en la región intracelular de EGFR, que es frecuente en otro tipo de neoplasias (Minna et al., 2004), no se ha detectado en gliomas (Pines et al., 2010).

La señalización de EGFR consta de tres etapas: la dimerización de los dominios EC inducida por la interacción con un ligando específico; la autofosforilación de residuos tirosina específicos del dominio IC y el reclutamiento de moléculas que se asocian con las fosfotirosinas de EGFR, que son fosforiladas en su mayoría por el propio receptor. Estas interacciones conectan la activación del dominio TK de EGFR con la señalización a través de una serie de vías de gran importancia biológica (**Figura I3**).

EGFR se ha relacionado con la proliferación celular a través de la activación de la **vía de señalización de las MAPKs** en especial ERK (del inglés *Extracellular signal-regulated kinases*) (Pearson et al., 2001), habiendo además mutaciones en moléculas de esta vía de

señalización, entre las que destacan las que activan a Ras y sobre todo las que inactivan la función de NF1 (Riddick and Fine, 2011).

La **señalización** a través de **PLC γ** (del inglés *Phospholipase C-gamma*) y de **PKC** (del inglés *Protein kinase C*) inducida por EGFR se asocia a la regulación de la proliferación, la apoptosis, la supervivencia y la migración celular (Mackay and Twelves, 2007). Además, conduce a la translocación nuclear de NF- κ B, que induce la supresión de señales pro-apoptóticas (Yang et al., 2013).

EGFR modula el balance entre senescencia y apoptosis a través de la **vía de señalización de PI3K**, con la generación del segundo mensajero PIP3 (del inglés *Phosphatidylinositol (3,4,5)trisphosphate*) y la activación de AKT, cuya señalización inhibe la muerte celular programada y favorece la expresión de genes implicados en la supervivencia celular (Bai et al., 2009; Koul, 2008). En los GB es frecuente la presencia de alteraciones (mutaciones activadoras y amplificaciones) en moléculas de la vía de PI3K (Kita et al., 2007) (Mizoguchi et al., 2004) (Sun et al., 2010), asociadas a una evolución clínica desfavorable. Por otro lado, la proteína supresora tumoral PTEN, cuando su gen se encuentra deleccionado, mutado o genéticamente silenciado, induce la activación de la vía de AKT. Estas alteraciones ocurren en el 40-50 % de los gliomas (Koul, 2008).

La activación de la **vía de señalización de STAT3** (del inglés *Signal transducer and activator of transcription 3*) a través de EGFR, o de otras moléculas, provoca su dimerización y translocación al núcleo donde actúa modificando la expresión de determinados genes (Levy and Darnell, 2002) asociados con la progresión del ciclo celular, la muerte celular por apoptosis y la inmunosupresión en GB (Brantley and Benveniste, 2008; See et al., 2012).

Por otro lado, se ha descrito la **sobre-expresión** conjunta de **EGFR y SRC** en tumores humanos, asociado a un crecimiento tumoral descontrolado (Zhang et al., 2004). SRC es mediadora del tráfico de EGFR hacia la mitocondria y de su interacción con CoxII, (Yue et al., 2008) además de permitir la regulación del consumo de glucosa, la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis (Cao et al., 2011; Demory et al., 2009).

Se ha detectado la presencia de **EGFR y EGFRvIII en el núcleo** de células de GBs primarios, en las que cooperan con STAT3. Asimismo, se ha caracterizado una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*) adyacente al dominio TM de EGFR (Hsu and Hung, 2007), que permite su translocación desde la superficie celular al núcleo (Lo, 2010), donde mantendría su actividad quinasa, incrementando la proliferación celular a través de PCNA (del inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) (Wang et al., 2006) o modulando la respuesta al daño en el ADN a través de DNA-PK (del inglés *DNA-dependent protein kinase*) (Dittmann et al., 2007).

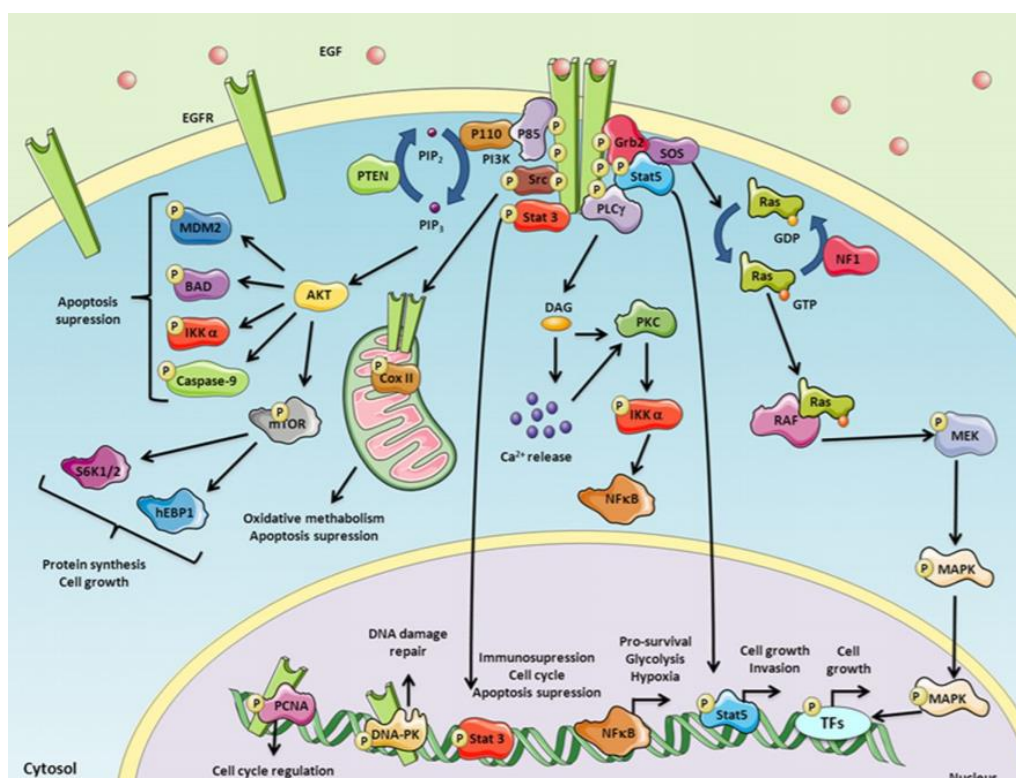


Figura 13. Vías de señalización de EGFR dependientes de la actividad quinasa del receptor. Imagen adaptada de Zahonero et al., 2014

En los últimos años se han desarrollado estrategias muy diversas destinadas a bloquear la señalización de EGFR, tanto para ser empleadas como monoterapia como en combinación con la terapia convencional. Entre ellas cabe destacar las terapias con anticuerpos monoclonales, como el cetuximab o nimotuzumab, y pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad tirosina quinasa (TKIs, del inglés *tyrosine kinase inhibitors*), entre los que destacan gefitinib, erlotinib y dacomitinib. De hecho, este último fue testado en nuestro propio laboratorio para evaluar su eficacia en modelos preclínicos (Zahonero et al., 2015). Sin embargo, hasta el día de hoy los ensayos clínicos no han sido muy alentadores, ya que no han producido una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes (Zahonero et al., 2014; Sepúlveda-Sánchez JM et al., 2017).

6. IDH en gliomas

El gen *IDH* se encuentra localizado en el cromosoma 2 y forma parte de la familia de los genes que codifican para las enzimas isocitrato deshidrogenasa (IDH1, IDH2 e IDH3), proteínas homodiméricas que comparten características estructurales. La diferencia fundamental entre las tres enzimas es a nivel de localización intracelular, mientras que IDH1 se encuentra en el citoplasma, IDH2/3 son isoformas mitocondriales. En cualquier caso, todas ellas catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -KG (del inglés *α -ketoglutarate*), utilizando como cofactores NADP⁺ (del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) (IDH1/2) o NAP⁺ (del inglés *nicotinamide adenine phosphate*) (IDH3) y generando NADPH (del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced*) o NADH (del inglés *nicotinamide adenine phosphate reduced*) respectivamente, estando estos relacionados con la supresión de la apoptosis, estimulación de la supervivencia y crecimiento celular. Por tanto, las enzimas IDH, aparte de estar asociadas con la síntesis de energía (Ciclo de Krebs), también contribuyen a la protección celular.

Las mutaciones de *IDH* son somáticas y monoalélicas y generan un cambio de un residuo de arginina localizado en el centro activo de la enzima. La mutación que de forma más frecuente aparece en IDH1 en los gliomas (más del 85% de los casos mutados) es la R132H, donde una arginina es sustituida por una histidina en la posición 132, y de forma análoga en el IDH2 (5% de los caso mutados) a nivel del codón R172 (Yan et al., 2009). Hasta la actualidad no se han encontrado mutaciones en IDH3 relacionadas con el cáncer (Gupta et al., 2011). Ambas mutaciones (IDH1/2) afectan al residuo crítico para la unión del isocitrato e impiden la actividad catalítica normal de la enzima. **Su acción pro-tumoral** está relacionada en parte con la **reducción en los niveles de NADPH**, lo que podría disminuir los niveles de glutatión presente en el organismo, que son necesarios para reducir el efecto deletéreo de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) (Pearson et al., 2008). Por otro lado, las mutaciones en *IDH1/2* inducen la **producción de un metabolito alternativo, el 2-HG** (del inglés *2-Hydroxuglutarate*) a expensas del α -KG (del inglés *alpha-ketoglutarate*), lo que podría inhibir la actividad de numerosas enzimas dependientes del segundo como desmetilasas de histonas (HDM), polil-hidroxilasas y las enzimas TET (del inglés *ten elven translocation*), lo que induciría **una metilación masiva de islas CpG** (Waitkus et al., 2016) (**Figura 14**). Estas islas constituyen el 40% de los promotores de los genes humanos y están caracterizadas por contener una gran concentración de pares de citosina y guaninas enlazados por fosfatos (Doi et al., 2009) (Malzkorn et al., 2011). La hiper-metilación en islas CpG es un evento epigénético común en muchos cánceres humanos (Cecener et al., 2012). Turcan y colaboradores han demostrado recientemente que mutaciones de IDH1 en cultivos primarios de astrocitos humanos inducen alteraciones específicas en las histonas que provocan la hiper-metilación del ADN y la remodelación del metiloma, favoreciendo el

fenotipo G-CIMP (Turcan et al., 2012), típico de GB con fenotipo proneural. En la mayoría de los casos las islas CpG están desmetiladas si los genes están expresándose, por lo que la hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras suelen causar silenciamiento transcripcional de genes (Baylin, 2008). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado un aumento en la expresión de ciertos genes tras ese estado de hiper-metilación (Noushmehr et al., 2010; Pike et al., 2008).

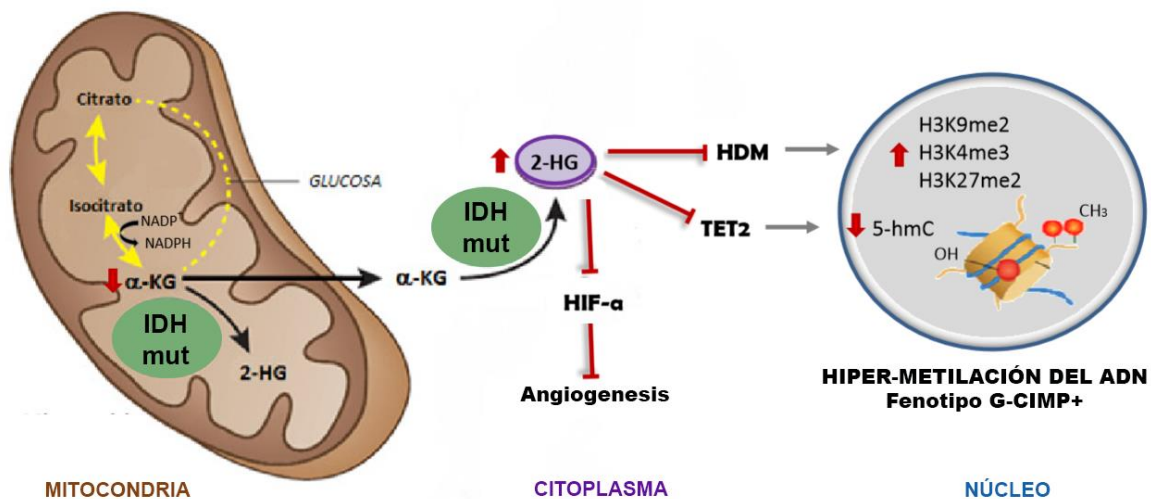


Figura 14. Imagen ilustrativa acerca de las funciones de IDH1/2 mutante en gliomas.

La mutación de *IDH1/2* se observa en el 60-90% en los gliomas de bajo grado con una distribución de 59-88% en el caso de los astrocitomas difusos, 68-82% en los oligodendrogliomas y de 50-100% en oligoastrocitomas. En el caso de los GB la mutación de *IDH1* se observa alrededor de un 10% (Parsons et al., 2008). Así, los GB con *IDH1* wild type (wt) suponen un 90% de los casos diagnosticados, en su mayoría son de origen primario, y suelen presentar al mismo tiempo mutaciones en el promotor del gen *TERT* (que codifica una subunidad catalítica de la enzima telomerasa) y en *EGFR*. Por el contrario, los GB con *IDH1/2* mutado suponen un bajo porcentaje de los casos diagnosticados, suelen ser GB secundarios y muestran de forma muy frecuente alteraciones en *Tp53* y *ATRX* (Figura 11). Estos últimos presentan un mejor pronóstico ya que la supervivencia media tras el tratamiento es de 31 meses frente a los 15 meses de los pacientes diagnosticados con un GB *IDH1/2* no mutado (Hartmann et al., 2010). Además, los pacientes que presentan la mutación en *IDH1/2* son más jóvenes, hecho que junto a su distribución sugiere que la mutación tiene lugar en una etapa precoz en la tumorigénesis (Parsons et al., 2008).

El papel de las mutaciones en *IDH1/2* como factor predictivo de respuesta al tratamiento convencional es controvertido, con datos a favor y en contra de una mayor sensibilidad por

parte de los tumores mutados (SongTao et al., 2012) (Yang et al., 2015). En cualquier caso, se han puesto grandes esperanzas en el desarrollo de inhibidores y vacunas anti-IDH1/2 mutante que podrían tener una utilidad terapéutica en los tumores con esta alteración molecular (Rohle et al., 2013) (Schumacher et al., 2014). Sin embargo, estas terapias podrían tener efectos negativos a largo plazo, dada la relación de las mutaciones en *IDH1/2* con el comportamiento menos agresivo de los gliomas. Aunque no se conocen en detalle los motivos de este comportamiento, se ha propuesto recientemente que el 2-HG podría inhibir la señalización de HIF1a a través de la regulación de prolil-hidroxilasas (Koivunen et al., 2012), bloqueando procesos de invasión y angiogénesis, así como la remodelación de la matriz extracelular (Miroshnikova et al., 2016) (**Figura I4**).

7. Células madre tumorales en gliomas

Como ya hemos mencionado, los GB son muy resistentes a las terapias existentes y recidivan en la mayoría de los casos. Entre las causas que ayudan a explicar este hecho está la dificultad para llevar a cabo una resección quirúrgica completa del tumor (lo que permite que queden células tumorales residuales) y la dificultad de muchos fármacos para llegar al cerebro. Asimismo, se ha propuesto la existencia dentro de este tipo de tumores de una población de células, con características similares a las células progenitoras, que son altamente resistentes a los tratamientos antitumorales. A estas células se las denomina comúnmente células madre cancerosas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*). (Piccirillo and Vescovi, 2006) (Alcantara Llaguno et al., 2009) (Friedmann-Morvinski et al., 2012). Este tipo de células han sido aisladas de distintos tipos de tumores primarios, incluyendo los gliomas más agresivos, denominándose en este caso **GSCs** (del inglés *glioma stem cell*). Estas células se caracterizan por presentar una capacidad ilimitada de auto-renovación, tanto *in vitro* como *in vivo*, por su capacidad de formar una progenie diferenciada y por su habilidad para generar tumores tras ser inyectados intracranalmente, dando lugar a un tumor fenotípicamente idéntico al original y que reproduce la heterogeneidad celular presente en la lesión inicial (Singh et al., 2004). La elevada resistencia a las terapias tradicionales de las GSCs se puede explicar por varios motivos. Por un lado, estas células suelen encontrarse en un estado quiescente (fase G_0 del ciclo celular), lo que les hace menos susceptibles a los agentes que generan daño en el ADN, como la TMZ. Por otro lado, presentan altos niveles de expresión de proteínas o transportadores de membrana del tipo ABC (del inglés *ATP-binding cassettes*), que funcionan como ATPasas que expulsan los agentes quimioterapéuticos del interior celular, o de la enzima citosólica ALDH (del inglés *aldehyde dehydrogenase*), que actúa como detoxificante (Bleau et al., 2009; Dean, 2005). Además, las vías asociadas al mantenimiento del *fenotipo stem-like* como HIF1a, NOTCH, WNT o SHH, incrementan distintas señales de supervivencia, lo cual les hace más resistentes a la radioterapia y a la TMZ (Ulasov

et al., 2011). De esta forma, los tratamientos convencionales podrían actuar sobre la población mayoritaria de células tumorales diferenciadas, pero serían ineficaces a la hora de eliminar estas células iniciadoras de glioma.

Aún no se conoce en profundidad los detalles de la diferenciación y el mantenimiento de las GSCs, pero están implicados tanto factores intrínsecos como el microambiente que les rodea, en particular el componente vascular. De hecho, diversos estudios han demostrado que las células tumorales organizan sus nichos vasculares de manera que propicien las condiciones metabólicas y la señalización extrínseca adecuada para el mantenimiento de las GSCs (Calabrese et al., 2007) (Gilbertson and Rich, 2007).

Recientemente se ha puesto en duda que las células con características *stem* del tumor sean realmente una entidad clonal (modelo jerárquico de las GSCs). Alternativamente se ha propuesto que las características *stem* son propias de un estado celular plástico que las células pueden adquirir en función del microambiente que las rodea. Así, el potencial tumorigénico de las células de GB estaría ligado a una plasticidad intrínseca de las células tumorales, en vez de a la multipotencialidad de un grupo de GSCs en particular (Dirkse et al., 2019). Esta nueva interpretación genera la necesidad de encontrar los reguladores moleculares de la plasticidad celular más que los marcadores específicos de célula *stem*. En cualquier caso, ya se considere que las GSCs son entidades celulares diferenciales o no, las propiedades de dichas células se pueden promover *in vitro* cuando se crecen en ausencia de suero, en forma de esferas en suspensión (neuroesferas), en un medio específico suplementado con los factores EGF y el factor de crecimiento de fibroblástico (bFGF, del inglés *basic fibroblastic growth factor*). Este medio se desarrolló en realidad para el crecimiento de las células madre neurales, lo que refuerza la similitud con dichas células (Lee et al., 2006).

De la misma manera que se han identificado diferentes subtipos de GB mediante estudios genéticos y análisis de expresión génica, también se han realizado diversos estudios moleculares, incluyendo los de nuestro propio laboratorio, para la caracterización de la heterogeneidad de las GSCs (Gunther et al., 2008) (García-Romero et al., 2016; Lottaz et al., 2010). La mayoría de estos estudios coinciden en categorizar estas células en dos subtipos: **GSCs Proneurales (GSCs PN)** y **GSCs Mesenquimales (GSCs MES)**, cada una de ellas con alteraciones moleculares distintas, responsables de su fenotipo. Las GSCs PN se caracterizan a nivel molecular por un patrón de expresión de genes implicados en el desarrollo neurológico mientras que las GSCs MES muestran un patrón de expresión enriquecido en genes relacionados con matriz extracelular, tales como integrinas. Hay marcadores comunes para ambos tipos de GSCs como la Nestina pero otros muchos son diferenciales. Entre los marcadores que identifican a las GSCs PN destacan CD133 (o prominina I) y la vía de señalización de NOTCH (DLL3, HES6 y NOTCH4), la cual está implicada en el mantenimiento de la división de los precursores neurales y del fenotipo *stem* (Shih and Holland, 2006). El

marcador por excelencia de las GSCs MES es la alta expresión de CD44, además de la ausencia de CD133.

Las GSCs PN tienen una mayor capacidad para invadir el parénquima cerebral cuando son inyectadas en cerebros de ratones inmunocompetentes, lo cual se ha asociado con la mayor expresión de Olig2 (Neov et al., PLoS One 2014). Sin embargo, **las GSCs MES** generan tumores más agresivos y **tienen una mayor capacidad angiogénica** (Bradshaw et al., 2016b) (Bradshaw et al., 2016a) (García-Romero et al., 2016) (Bougnaud et al., 2016). Asimismo, las GSCs MES tendrían una mayor plasticidad celular, modulada por su interacción con el microambiente y gobernada por procesos de transición mesenquimal (EMT, del inglés *epithelial-to-mesenchymal transition*), muy importantes para el GB. La EMT es un proceso celular dinámico y reversible en el que las células pierden la capacidad de polarizarse y las uniones intercelulares, y adquieren características mesenquimales, como una mayor resistencia a la apoptosis y una elevada capacidad de migración (Kalluri, 2009) (Kalluri and Weinberg, 2009) (Thiery et al., 2009) (Thiery, 2009). Esta mayor plasticidad está ligada a una mayor capacidad tumoral, tal como mencionamos anteriormente (Dirkse et al., 2019). Asimismo, recientemente se ha propuesto que la EMT permite a las células tumorales trans-diferenciarse en células funcionalmente similares a los pericitos (que tienen un linaje mesenquimal) y promover así la angiogénesis. (Yi et al., 2018) (Shenoy et al., 2016). Uno de los principales reguladores de este proceso de EMT es el factor de transcripción TAZ o WWTR1 (del inglés *WW domain-containing transcription regulator 1*), que juega un papel importante en la proliferación celular, migración e invasión (Lei et al., 2008; Zhang et al., 2009). De hecho, estudios recientes han demostrado la expresión exclusiva de TAZ en las GSC MES y la ausencia de expresión en las GSC PN (Bhat et al., 2011), atribuyéndole a TAZ la responsabilidad del mantenimiento de las propiedades *stem* mesenquimales.

8. Alzheimer y cáncer, ¿dos enfermedades opuestas?

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas se desarrollan en el mismo tejido que los tumores cerebrales, además de ocurrir en un rango de edad similar. Sin embargo, a pesar de ello poco es conocido acerca de la relación entre ambas patologías. En el caso de otros cánceres hay evidencias sólidas que apuntan a una **comorbilidad inversa de las enfermedades oncológicas y neurodegenerativas** (Inzelberg and Jankovic, 2007; Ma et al., 2014; Sorensen et al., 1999), explicado en parte por la regulación inversa de las señales de proliferación y supervivencia entre los dos tipos de patologías. Sin embargo, en el caso de los tumores cerebrales, y de los gliomas en concreto, existen datos contrapuestos sobre la interacción y comorbilidad de dichas enfermedades. Para intentar aclarar la relación entre ambas patologías recientemente se ha realizado un estudio bioinformático en nuestro

laboratorio, en el cual hemos analizado la presencia en gliomas de las alteraciones genéticas (amplificaciones o mutaciones) comúnmente presentes en determinadas enfermedades neurodegenerativas como en el Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*), el Parkinson (PD, del inglés *Parkinson's disease*) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Los genes escogidos para este estudio relacionados con AD fueron: *APP*, *Tau/MAPT*, *presenilina 1*, *presenilina 2*; *APOE*, y *GSK3B*, para el PD: *GBA*, *LRRK2*; *Parkin/PARK2*, *PARK7*, *PINK1*, *α -sinucleína* y para el ELA: *UCHL1*, *C9orf72*, *TARDBP*, *SOD1* *FUS*, *Ubiquilina 2* y *HNRNPA2B1*. Como puede observarse en la **Figura I5**, ninguno de estos genes mostró una alta frecuencia de mutaciones somáticas o alteración en el número de copias (Gargini et al., 2019), lo que sugiere que **alteraciones en los genes implicados en enfermedades neurodegenerativas no están relacionadas con la formación de gliomas.**

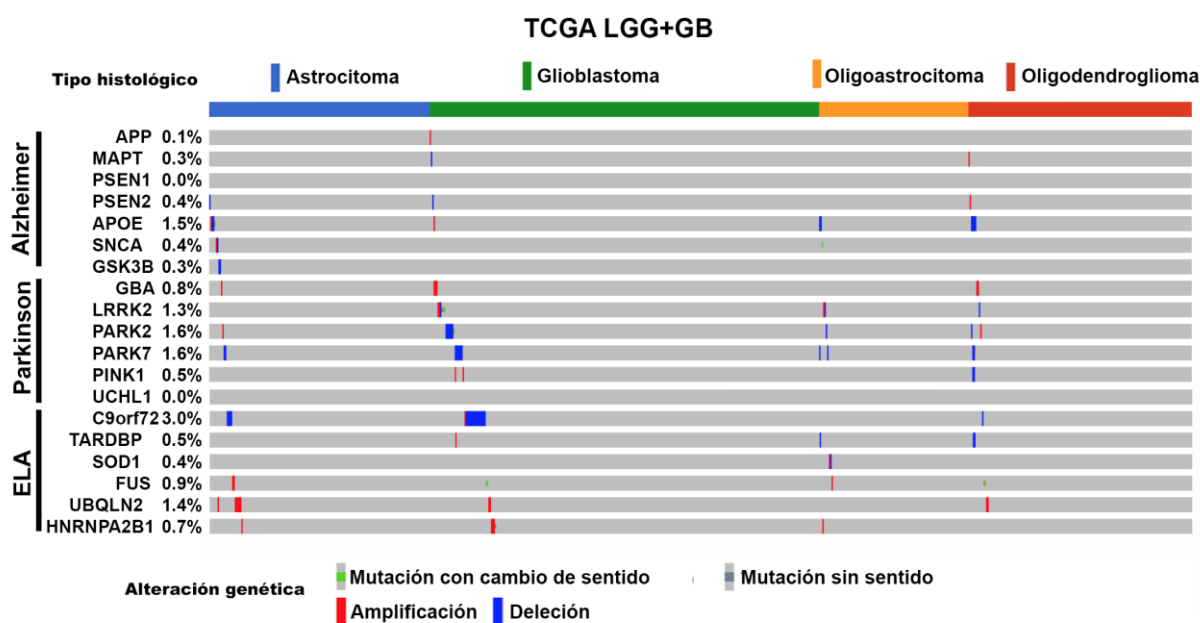


Figura I5. Histograma de la presencia de las mutaciones somáticas no-silentes y la variación en el número de copias de los genes alterados en AD, PD and ELA, en la cohorte de TCGA para gliomas de acuerdo a la clasificación histológica. (Imagen adaptada de Gargini et al.,2019)

Posteriormente se analizaron los niveles de expresión de estos mismos genes en gliomas. Por un lado se comparó la expresión entre tumores primarios y tumores recurrentes y, por el otro, se analizó la expresión en función del grado histológico, es decir, como varía la expresión a medida que evoluciona un glioma de LGG (grado II y III) a GB (grado IV). Se observó que la mayoría de estos genes aparecen disminuidos en ambos casos (**Tabla I1**). Finalmente se estudió la implicación de la expresión de estos genes en la supervivencia de los pacientes con glioma, donde se observó que altos niveles de expresión de la mayoría de los genes

seleccionados se asocian significativamente con una disminución en la agresividad tumoral. Estos resultados sugieren que existe una correlación inversa entre ambas patologías, ya que **los genes implicados en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas suponen un freno para el desarrollo de los gliomas**. De todo este análisis cabe destacar la **fuerte desregulación del gen *Tau/MAPT* en los gliomas**, lo que sugiere que este gen, implicado en el desarrollo de la enfermedad del Alzheimer, podría desempeñar también un papel importante en los gliomas, previniendo la evolución clínica de estos tumores. Sin embargo, haría falta un estudio detallado de la función de Tau en los gliomas para entender su implicación en este tipo de cáncer, así como la posible correlación entre ambas enfermedades.

	Cerebro normal/Tumor primario/Recurrencia		Grado histológico (G2/G3/G4)		Supervivencia (media en días, test estadístico)		
	Valor F anova	Patrón de expresión	Valor F anova	Patrón de expresión	Alta expresión	Baja expresión	Valor Long-Rank
ALZHEIMER							
APP	7.92	N>P>R	2.3	G2>G3>G4	2660	1209	6.4
MAPT	9.88	N>P>R	241.1	G2>G3>G4	2975	489	148.8
APOE	6.57	N<P>R	42.2	G2>G3>G4	2660	918	44.2
PARKINSON							
PARK2	16.27	N>P>R	82.2	G2>G3>G4	2703	880	66.6
PINK1	13.23	N>P>R	77.1	G2>G3>G4	2660	919	45.2
SNCA	15.25	N>P>R	15.1	G2>G3>G4	2235	1137	13.1
UCHL1	10.48	N>P>R	13.9	G2>G3<G4	1233	2000	8.2
ELA							
UBQLN2	7.95	N>P>R	104.4	G2>G3>G4	2875	737	106.5
HNRNPA2B1	4.88	N<P<R	4.4	G2<G3>G4	1120	2000	5.1

Tabla 11. Análisis de la expresión y supervivencia de los genes relacionados con Alzheimer, Parkinson y ELA en la cohorte de TCGA para gliomas. (Imagen adaptada de Gargini et al., 2019)

9. Proteína Tau asociada a microtúbulos

Tau es una proteína que se asocia a microtúbulos y que tiene un papel importante en el ensamblaje y estabilización de los mismos en las neuronas, regulando por tanto el crecimiento axonal. Estructuralmente es una proteína altamente soluble y que muestra poca tendencia a la agregación. Tau es codificada por el gen *MAPT*, que comprende 16 exones y que se localiza en el cromosoma 17q21 (Leroy et al., 2006). El cerebro humano adulto presenta seis isoformas de Tau, que son generadas por “*splicing*” alternativo del exón 2 (E2), E3 y E10. Estas isoformas difieren del número de inserciones de residuos de 29 aminoácidos en la región amino-terminal, codificadas por E2 y E3. Las isoformas contienen 0, 1 o 2 inserciones conocidas como 0N, 1N o 2N, respectivamente. Además, las isoformas también se clasifican según presenten tres o cuatro dominios de repetición carboxi-terminales, 3R o 4R respectivamente, esta última repetición codificada por el E10 (Lee et al., 1988). La presencia de cuatro dominios de repetición carboxi-terminales (4R) permite que Tau tenga una mayor afinidad por los microtúbulos (Goedert and Jakes, 1990).

Tau presenta diferentes funciones fisiológicas en diferentes compartimentos celulares. En los axones de las neuronas sanas Tau regula la reorganización del citoesqueleto (Feinstein and Wilson, 2005; Mandelkow and Mandelkow, 2012). Además, regula el transporte axonal anterógrado y retrogrado por diferentes mecanismos, entre ellos mediante la regulación de las principales proteínas de transporte, las dineínas y kinesinas (Dixit et al., 2008). Una pequeña cantidad de Tau se distribuye en las dendritas, donde podría estar involucrado en la regulación de la plasticidad sináptica (Franssen et al., 2014). Tau también ha sido detectado en el núcleo de neuronas y células no neuronales como los fibroblastos o células de neuroblastoma humano, donde parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad del ADN y el ARN (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014).

En condiciones patológicas, particularmente en AD y otras Tauopatías, Tau presenta diferentes modificaciones post-transcripcionales, como fosforilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones y truncaciones, que provocan el desacoplamiento de Tau de los microtúbulos y la **formación de agregados tóxicos de dichas proteínas**. Su desprendimiento conduce a una localización errónea en el interior de las dendritas o en las terminaciones presinápticas, causando una **pérdida de la sinapsis**. Además, se pierde su función protectora nuclear, lo que provoca **daños en el ADN** (Hoover et al., 2010). De manera adicional se han identificado más de 80 mutaciones en el gen humano *Tau/MAPT*, la mayoría cerca del sitio de unión a los microtúbulos, las cuales reducen la afinidad a los mismos e incrementan la tendencia de agregación de la proteína (Barghorn et al., 2000). Otras mutaciones comunes fuera de ese dominio de unión a microtúbulos están implicadas en interrumpir el cofactor esencial para la dineína, **afectando el transporte axonal** (Magnani et al., 2007). Asimismo, recientemente se ha postulado que la pérdida de función de Tau produce una inhibición de la respuesta a insulina en las células hipocámpicas, lo que podría estar relacionado con la resistencia a insulina de los pacientes con AD (Marciniak et al., 2017) (Wang and Mandelkow, 2016).

En el cerebro, Tau se encuentra principalmente en las neuronas, aunque también está presente en bajos niveles en células gliales (LoPresti et al., 1995). Asimismo, existen algunas evidencias de su expresión en gliomas (Lopes et al., 1992; Miyazono et al., 1993). Este hecho, junto con la correlación inversa entre la expresión de Tau y el aumento de la agresividad de los gliomas, sugieren que dicho gen puede ser relevante en esta patología.



HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Hipótesis

La proteína Tau podría estar implicada en el desarrollo de los gliomas promoviendo una menor agresividad tumoral. Dado su mayor expresión en gliomas de bajo grado en comparación a los GB, hipotetizamos que la expresión y/o función de Tau podría estar directamente relacionada con la presencia de mutaciones en *IDH1/2* e inversamente relacionadas con las mutaciones típicas de gliomas de alto grado, como es el caso de las alteraciones en *EGFR*.

Objetivos

- Analizar la expresión de Tau en muestras de pacientes diagnosticados con gliomas de bajo y alto grado.
- Evaluar la distribución de las principales alteraciones genéticas de los gliomas en función de la expresión de Tau.
- Caracterizar la interacción entre la expresión y/o función de Tau y el estatus génico de *IDH1/2*.
- Caracterizar la interacción entre Tau y la vía de señalización del receptor de EGF.
- Generar nuevos modelos de gliomas donde analizar la interacción de Tau con IDH y EGFR.
- Caracterizar la función de Tau como inhibidor de la agresividad de los gliomas.



MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla M1. Reactivos utilizados en las técnicas descritas

Reactivos	Proveedor
Ácidos, disolventes, sales	Panreac, Sigma, Merck
Material fungible	Nunc, Falcon, Costar, DeckWorks, Corning
Biología molecular	
Albumin Standard	Thermo Scientific, 23209
Ammonium persulfate (APS)	Sigma, A3678
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo, 23225
Albumin from Bovine Serum (BSA)	Sigma-Aldrich, A7906
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, 12604600
RNase-Free DNase Set	Qiagen, 79254
GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, G1N70
Immobilion™ Western Chemiluminiscent HRP substrate	Millipore, WBKL50100
Leche en polvo desnatada	Sveltesse
LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white	04729692001
Protogel 30% Acrylamide: 0,8% Bis-Acryl-amide Stock solution	Roth, 3029.1
Membrana nitrocelulosa Hybond ECL	Amersham, RPN203D
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma, T7024
Medical X-Ray Film	AGFA, ENKMV
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo, 26619
PMSF	Sigma, 93482
Prestained Protein MW Marker	Thermo, 26612
RNase-Free DNase Set	Qiagen, 79254
RNeasy mini kit	Qiagen, 74104
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	Sigma, L3771
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, 18064-014
Syber Premix Ex Taq	Takara, RR041A
Tween 20	Sigma, P2287

Cultivos celulares

Accumax	Millipore, SCR006
B27 Supplement	Gibco, 17504-044
BD Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced	BD, 354230
Bovine Serum Albumin (BSA) for cell culture	Sigma-Aldrich, A9418
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma, D2650
DMEM	Lonza, BE12-604F
Fetal Bovine Serum (FBS)	Lonza, DE14-701F
Freezing medium, serum free	IBIDI, 80022
Glutamax	Gibco, A12860-01
Heparina	Sigma, H3149
Hepes Buffer 1M	Invitrogen, 1530056
L-Glutamine 200 mM	Lonza, BE17-605E
Neurobasal	Gibco, 21103-149
10X DPBS	Lonza, 17-515Q
Penicillin/Streptomycin	Lonza, DE17-602E
Polybrene	Sigma, H9268
Recombinant human EGF	Peptotech, AF-100-15
Recombinant human basic FGF	Peptotech, AF-100-18 B
Trypan Blue cell culture tested	Sigma, 02596LH

Ensayos *in vivo*

Antisedan	Esteve
Dotarem (Gd-DOTA)	Guerbet
Hystoacryl	B-Brawn, 1050052
Imalgene	Merial Laboratorios
Isobavet	Schering-plough
Lubrithal	Laboratorio DECHRA
Metacam	Boehringer Ingelheim
Sondas intragástricas	Fine Science Tools
Xylacine	Calier

Histología e inmunofluorescencia

Azida sódica	Panreac,
Bromodeoxyuridine	Sigma, B5002
Cubreobjetos circulares 12 mm	LINEA LAB, 12CIR -1
4'-6-Diamindino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI)	Sigma, D9542
Fluromount	Cultek, 0100-01
Gelatina	Sigma-Aldrich
Parafilm	Sigma, P7793-1EA
Paraformaldehyde	Panreac, 141451
Triton X-100	Sigma, X100

Tabla M2. Muestras de pacientes humanos

En la tabla se muestra los resultados del estudio genético de *EGFR* (mediante secuenciación o IHQ) y de *IDH1/2* (por IHQ) para las distintas muestras de pacientes utilizadas en este trabajo. (GB: Glioblastoma, A: astrocitoma, O: Oligodendroglioma, -R: Recidiva, amp: amplificado, wt: wild type, mut: mutado, n.d: no diagnosticado)

Identificación de la muestra	Grado histológico	<i>EGFR</i>	<i>IDH1</i>
12o01	GB	amp-vIII	n.d
12o02	GB	wt	n.d
12o07	GB	amp	wt
12o09	GB	wt	n.d
12o10	GB	n.d	n.d
12o11	GB	n.d	n.d
12o12	GB	amp-vIII	wt
12o13	GB	amp	wt
12o14	GB-R	n.d	n.d
12o15	GB-R	wt	wt
12o16	GB	wt	n.d
12o17	GB	wt	n.d
12o18	GB-R	wt	n.d
12o21	GB	wt	mut
12o23	GB	amp	wt
12o27	GB	amp	wt
12o28	GB-R	n.d	n.d
12o30	GB-R	n.d	n.d
12o32	GB	n.d	n.d
12o33	GB-R	mut	wt
12o37	GB	n.d	n.d
12o38	GB	n.d	n.d
12o40	GB	wt	n.d
12o41	O III	n.d	n.d
12o42	GB	n.d	n.d
12o43	AIII	wt	mut
12o45	GB	n.d	n.d
12o46	GB-R	n.d	n.d
12o47	GB-R	n.d	n.d
12o48	GB	n.d	n.d
12o49	GB-R	n.d	n.d
12o50	GB	n.d	n.d
12o51	GB	n.d	n.d
12o52	GB	n.d	n.d

Identificación de la muestra	Grado histológico	EGFR	IDH1
12o54	O II	n.d	n.d
12o56	AIII-R	wt	mut
12o58	A III -R	wt	wt
12o59	GB	n.d	n.d
12o62	All	n.d	wt
12o63	AIII-R	n.d	n.d
12o64	All	n.d	n.d
12o70	GB	amp-mut	wt
12o71	AIII	n.d	n.d
12o73	GB	wt	wt
12o74	GB	wt	wt
12o75	GB	amp-mut	wt
12o76	GB	amp	wt
12o77	GB	wt	wt
12o78	O II	n.d	n.d
12o79	GB	wt	wt
12o82	GB	n.d	wt
12o84	GB	amp-mut	wt
12o89	GB	mut	wt
12o97	GB	amp-mut	wt
12o107	GB	wt	wt
12o108	GB	wt	wt
12o113	GB	amp	wt
12o116	GB	wt	mut
12o118	GB	n.d	n.d
12o120	AIII	n.d	n.d
12o121	GB	amp	wt
12o122	GB	n.d	wt
12o124	GB	n.d	wt
12o126	GB	n.d	wt
12o127	GB	n.d	mut
12o129	All	wt	n.d
12o130	OII	n.d	n.d
12o131	GB	mut	wt
12o132	GB	amp	wt
12o133	GB	n.d	n.d
12o140	All	wt	mut
12o147	GB	n.d	n.d
12o148	GB	wt	wt
12o149	A II	wt	wt
12o150	GB	mut	n.d
12o151	AIII	n.d	mut
12o153	AIII	n.d	mut
12o157	GB	wt	mut
G001	GB	mut	wt
G002	GB	n.d	mut

Identificación de la muestra	Grado histológico	EGFR	IDH1
G004	GB	n.d	mut
G005	GB	n.d	wt
G006	GB	n.d	wt
G007	GB	mut	wt
G008	GB	n.d	wt
G009	O III	n.d	mut
G010	A II	n.d	mut
G011	GB	mut	wt
G012	GB	mut	wt
G014	O II	n.d	mut
G018	A II	n.d	mut
G020	O II	n.d	mut
G021	GB	mut	wt
G023	A III	n.d	mut
G024	O II	n.d	mut
G027	GB-R	n.d	n.d
G029	GB-R	n.d	wt
G035	GB	n.d	wt
G038	AIII	n.d	mut

Tabla M3. Líneas primarias de GB usadas en este estudio

En la tabla se muestra los resultados del estudio genético de *EGFR* por secuenciación para las distintas líneas utilizadas en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los valores 0/1 indican la ausencia/presencia respectivamente.

Línea celular	Origen	EGFR amp	EGFR mut
RG1	Mazzoneli et al.,	1	0
12o02	Hospital 12 de Octubre	0	0
12o12	Hospital 12 de Octubre	1	1 (VIII)
12o15	Hospital 12 de Octubre	0	0
12o40	Hospital 12 de Octubre	0	0
12o150	Hospital 12 de Octubre	1	1
GB4	Hospital 12 de Octubre	1	0
GB18	Hospital 12 de Octubre	1	0

Tabla M4. Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT- PCR con ADNc

Gen humano	Secuencia cebadores 5'-3'
CD133	Fw-GCCACCGCTCTAGATACTGC; Rv-TGTTGTGATGGGCTTGTCAT
CD248	Fw-GCCACCGCTCTAGATACTGC; Rv-GACACCACTGGCGACTTGTA
DDL3	Fw-AAACCTATGGGCTTGAGGAG; Rv-ATCGACTGACAACGTGGC
HPRT	Fw-TGACACTGGCAAACAATGCA; Rv-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
L1-CAM	Fw-TCGCCCTATGTCCACTACACCT; Rv-AGTTGGGATAATGGGAAGCGTGGT
LIF	Fw-CATGAACCAGATCAGGAG; Rv-TCGGCATGGAATGGTGATCTCAGT
MAPT	Fw-GTCGAAGATTGGGTCCCTGG; Rv-GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
NESTIN	Fw-GCGGCTGCGGGCTACTGAAA; Rv-GAGCCCTCAGATTTGACCTGTC
NG2	Fw-AGCTCTACTCTGGACGCC; Rv-TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC
OLIG2	Fw-CGGCTTTCCTCTATTTGGTT; Rv-CTGCTGATGTGCCAACTGTAGC
PDGFR β	Fw-ACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGA; Rv-CACGCCCTGTTCTTTGAAT
REST	Fw-CGGCTAACAATACTAATCG; Rv-ACTCTGTTAATTCGCTT
SERPINE	Fw-CATAGTGGAAGTGATAGAT; Rv-GGGTGTTTGCCTGCGTTTT
SNAIL1	Fw-ACCACTATGCCGCGCTCTT; Rv-TGTTGTGATGGGCTTGTCAT
SNAIL2	Fw-ATCTGCGGCAAGGCGTTTTCCA; Rv-AATGGAAAGTTGGGATCGAA
SOX2	Fw-GCGAACCATCTCTGTGGTC; Rv-ATCCACAGGGTCTTCTCTGGG
TAZ	Fw-TTTCCTCAATGGAGGGCCA; Rv-CGCTGAGTACAATCAGTGGAA
TWIST1	Fw-CCGGAGACCTAGATGTCATTG; Rv-TAGACTCGCTCATTATCC
ZEB1	Fw-GGCATACACCTACTCAATACGG; Rv-GCTGTGTAATAGAGAATAAAGAG
ZEB2	Fw-AATGCACAGAGTGTGGCAAGGC; Rv-CCAGCTGCTGCCGACCTTCC
α - SMA	Fw-TAGCACCCAGCACCATGAAGATCA; Rv-GTTACACGGCAGACGCTACA

Gen ratón	Secuencia cebadores 5'-3'
<i>ACTINA</i>	Fw-CCGGGACCTGACAGACTACCT; Rv-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA
<i>ANG1</i>	Fw-CATTCTTCGCTGCCATTCTG; Rv-GCACATTGCCCATGTTGAATC
<i>ANG2</i>	Fw-TTAGCACAAAGGATTCGGACAAT; Rv-TTTTGTGGGTAGTACTGTCCATTCA
<i>AQP1</i>	Fw-AGGCTTCAATTACCCACTGGA; Rv-GTGAGCACCCGCTGATGTGA
<i>CCL2</i>	Fw-AGGTCCCCTGTCATGCTTCTG; Rv-TCTCCAGCCTACTCATTGGG
<i>CD248</i>	Fw-TTGATGGCACCTGGACAGAGGA; Rv-TCCAGGTGCAATCTCTGAGGCT
<i>CD31</i>	Fw-TCCAGGTGTGCGAAATGCT; Rv-TGGCAGCTGATGCCTATGG
<i>ENG</i>	Fw-TGCACTTGGCCTACGACTC; Rv-TGGAGGTAAGGGATGGTAGCA
<i>EPHA2</i>	Fw-GCACAGGGAAAGGAAGTTGTT; Rv-CATGTAGATAGGCATGTCGTCC
<i>KDR</i>	Fw-TTTGGCAAATACAACCCTCAGA; Rv-GCAGAAGATACTGTCACCACC
<i>LMNA</i>	Fw-TTGCCTCAACTGCAATGACAA; Rv-TCTCGATGTCGGTAAAACCCC
<i>MMP9</i>	Fw-GCAAGGGGCCGTGTCTGGAGATTC; Rv-GCCCACGTCGTCCACCTGGT
<i>NG2</i>	Fw-GACGGCGCACACACTTCTC; Rv-TGTTGTGATGGGCTTGTGTCAT
<i>NRP1</i>	Fw-GCTTGTGCTCTATGCAGATCG; Rv-TCGACGAACTCCTGGTGATTTA
<i>PDGFα</i>	Fw-GATACCTCGCCCATGTTCTG; Rv-CAGGCTGGTGTCCAAAGAAT
<i>PDGFβ</i>	Fw-GGGCCCGGAGTCGGCATGAA; Rv-AGCTCAGCCCCATCTTCATCTTACGG
<i>PDGFRβ</i>	Fw-CCGGAACAAACACACCTTCT; Rv-TATCCATGTAGCCACCGTCA
<i>PGF</i>	Fw-GAGGCCAGAAAGTCAGGGGGC; Rv-ATGGGCCGACAGTAGCTGCGA
<i>PI3KC</i>	Fw-GCTCTTCGCCAATCACACAAAC; Rv-GGCATTCCTGTCATCAGCATC
<i>TEK</i>	Fw-ACGGACCATGAAGATGCGTCAACA; Rv-CACATCTCCGAACAATCAGCCTGG
<i>VE-CAD</i>	Fw-TTACTCAATCCACATACACATTTTCG; Rv-GCATGATGCTGTACTTGGTCATC
<i>VEGFA</i>	Fw-TGCCAAGTGGTCCCAGGCTGC; Rv-CCTGCACAGCGCATCAGCGG
<i>VEGFR2</i>	Fw-CATCACCGAGAACAAGAACAACAACT; Rv-GATACCTAGCGCAAAGAGACACATT
α -SMA	Fw-ACCATCGGCAATGAGCGTTTCC; Rv-GCTGTTGTAGGTGGTCTCATGG

Tabla M5. Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT- PCR con ADN genómico

Gen humano	Secuencia cebadores 5'-3'
<i>EGFR</i> (998bp)	Fw-CAGTATTGATCGGGAGAG; Rv-CATTCATAGCTGTCGGC
<i>EGFR</i> (1482bp)	Fw-CAACATGTCGATGGACTTCCA; Rv-TTCGCATGAAGAGGCCGATC
<i>EGFR</i> (1251bp)	Fw-GCCCCCACTGCGTCAAGACC; Rv-AGCTTTGCAGCCCATTCTA
<i>EGFR</i> (720bp)	Fw-CAGCGCTACCTTGTCATTCA; Rv-CTATCCTCCGTGGTCATGCT

Tabla M6. Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunodetección

Anticuerpo primario	Especie	Dilución uso	Proveedor
α SMA	Ratón	1:500(WB)	Santa Cruz
β -Actina (actina)	Ratón	1:100(IHQ)	Biotechnology
Acetyl-Tubulin	Ratón	1:1000 (WB)	Sigma
ANGPT2 (Ang2)	Ratón	1:5000 (WB)	Sigma
		1:100(IHQ)	Santa Cruz
			Biotechnology
BrdU	Ratón	1:300 (IHQ)	Dako
CD248	Ratón	1:500 (WB)	Santa Cruz
		1:100(IHQ)	Biotechnology
CD34	Ratón	1:100 (IHQ)	Leica
EGFR	Conejo	1:1000 (WB)	Cell Signalling
Endomucina	Rata	1:100(IHQ)	Santa Cruz
			Biotechnology
GADPH	Ratón	1:1000 (WB)	Santa Cruz
			Biotechnology
GFAP	Ratón	1:200 (IHQ)	Dako
GFP	Ratón	1:100 (IHQ)	Santa Cruz
			Biotechnology
IDH1 mut	Ratón	1:100(IHQ)	Dianova
IDH	Conejo	1:1000 (WB)	Cell Signaling
OLIG2	Ratón	1:100 (IHQ)	Santa Cruz
			Biotechnology
Phospho-EGFR (Tyr1068)	Conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling
Phospho-PDGFR β	Conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling
PDGFR β	Conejo	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Phospo-NFK β	Conejo	1:1000 (WB)	Cell Signaling

Tabla M7. Anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunodetección

Anticuerpo secundario	Especie	Dilución uso	Proveedor
Dylight 488 anti ratón IgG	burro	1:500 (IHQ)	Jackson Immunoresearch
Dylight 488 anti conejo IgG	burro	1:500 (IHQ)	Jackson Immunoresearch
Cy3 anti ratón IgG	cabra	1:500 (IHQ)	Jackson Immunoresearch
Cy3 anti conejo IgG	burro	1:500 (IHQ)	Jackson Immunoresearch
Cy5 anti conejo IgG	burro	1:500 (IHQ)	Jackson Immunoresearch
Cy5 anti rata IgG	burro	1:500 (IHQ)	Jackson Immunoresearch
HRP anti ratón IgG	oveja	1:50.000 (WB)	GE Healthcare
HRP anti conejo IgG	burro	1:5000 (WB)	GE Healthcare
HRP anti conejo IgG	cabra	1:2000 (WB)	Cell Signaling

1. Muestras de pacientes

Las muestras de tejido tumoral humano (**Tabla M2**) utilizado en este trabajo han sido cedidas por el servicio de Neurocirugía del Hospital 12 de Octubre. Todas ellas fueron diagnosticadas como gliomas por el servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital. En todos los casos el tejido se obtuvo después del consentimiento por escrito del paciente y con la aprobación de los Comités de Ética del Hospital 12 de Octubre (CEI 14/023). Para todas las muestras, una parte del tejido sobrante del diagnóstico se congeló en fresco a -80°C hasta su uso, para extracción de ARN o proteínas; y otra parte se conservó en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*, Lonza) a 4°C hasta su procesamiento inmediato en el Instituto de Salud Carlos III, procedimiento explicado en el apartado de Cultivos Celulares.

El análisis de las mutaciones y alteraciones genéticas de las muestras de pacientes se llevó a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de octubre utilizando un método de secuenciación de alto rendimiento o "next generation" en un panel de 30 genes que habitualmente se encuentran alterados en gliomas, usando el software específico *Ion AmpliSeq Designer* (Thermo Fisher Scientific).

2. Cultivos celulares

2.1. Establecimiento y mantenimiento de cultivos primarios de GB

2.1.1 Establecimiento de cultivos primarios a partir de las muestras tumorales

Excepto una de las líneas primarias de GB utilizadas en este trabajo, que fue cedida por la Dra. Rosella Galli del San Raffaele Scientific Institute de Milán (Italia), el resto de las líneas se generaron a partir de tumores extraídos del Hospital 12 de octubre (**Tabla M3**). Las muestras de GB fueron disgregadas mecánicamente con un bisturí en una placa de cultivo. A continuación, los pequeños trozos de tejido fueron colectados en un tubo estéril y centrifugados durante 5 minutos a 1000 rpm. Se aspiró el sobrenadante y el tejido fue disgregado enzimáticamente con 10 ml de Accumax (Millipore), durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se añadió medio DMEM y se centrifugó de nuevo. La suspensión celular obtenida fue filtrada a través de filtros estériles de 30 µm (Partec), que tan solo permitían el paso de las células individuales resultantes de la disgregación del tejido. Las células tumorales purificadas fueron sembradas en medio completo (MC): Neurobasal (Life Technologies), B27 (Life Technologies), Glutamax (Life Technologies) y Penicilina-Estreptomicina (Lonza), suplementado con 0,7 unidades/ml de heparina (Sigma-Aldrich), 40 ng/ml de EGF (Preprotech) y 20 ng/ml de bFGF (Preprotech) (MC-

SUP, medio completo suplementado) a una densidad de 50.000 células vivas/ml. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

2.1.2 Mantenimiento y expansión de los cultivos primarios

La tasa de proliferación de los cultivos primarios presenta cierta variabilidad, de manera que el intervalo temporal entre los pases celulares oscila entre los 7 y 14 días aproximadamente, tomando como referencia para el pase el tamaño de las esferas. Éstas se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en un volumen variable de la solución enzimática Accumax en función del tamaño del cultivo. Tras 3 min de incubación en dicha solución, se procedió a la disgregación mecánica de las esferas haciéndolas pasar a través de la punta de una micropipeta p200 de 15 a 20 veces.

Las células viables se contaron utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripano 0,1 % (p/v, en suero salino) para identificar las células muertas. Finalmente, las células fueron sembradas de nuevo en MC-SUP a una densidad de 50.000 células viables/ml para la expansión del cultivo.

2.1.3 Criopreservación y descongelación de los cultivos

Para la criopreservación de los cultivos de neuroesferas de GB se sembraron 750.000 células recién disgregadas en frascos de cultivo de 75 cm², y tras 72 h en cultivo (cuando las esferas eran de tamaño medio) se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron suavemente en el medio de congelación celular (Ibidi) para ser transferidas a criotubos. A continuación, los viales fueron ubicados en un recipiente con isopropanol (Mr. Froosty, Sigma) que se mantuvo a - 80 °C durante 24 h para permitir un descenso lento de la temperatura (de aproximadamente 1°C/min) hasta su congelación. Seguidamente, los criotubos se trasladaron a tanques de nitrógeno líquido (N₂) para su almacenaje durante largos periodos de tiempo.

La descongelación de las neuroesferas de GB se realizó de la forma más rápida posible. Para ello, se incubaron los criotubos, recién extraídos de los tanques de N₂, en un baño termostático a 37°C durante aproximadamente 1 min hasta su descongelación. A continuación, la suspensión celular recién descongelada fue transferida rápidamente a un tubo estéril con 5 ml de DMEM-BSA precalentado y se centrifugó 5 min a 1000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en MC-SUP y se sembró en un frasco de 25 cm².

2.2. Transducción de cultivos celulares con lentivirus

2.2.1 Vectores lentivirales y retrovirales

Los ensayos de sobre-expresión de Tau se llevaron a cabo mediante la utilización de un vector lentiviral cedido por el Prof. Kenneth S. Kosik (UC Santa Barbara, CA), que codifica la isoforma más larga de Tau wt en el cerebro humano, que alberga cuatro repeticiones y dos inserciones N-terminales, seguida de una secuencia IRES y el ADNc de la proteína GFP. Como control utilizamos un lentivector que codifica e-GFP (Addgene 12252).

La interferencia de *CD248* y *TAZ* se realizó mediante el uso de vectores lentivirales, *ARNsh CD248* (Sigma # SHCLMG-NM-020404) y *shTAZ* (TRCN00004466CC). La interferencia de *Tau* se realizó mediante la construcción de un lentivirus utilizando el vector PLKO.1, dónde se insertó la secuencia *ARNsh* específica para *Tau* utilizando las enzimas de restricción EcoR1 y AgeI. La presencia de un gen de resistencia a puomicina permitió la selección de aquellas células que hubiesen incorporado la construcción lentiviral de manera estable mediante la adición del antibiótico (1mg/ml) en el medio de cultivo.

En ocasiones se utilizó también pLV-Hygro-luciferasa (VectorBuilder # VB150916-10098) como gen reportero.

Los vectores retrovirales utilizados fueron pBabe-EGFR wt (#11011), MSCV-XZ066-GFP-EGFR VIII (#20737), pBabe-puro-flag-IDH1 (#62923) y pBabe-puro-flag-IDH1-R132H (#62923) (Addgene).

2.2.2 Mantenimiento y expansión de los cultivos de células empaquetadoras 293T

Las células 293T (ATCC) se crecieron adheridas al plástico y en un medio de cultivo compuesto por DMEM (Lonza), 10 % de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). El mantenimiento de los cultivos se realizó mediante el pase de los mismos unas dos veces por semana, evitando que alcanzaran el 100 % de confluencia. En el momento del pase celular, se realizó un lavado con PBS 1X (del inglés *phosphate buffered saline*) de la monocapa celular y se despegó del plástico mediante la incubación con tripsina 0,5 %/EDTA 0,2 % (del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*) durante 3 min a 37 °C. Posteriormente, se colectaron en un tubo al que se añadió 5 ml de medio de cultivo para inhibir la digestión enzimática. La suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 1.000 rpm y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron a la concentración deseada.

2.2.3 Transfección de células 293T para la producción de retrovirus y lentivirus

La generación de partículas retro y lentivirales se realizó mediante el uso de las células empaquetadoras 293T. Con esta finalidad, se sembraron 10^6 células viables en cada placa P100 y transcurridas 24h-48h se comprobó que habían alcanzado el 70 % de confluencia, estado óptimo para la transfección de las mismas. El medio de crecimiento de las células se reemplazó por medio fresco antes de realizar la transfección mediante fosfato cálcico. Para ello, se preparó en un tubo 1 ml de HBS 2X (del inglés *Hepes Buffered Saline*) (NaCl 281 mM, HEPES 100 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM a pH 7,2) y en otro, 1 ml de solución compuesta por CaCl_2 0,025 M, 10 μg de ADN plasmídico de interés, 7 μg del plásmido que codifica las proteínas de la cápside viral (*PM2.G Envelope*, Addgene #12259) y 13 μg del plásmido que codificaba las proteínas del "core" del virus (*psPAX2*, Addgene #22036). A continuación, se fue añadiendo dicha solución al HBS 2X gota a gota, dejándolo resbalar por la pared del tubo. Tras ser incubada durante 20 min a temperatura ambiente, se añadió la mezcla a las células 293T, gota a gota por toda la superficie de la placa de cultivo. Las placas se mantuvieron en el incubador y 4 h después de la transfección se reemplazó el medio de cultivo por 8 ml de MC-SUP fresco. Transcurridas 48 h se colectó el medio de cultivo y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm. El sobrenadante resultante se pasó a través de un filtro de 0,45 μM acoplado a una jeringa de 20 ml para eliminar la contaminación con células empaquetadoras y obtener una suspensión purificada de partículas víricas.

2.2.4 Transducción de los cultivos primarios de GB con retrovirus y lentivirus

Las esferas de GB en cultivo se disociaron y las células individuales resultantes se sembraron a una densidad de 50.000 células/ml. Transcurridas 24h desde la siembra, y habiendo alcanzado las esferas un tamaño adecuado para la transducción de las mismas, las células se resuspendieron directamente en el sobrenadante viral diluido a partes iguales con MC-SUP. A las 48 h, se reemplazó el medio que contenía las partículas virales por MC-SUP fresco. En el caso de la transducción con lentivirus, se añadió 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno al medio para incrementar la eficiencia de infección.

La selección de las células que habían sido transducidas por las partículas virales se realizó mediante la adición al medio de cultivo de 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ del antibiótico puromicina o 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antibiótico higromicina de manera que tan solo las células que hubiesen incorporado la construcción viral (portadora de la resistencia al antibiótico) de manera estable a su genoma fueran capaces de sobrevivir. La selección se mantuvo durante el tiempo en el que se realizaron dos pases de las neuroesferas (aproximadamente 2 semanas).

2.3. Modelos de glioma de ratón

2.3.1 Modelo SVZ

Para evaluar el impacto de EGFR en el GB, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo murino a partir de progenitores neurales derivados de la zona subventricular (SVZ) de ratones adultos C57BL/6 que presentaban en homocigosis la delección del locus *Ink4a/ARF* (ratones *p16/p19* ^{-/-}) cedidos por el Dr. Serrano (Serrano et al., 2007). Las células madre neurales (NSC) se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito detalladamente en el trabajo de (Ferron et al., 2007) y fueron cultivadas en MC-SUP. Las NSC fueron infectadas con las construcciones retrovirales que permiten la sobre-expresión de EGFR wt-GFP o EGFR vIII-GFP y seguidamente fueron inyectadas en el cerebro de ratones inmunodeficientes como se explica en el apartado de ensayos *in vivo*. Los tumores que crecieron fueron disociados y se estableció las dos líneas celulares murinas de glioma llamadas SVZ EGFR wt y SVZ EGFR vIII (**Figura M1**)

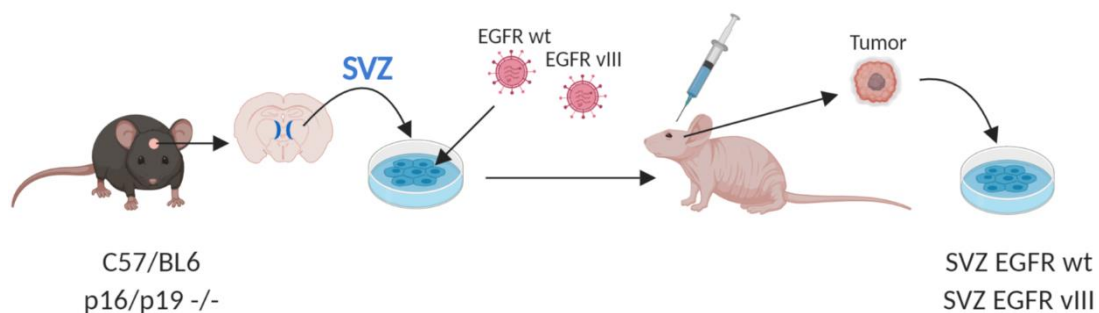


Figura M1. Esquema representativo del modelo de glioma murino SVZ EGFR wt y SVZ EGFR vIII desarrollado en el laboratorio.

2.3.2 Modelo NPA

Otro de los modelos murinos utilizados en este trabajo es el llamado NPA IDH1 wt y NPA IDH1 mutante (R132H), proporcionado por María G. Castro, de la Universidad de Medicina de Michigan. Este modelo fue generado de manera endógena en el ratón usando el sistema de transposón SB (del inglés *Sleeping Beauty transposón system*). Para ello se inyectó en los ratones un plásmido con la transposasa, SB transposasa-Luciferasa y los plásmidos con las secuencias de interés flanqueadas por secuencias que son reconocidas por la transposasa SB y así poder ser insertado en el ADN genómico del propio ratón. Los plásmidos utilizados fueron: *shp53*, *NRAS* y *shATRX*. A partir de los tumores desarrollados mediante este sistema se estableció la línea celular NPA caracterizada por la expresión de *NRAS* y por la pérdida de *p53* (*shP53*) y *ATRX* (*shATRX*). Finalmente, el cultivo de dicha línea fue infectada con las

construcciones lentivirales que permiten la sobre-expresión IDH1 wt o IDH mutante (R132H) (Núñez FJ et al., 2019), líneas celulares que utilizamos para nuestros alotrasplantes.

2.3.3 Modelo GL261

La línea celular GL261 fue obtenida de la ATCC. Las células se crecieron adheridas al plástico hasta su inyección en ratones inmunodeficientes en el medio de cultivo compuesto por DMEM, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM y 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina.

3. Análisis de expresión

3.1. Análisis de expresión génica por medición de ARN mensajero

3.1.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total a partir de muestras de cultivos celulares y de tejido tumoral (previamente conservados a - 80 °C) se realizó mediante el uso del kit comercial High Pure RNA Isolation (Roche). Durante el protocolo de extracción se efectuó un tratamiento con ADNasa (Qiagen) con la finalidad de eliminar el ADN genómico presente en el extracto obtenido. La cantidad de ARN total se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm (A260) en un espectrofotómetro (Infinite M200, TECAN).

3.1.2 Obtención de ADN complementario (ADNc)

1 µg de ARN total se retrotranscribió a ADNc en un volumen total de reacción de 20 µL, conteniendo 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de dNTPs 10 mM, 4 µL de First Strand Buffer 5x y 1 µL de enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Takara). Las muestras se incubaron a 42 °C durante 2 h. El ADNc resultante fue diluido 10 veces en agua libre de nucleasas y conservado a - 20 °C hasta su uso.

3.1.3 qRT-PCR

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*) se realizaron en placas de 96 pocillos (Roche) utilizando el aparato LightCycler 480. La reacción de qRT-PCR se realizó en un volumen total de 10 µl conteniendo 5 µL de la enzima SYBR Premix Ex Taq (Takara), 0,2 µl de la dilución 10 µM de los cebadores

específicos (**Tabla M4**), 2,6 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de ADNc previamente diluido. Las condiciones empleadas en todas las qRT-PCRs incluyen un paso inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C seguido de la fase de amplificación que consiste en 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a la temperatura de fusión de los cebadores (T_m , del inglés *melting temperatura*), la única variable modificada en función del gen de estudio, y 10 segundos a 72°C. Finalmente acaba con la fase de disociación que consiste en 15 segundos a 5 grados más de la temperatura de fusión y 30 segundos a 40°C. La expresión génica se cuantificó mediante el método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), utilizando los niveles de expresión de los genes *HPRT* o *Actina* como control interno de expresión para las muestras humanas o de ratón, respectivamente.

3.2. Análisis de la presencia de la mutación génica del gen EGFR por secuenciación

La extracción de ADN genómico a partir de muestras de cultivos celulares se realizó siguiendo las instrucciones del Kit GenElute Mammalian Genomic ADN (Sigma-Aldrich). La cantidad de ADNg presente en los extractos se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nM (A_{260}) antes de ser diluido a 5ng/ml y conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

Para determinar la mutación de EGFR en las líneas celulares, el ADNc de estas líneas fue secuenciado usando los pares de cebadores específicos de la **Tabla M5**. Finalmente la secuencias se alinearon y se agruparon con el transcrito de EGFR (NM_005228.4) de la base de datos NIH GenBank utilizando la herramienta de alineación de secuencias múltiples Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y el software de análisis de secuenciación v5.3.1 de Applied Biosystems. Las mutaciones identificadas se analizaron en cBioportal (www.cbioportal.org).

3.3. Análisis de expresión proteica por Western Blot (WB)

3.3.1 Preparación de muestras para la extracción proteica

Para la extracción de proteína a partir de cultivos celulares se colectó un volumen mínimo de cultivo de un frasco F25. Las células fueron centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 min, lavadas en PBS 1X (pH 7,4) frío y centrifugadas de nuevo para conservarlas a -20 °C hasta el momento de la extracción proteica.

Para la obtención de proteína a partir de tejido tumoral, se realizó la disección del mismo en hielo seco y los fragmentos de interés se conservaron a -80 °C hasta el momento de la extracción proteica.

3.3.2 Extracción y cuantificación de proteínas

Las muestras fueron lisadas utilizando un tampón de lisis (NaCl 150 mM, PB 20 mM, Tritón X-100 1 %, EDTA 5 mM y SDS 0,1 %) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche y PMSF 1 mM) y de fosfatasa (Na_3VO_4 1 mM y NaF 1 mM). Se añadió un volumen de 40 μL del tampón a cada pellet de células y un volumen que oscilaba entre 200 y 400 μL en el caso de las muestras de tejido. Para la resuspensión de las muestras, se empleó una micropipeta en el caso de las células, subiendo y bajando el volumen 30 veces. En el caso del tejido, se utilizó el émbolo de una jeringa de 2 ml para disgregar el tejido, empleando seguidamente la micropipeta para la resuspensión absoluta del mismo. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15-20 min para completar su lisado y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min y a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se conservó a - 20 °C hasta el momento de su uso.

La cuantificación de la cantidad de proteína total presente en los extractos de proteína se llevó a cabo mediante el método colorimétrico BCA de Pierce (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando diluciones seriadas de concentraciones conocidas de BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*) (Thermo) en un rango de 0 a 2 mg/ml como estándares para la cuantificación. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (TECAN Infinite M2000) a una longitud de onda de 562 nm (A562).

3.3.3 Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia proteica a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE utilizando el sistema OmniPAGE mini (Durviz). La composición del gel separador fue: Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), APS 0,025 % (p/v) y TEMED 0,126 % (v/v) y porcentajes de acrilamida variables en un rango de 7,5 % a 12 % (p/v), en función del peso molecular de las proteínas que se fueran a detectar. El gel concentrador estaba compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, acrilamida-bisacrilamida 4 % (p/v), SDS 0,08 % (p/v), persulfato amónico 0,08 % (p/v) y TEMED 0,2 % (v/v). En cada pocillo del gel de acrilamida se cargó una cantidad de proteína total equivalente que oscilaba entre 20 y 40 μg . Los extractos proteicos fueron diluidos en tampón RIPA (suplementado con inhibidores de proteinasas y fosfatasa) hasta alcanzar el mismo volumen en todas las muestras, al cual se añadió la cantidad adecuada de tampón de carga preparado al 5X (Tris-HCl 90 mM, glicerol 25 % (v/v), β -mercaptoetanol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,01 % (p/v)).

Una vez preparadas las muestras estas fueron hervidas durante 5 min a 95 °C en un termobloque para lograr la desnaturalización de las proteínas y posteriormente se cargaron en los geles de acrilamida. Se dejaron correr durante 15 min con un voltaje de 65 mV para la concentración de las muestras y, a continuación, se elevó el voltaje a 120 mV para la

separación de las mismas (se mantuvo la corriente hasta que el frente de azul de bromofenol hubiese abandonado el gel). El tampón de electroforesis empleado en dicho proceso se componía de glicina 2 M, Tris base 250 mM y SDS 0,1 % (p/v). Se utilizó un marcador de peso molecular (MW, del inglés *molecular weight*) pre-teñido que cubría el rango de 10 a 250 kDa (Thermo). Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Bioscience) en un tampón de transferencia compuesto por glicina 2 M, Tris base 250 mM y metanol 20 % (v/v), durante toda la noche (o/n, del inglés *over night*) con un voltaje constante de 30 mV a 4°C para evitar un incremento excesivo de temperatura del sistema de transferencia.

3.3.4 Inmunodetección proteica y revelado

Una vez finalizada la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con rojo de Ponceau (Ponceau 0,1 % (p/v), ácido acético 1 % (v/v)) para comprobar la correcta transferencia proteica a las mismas y la equivalencia de proteína total en los distintos carriles cargados. Las membranas se lavaron durante 10 min con tampón TBS (del inglés *tris-buffered saline*), compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,9 % (p/v) y suplementado con el detergente Tween-20 al 0,1 % (v/v) (TBS-T) para eliminar la tinción de rojo Ponceau, y se bloquearon con leche 5 % (p/v) en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación de balanceo. A continuación, se incubaron con los distintos anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C y en agitación de balanceo. Los anticuerpos primarios y diluciones empleados se hallan detallados en la **Tabla M6**. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 5 lavados de 5 min de las membranas con TBS-T para y se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (**Tabla M7**) diluidos e TBS-T, durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación de balanceo. Seguidamente, las membranas fueron lavadas con TBS-T cinco veces durante 5 min, a temperatura ambiente y en agitación para eliminar los restos del anticuerpo secundario. Las membranas se incubaron con el sustrato de quimioluminiscencia ECL (Pierce) y las proteínas se visibilizaron utilizando el generador de imágenes Amersham 680.

3.3.5 Cuantificación por densitometría

Las imágenes digitalizadas obtenidas por el equipo de revelado fueron utilizadas para la cuantificación de la intensidad de la señal mediante el programa informático Image J. La densidad de las bandas de las distintas proteínas analizadas se normalizó utilizando la densidad de las bandas de Actina o GAPDH.

4. Ensayos *in vivo*

4.1. Trasplante de células tumorales

Los trasplantes de células de glioma (tanto humanas como el modelo SVZ) se realizaron en ratones inmunodeprimidos Nude Foxn1^{nu} (Harlan Ibérica) de entre 2 y 3 meses de edad, tanto las células del modelo NPA como células GL261 se implantaron en ratones C57/BL6. Todos los procedimientos animales llevados a cabo en este trabajo de tesis fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de investigación y Bienestar Animal (CElyBA) de la institución, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) (PROEX 002/16), de acuerdo con las directrices nacionales y de la unión Europea.

4.1.1 Anestesia, analgesia y reversión de la anestesia

Los ratones fueron anestesiados con una solución compuesta por ketamina 10 % (v/v, Imalgene 1000, Merial Laboratorios) y xilacina 9,3 % (v/v, Xilagesic, Carier) en PBS 1X estéril. La dosis administrada por vía intraperitoneal fue de 200 μ L de solución anestésica por cada 25 g de peso del animal. Tras ser anestesiados, se les administró por vía subcutánea (100 μ L por cada 25 g de peso del animal) una solución analgésica compuesta por meloxicam 10 % (v/v, Metacam, Boheringer-Ingelheim) en PBS 1X estéril. Tras la cirugía, se les inyectó intraperitoneal (100 μ l por cada 25 g de peso del animal) una solución compuesta por un antagonista alfa-2 adrenérgico al 7,7 % (v/v, Antisedan, Esteve) en PBS 1X estéril. Los animales se mantuvieron en una manta termorreguladora (Cibertec) a 37°C hasta que recuperaron la consciencia, momento en el que fueron estabulados de nuevo.

4.1.2 Trasplantes subcutáneos. Ensayo de dilución límite

Las esferas de gliomas crecidas en cultivo fueron disgregadas siguiendo el protocolo de pase celular descrito previamente y se determinó el número de células viables utilizando azul de tripano. Diferentes cantidades de células (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3) fueron inyectadas en cada uno de los flancos de ratones inmunodeprimidos. Las células fueron resuspendidas en MC-SUP al que se añadió matrigel (1:10) y se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la inyección. Los animales fueron anestesiados, tal y como se ha descrito con anterioridad, y se les inyectó la suspensión celular en el espacio subcutáneo utilizando jeringas de 1 ml. Después de la inoculación, se mantuvo la aguja en el lugar de la inyección durante 10 s antes de ser retirada, evitando el reflujo de la suspensión celular para garantizar la inyección. Tras la reversión de la anestesia, se observó que todos los animales se habían recuperado adecuadamente antes de ser estabulados de nuevo. Los animales fueron observados de

manera periódica para detectar la aparición de tumores en los flancos que fueran macroscópicamente visibles. Los animales se sacrificaron antes de que los tumores alcanzaran un diámetro de 1,5 cm. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el software "Extreme Limiting Dilution Analysis".

4.1.3 Trasplantes intracraneales

Las esferas de los cultivos de gliomas fueron disgregadas, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y resuspendidas en MC-SUP a una densidad de 100.000 células/ μ l. Se inyectó un volumen total de 2 μ L de dicha suspensión celular (200.000 células) en el estriado de cada animal, por tratarse de la región más quiescente del cerebro adulto. Las cirugías se realizaron con ayuda de un aparato estereotáctico (MyNeurolab, Benchmark) en el que se colocaron los animales tras ser anestesiados. Una vez inmovilizados, se procedió a la apertura de una incisión en la piel del cráneo de aproximadamente 1,5 cm en dirección rostro-caudal, se limpió la herida con ayuda de un bastoncillo de algodón y se humedeció la misma con NaCl 0,9 % (p/v) estéril. A continuación, se fijaron las coordenadas para la inyección intracraneal de la suspensión celular (2 mm medial-lateral y -0,5 mm rostral, tomando Bregma como referencia) y se perforó el cráneo con ayuda de un taladro (Grobet) para permitir la entrada de la jeringa Hamilton de 2 μ l de capacidad. Las células se inyectaron a una profundidad de 3 mm ventral desde la superficie de la corteza y se esperó un minuto antes de comenzar a retirar la aguja. Esta se retiró de mm en mm, esperando un minuto de reposo previo a cada elevación para evitar el reflujo de la suspensión celular inyectada. Una vez retirada la jeringa, se procedió al sellado de la piel del cráneo empleando el pegamento tisular Histoacryl (B-Braun). Tras la reversión de la anestesia y la comprobación de que habían recuperado la consciencia y la movilidad, los animales fueron estabulados de nuevo y observados periódicamente para la detección de los síntomas característicos del desarrollo de la enfermedad: pérdida de peso, ataxia, lordosis y alteraciones motrices.

Cuando la línea celular había sido infectada con luciferasa previamente, el control del crecimiento del tumor fue posible gracias a la detección de la señal bioluminiscente con el equipo IVIS (Perkin Elmer) tras la inyección intraperitoneal de D-luciferina (75mg/kg).

4.2. Tratamientos farmacológicos

4.2.1. Tratamiento con Sunitinib

El inhibidor Sunitinib (Selleckchem, S1042) se disolvió en 4% DMSO con 10% de polisorbato a una concentración de 15mg/ml y se conservó a 4°C y protegido de la luz durante su uso. Para su preparación, se atemperó la suspensión a 37°C y se incubó en un baño de ultrasonidos

hasta su completa disolución. La administración de sunitinib a los ratones se realizó de manera intraperitoneal mediante el uso de jeringas de 1ml. La dosis que se administró diariamente fue de 6 mg por Kg de animal, siguiendo una pauta de tratamiento de 5 días consecutivos seguidos por dos días de descanso. A los animales control se les administro la dosis correspondiente a su peso del solvente (4 % DMSO con 10% de polisorbato).

4.2.2 Tratamiento con Epothilone D

El inhibidor Epothilone D (Abcam, ab143616) se disolvió en 4% DMSO con 10% de polisorbato a una concentración de 0,25 mg/ml y se conservó a 4°C y protegido de la luz durante su uso. Para su preparación, se atemperó la suspensión a 37°C y agitó con ayuda de un vortex hasta que los precipitados desaparecieron. La administración de Epothilone D a los ratones se realizó de manera intraperitoneal mediante el uso de jeringas de 1ml. La dosis que se administró diariamente fue de 1 mg por Kg de animal, siguiendo una pauta de tratamiento de 2 días por semana. A los animales control se les administro la dosis correspondiente a su peso del solvente (4 % DMSO con 10% de polisorbato).

4.3. Determinación de la integridad de la Barrera Hematoencefálica (BBB)

Uno de los métodos utilizados para determinar la integridad de la BBB es la inyección con Evans Blue, un tinte con una afinidad muy alta a la albumina sérica. Debido a que la albumina no puede cruzar la barrera, el cerebro permanece sin teñir. Sin embargo, cuando se ha comprometido la barrera el tinte unido a la albumina entra en el SNC y observamos tinción en el parénquima cerebral. Para este análisis el Evans Blue fue inyectado por vía intravenosa en la vena de la cola de los ratones a una concentración de 2ml/Kg en PB. Después de 30 minutos los ratones se anestesiaron con isoflurano y fueron perfundidos intracardiamente con 20 ml de solución salina (0,9 % NaCl) para eliminar la sangre de la circulación sanguínea del animal y con 40 ml de PFA 4 %, haciendo pasar las soluciones lentamente para permitir la correcta fijación de los tejidos. Seguidamente, se procedió a la extracción y observación del cerebro del animal.

4.4. Obtención de imágenes mediante Resonancia magnética nuclear (MRI) en ratones

Las imágenes de resonancia magnética fueron adquiridas en el equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker) de 4.7 Teslas del CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid, equipado con un sistema de gradientes de 6 cm de diámetro interior capaz de alcanzar un gradiente máximo de 450 mT/m.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de oxígeno e isoflurano al 2% (p/p) y se les inyectó intraperitonealmente 0,1 ml de gadolinio (Gd) (Dotarem, Guerbet) como contraste para la MR. A continuación, fueron colocados en el interior de una sonda de volumen de radiofrecuencia de 3,5 cm de diámetro interior (Bruker, Alemania). En primer lugar, se realizaron imágenes de localización con orientaciones axial y sagital. Para ello se empleó una secuencia de eco de espín rápido con un tiempo de repetición (TR) de 2,1 s y un tiempo de eco (TE) efectivo de 62 ms. El *field of view* (FOV) fue de 3,0 x 3,0 cm² y la anchura de los cortes de 2,0 mm. El tamaño de la matriz adquirida fue de 256 x 128, por lo que el tiempo total de adquisición de cada experimento fue de 33 s. Los datos adquiridos fueron reconstruidos mediante un llenado con ceros (*zero filling*) en la dirección de la fase para dar imágenes de 256 x 256 píxeles. Posteriormente, se adquirió una serie de imágenes coronales empleando una secuencia de eco de espín potenciada en T1 para la visualización y cuantificación del tumor. Los parámetros de estas imágenes fueron: TR/TE = 505/10 ms; FOV = 2,56 x 2,56 cm²; anchura del corte = 1,0 mm; Número de promedios = 4. La matriz adquirida fue de 256 x 192 puntos. Mediante el llenado con ceros en la dirección de la fase se reconstruyeron imágenes de 256 x 256 píxeles.

Las imágenes obtenidas de pre-gadolinio y post-gadolinio a 10,25,45,65,90 y 115 minutos fueron analizadas con el software Image J. La señal de intensidad se midió en diferentes regiones de interés: región tumoral (IT), región contralateral (IC) y un área fuera del ratón (Inoise). La relación señal/Ruido (SNR) de la región del tumor se midió para cada corte y punto temporal y se define por $SNR(t) = IT/Inoise$ y para la región contralateral $SNR(c) = IC/Inoise$. La relación de aumento normalizada (%NER) de la región tumoral respecto a la región contralateral es calculada por la siguiente ecuación; $\%NER_t = \left[\frac{(SNR_t/SNR_c)_{post} - (SNR_t/SNR_c)_{pre}}{(SNR_t/SNR_c)_{pre}} \right] \times 100$

4.5. Cell Sorting

Los tumores murinos SVZ EGFR wt-GFP y SVZ EGFR VIII-GFP fueron extraídos quirúrgicamente del cerebro del animal y el tejido fue dissociado enzimáticamente a temperatura ambiente con Accumax durante 30 minutos. Posteriormente las muestras se filtraron con filtros de 70 μm y se recogieron en PBS con BSA al 2% para ser pasadas por el Citometro FACS BD. Los eventos fueron pre-seleccionados en base a su tamaño y complejidad (Parámetros FSC y SSC, respectivamente) con el fin de excluir restos celulares u otras partículas contaminantes, además de usar el yoduro de propidio para descartar las células muertas. Las células tumorales se aislaron con el Clasificador de células BD FACS mediante la expresión interna de GFP. Las células se recogieron en 2 ml de medio y se recuperaron mediante centrifugación para el análisis posterior por qRT-PCR.

4.6. Procesamiento histológico del tejido

4.6.1 Procesado del tejido con microtomo

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Posteriormente se procedió a la extracción del cerebro del animal y a su fijación en PFA 4 % a temperatura ambiente durante 4 horas y en agitación. Transcurrido dicho periodo, el tejido fue lavado dos veces con PB 0,1 M para eliminar los restos de solución fijadora y sumergido en etanol hasta su inclusión en parafina. A algunos animales se les inyectó BrdU (50mg/Kg) en suero salino 2 horas antes de ser sacrificados.

Para la inclusión del tejido en parafina se usó el procesador Leica TP1020 (Leica Microsystems). A continuación, se realizaron cortes de 5 μ M del tejido en un microtomo Leica RM2135 (Leica Microsystems) que fueron recogidos en portaobjetos gelatinizados.

4.6.2 Técnica de inmunofluorescencia (IF)

Los cortes se calentaron a 60°C durante 30 minutos para su desparafinación y su rehidratación se realizó incubando los cortes en xileno, etanol 100%, etanol 96%, etanol 70% y agua de manera secuencial durante 10 minutos cada solución. La tinción comenzó con la recuperación del antígeno en citrato sódico 10 mM pH6 caliente, seguido de la permeabilización durante 30 minutos en PBS con 1% de Tritón X-100 (Sigma). A continuación se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo compuesta por BSA al 5 %, FBS al 10% y Tritón X-100 al 0,1 % en PB 0,1 M durante 1 h a temperatura ambiente y seguidamente se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla M6**) diluido en solución de bloqueo o/n a 4 °C, cubriendo los cortes del tejido con Parafilm en una cámara húmeda para evitar que se sequen. Para la detección del BrdU los cortes tuvieron que ser pre-incubados con HCL 2N durante 15 minutos seguido de 10 minutos de incubación de borato sódico 0,1M a pH 8,5. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 5 min con PB 0,1 M de los cortes y se incubaron las muestras con el correspondiente anticuerpo secundario (**Tabla M7**), diluido en solución de bloqueo en oscuridad durante 1 h y a temperatura ambiente. Finalmente, en el caso de IF se procedió a la tinción nuclear con una solución de DAPI a 2 μ g/ml en PB 0,1 M, durante 5 minutos en oscuridad. Tras un último lavado de los cortes con PB 0,1 M, se procedió al montaje de los mismos con el medio Fluoromount-G (Southern Biotech) y los cubreobjetos de vidrio de 24 x 60 mm (Lan Optics). Las muestras se mantuvieron durante 12 h a temperatura ambiente y preservadas de la luz, antes de conservarlas a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su observación al microscopio. La captura de imágenes de las muestras teñidas fue realizada con el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 AOBS y las imágenes se analizaron con ayuda de los programas Leica AF Lite, ImageJ y a Adobe Photoshop.

4.6.3 Técnicas de inmunohistoquímica (IHQ)

El procedimiento que se siguió para esta técnica fue similar al descrito en el apartado anterior (Técnica de IF) excepto en dos puntos que describiremos a continuación. El proceso comenzó con la desparafinación de la muestra y la recuperación antigénica. El siguiente paso, exclusivo para esta técnica, consistió en el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena mediante la incubación de las muestras en una disolución con agua oxigenada al 1% durante media hora. Posteriormente se bloquearon las uniones inespecíficas con la solución bloqueo y se incubaron la muestra con los diferentes anticuerpos primarios (**Tabla M6**) o/n a 4°C. Seguidamente se realizan tres lavados y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1h (**Tabla M7**), que para esta técnica consiste en un anticuerpo conjugado a la peroxidasa. A continuación, el proceso se completó con el revelado de la reacción, utilizando como sustrato de la enzima el cromógeno tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DBA), de manera que se visualiza un precipitado marrón de forma específica en el tejido donde se encuentra el anticuerpo primario. Finalmente, las muestras se contra-tiñeron con hematoxilina, se deshidrató el tejido con etanol a concentraciones crecientes y se procedió al montaje de los mismos con el medio DPX (Merk) y los cubreobjetos.

5. Análisis Bioinformático

5.1. Herramientas utilizadas

Portales utilizados: "UCSC Xena-Browser" (<https://xenabrowser.net>), "Gliovis" (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es>) y "cBioPortal" (<http://www.cbioportal.org>)

Bases de datos utilizadas: TCGA (The cancer Genome Atlas), en la cual pudimos escoger diferentes cohortes según el tipo de análisis, pacientes exclusivamente con GB (cohorte TCGA-GB), con gliomas de menor grado (TCGA-LGG) o pacientes tanto con gliomas de bajo y alto grado (TCGA-LGG+GB). Otras de las bases de datos utilizadas fueron las de Rembrandt, Gravendeel, Ducray, Freije y Nutt.

5.2. Análisis de supervivencia

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se obtuvieron del portal "UCSC Xena-Browser" y del "Gliovis", dónde se puede analizar en una amplia colección de muestras de pacientes con tumores cerebrales la expresión de distintos genes y su correlación con la supervivencia. En nuestro caso analizamos la correlación entre los niveles de expresión de un determinado gen y la supervivencia de los pacientes estratificándolos en dos grupos según la alta o baja

expresión de dicho gen. Para la división de los grupos se utilizó la mediana y el análisis estadístico se calculó mediante la prueba de Log-Rank usando el programa GraphPad Prism 6.

5.3. Análisis de expresión génica

Los datos de la expresión de un determinado gen en función de otra variable como el grado histológico, la progresión de la patología o la expresión de otro gen, se obtuvieron del portal "UCSC Xena-Browser", donde se puede seleccionar el número de variables genómicas o fenotípicas que se desean para cada estudio. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

Una de las variables utilizadas para este tipo de estudio fue el subtipo tumoral, para el cual previamente se tuvo que obtener del conjunto de datos del TCGA-GB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120142>) la clasificación de los pacientes con GB en los diferentes subtipos (Clásico, mesenquimal, neural y proneural).

5.4. Análisis de correlación de la expresión génica

Para los estudios de correlación de expresión entre dos genes se utilizaron los portales "UCSC Xena-Browser" o el "Gliovis" y el análisis de Pearson para su análisis estadístico.

5.5. Análisis de correlación de las variaciones genéticas

Para los estudios de la presencia y la distribución de las diferentes alteraciones génicas en distintos genes simultáneamente se utilizó el portal "cBioPortal", el cual permite visualizar mediante distintas representaciones (Histograma, "Volcano plot") si la distribución entre las alteraciones de tus genes de interés es mutuamente excluyentes o co-ocurrentes. En este tipo de estudios se visualizaron diferentes alteraciones génicas como la variación en el número de copias, las ganancias de función y las mutaciones. El análisis estadístico de este tipo de análisis se realiza mediante el \log_{10} p valor.

5.6. Análisis de funcionalidad

Los estudios de funcionalidad se realizan gracias al programa "David Gene ontology", el cual te permite asociar la expresión de un conjunto de genes con los procesos biológicos en

los que se encuentra involucrado. Para ello en primer lugar seleccionamos el conjunto de genes co-expresados con nuestro gen de interés utilizando la base de datos del TCGA - LGG+GBM en el cBioportal.

5.7. Análisis de metilación del gen *MAPT* y de la unión de CTCF por Chip-seq

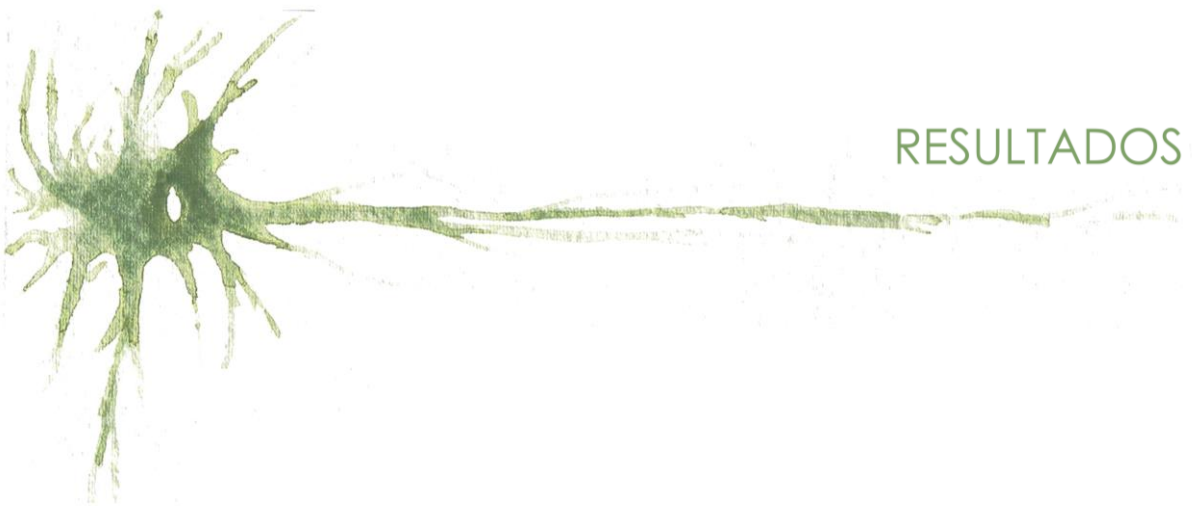
En primer lugar, analizamos la presencia de "islas CpG" en la región del promotor de Tau/*MAPT* mediante "UCSC Xena-Browser", en el que se identificaron tres islas: CpG302, CpG26 y CpG21. El análisis de metilación del locus *MAPT* se realizó utilizando los datos de la plataforma Illumina Infinium HumanMethylation450 del "UCSC Xena-Browser", y los valores de expresión de *MAPT* junto a los valores de metilación de 56 sondas comprendidas en las islas CpG previamente identificadas se obtuvieron de "UCSC Xena-Browser". Con estos valores en primer lugar se agruparon las muestras en dos grupos en función del estatus de IDH (IDH mutante y IDH wt) , y posteriormente se realizó un estudio de correlación de Pearson entre el valor de cada sonda de metilación y el valor de expresión génica de *MAPT*.

El análisis de ChIP-seq con el anticuerpo anti-CTCF se realizó en muestras de pacientes con gliomas IDH mutantes y pacientes con glioma IDH de tipo salvaje, además de utilizar muestras de cultivos (GSE70991). Se descargaron y visualizaron los archivos "tdf" del repositorio GEO utilizando el navegador IGV y con ello se analizó la presencia de CTCF en las islas CpG del gen *MAPT*.

6. Análisis estadístico

Para los gráficos de barra, los datos aparecen representados con la media y el error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*) y su nivel de significancia se determinó mediante la prueba t de Student de dos colas sin par. Las diferencias de expresión entre grupos experimentales se evaluaron mediante la prueba t pareada y el ANOVA de una vía. Para las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, se aplicó la prueba Log-Rank de dos colas. Para el análisis de correlación entre genes, los datos de expresión se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de correlación Spearman.

Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism 5 y en todos ellos se ha considerado como significativo un valor de $p < 0,05$. Las probabilidades se han representado como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. n.s.: no significativo.



RESULTADOS

1. Análisis de la expresión de Tau en gliomas

1.1. Los gliomas de menor grado presentan mayor expresión de Tau que los GB

Para comenzar el estudio de la posible implicación de Tau en el desarrollo de los gliomas, analizamos su expresión en un set de muestras derivadas de pacientes diagnosticados con glioma, tanto LGG como GB, procedentes del Hospital 12 de Octubre de Madrid. El análisis de la expresión de Tau a nivel proteico fue realizado mediante WB con extractos de tejido tumoral y usando como control positivo tejido sano de cerebro humano (NT). En este estudio encontramos una alta expresión de Tau en un gran número de muestras (**Figura 1A**), a niveles similares a los del tejido no tumoral. Para confirmar que la expresión de Tau observada era específica de células tumorales y no de neuronas que pudieran estar presentes en el tumor, realizamos una tinción de IHQ en cortes histológicos de dichas muestras, usando un anticuerpo específico frente a Tau. En dicha tinción observamos en los tumores un patrón de expresión muy diferente al del tejido normal, ya que Tau se localiza claramente en el citoplasma de las células tumorales (**Figura 1C**). La cuantificación de Tau tanto a nivel de IHQ (usando un baremo de expresión del 0 al 3) (**Figura 1D**), como a nivel de WB (**Figura 1B**), reveló que la expresión de dicha proteína está enriquecida en los LGG en comparación con los GB.

Resultados similares fueron encontrados al hacer un análisis *in silico* con datos de pacientes con gliomas de bajo y alto grado incluidos en la base de datos del TCGA (cohorte TCGA LGG+GB) (**Figura 1E**). Por otro lado, cuando evaluamos la expresión de *Tau/MAPT* en las muestras de pacientes del TCGA agrupados según la clasificación histopatológica convencional de la OMS, observamos que a medida que aumenta la agresividad de los astrocitomas (AII, AIII y GB) disminuyen los niveles de *Tau/MAPT*, mientras que los niveles son similares en los oligodendrogliomas (OII y OIII) (**Figura 1F**).

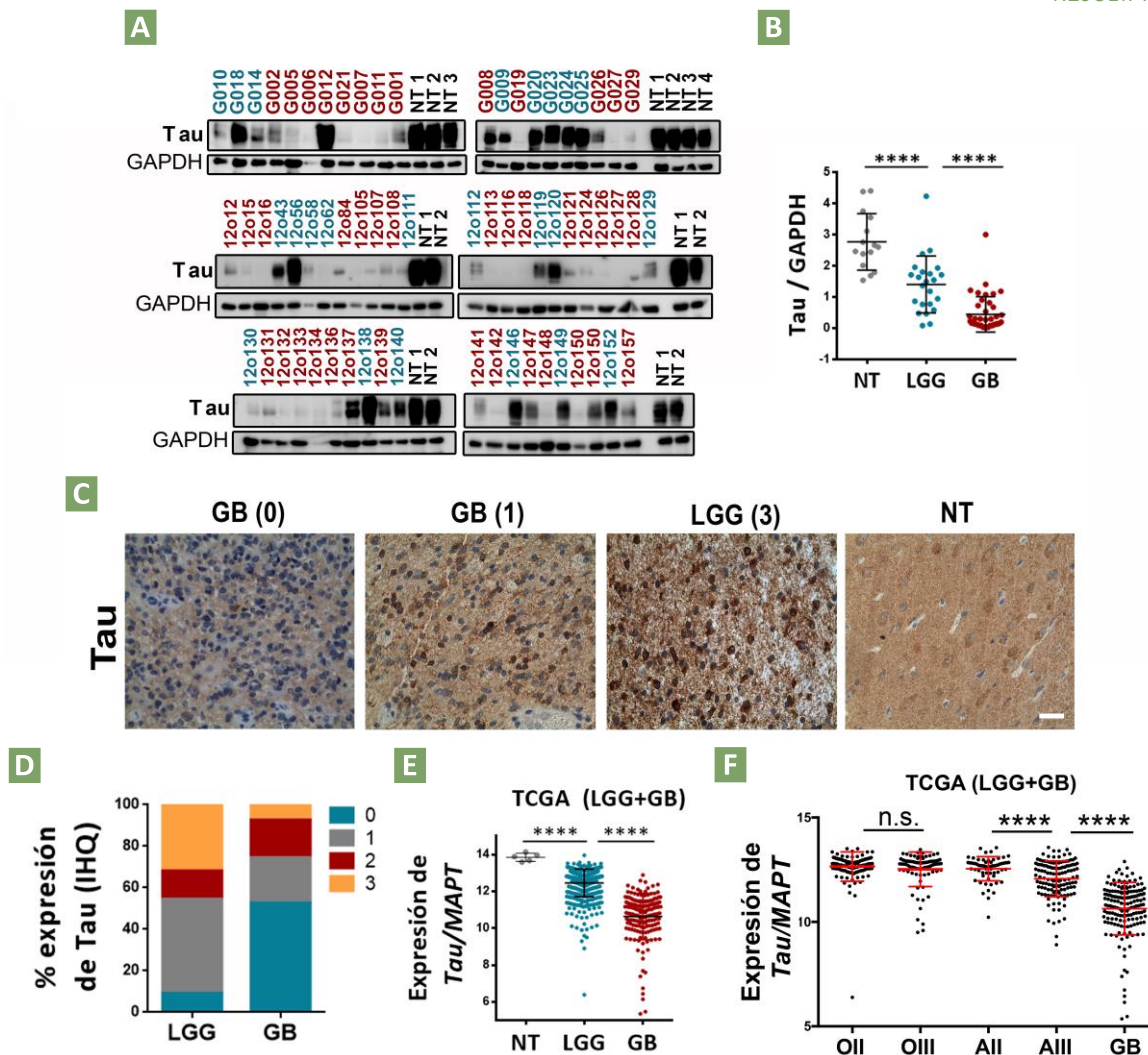


Figura 1. La expresión de Tau es mayor en los gliomas de menor grado que en los GB. (A) Análisis por WB de la expresión de Tau en muestras de tejido de pacientes diagnosticados con glioma. LGG representados en azul, GB en rojo y tejido normal como NT. (B) Cuantificación del WB (A) en función del tipo histológico. GAPDH se usó como control. (C) Imágenes representativas de la IHQ de Tau en muestras de pacientes con diferentes niveles de expresión (Baremo de expresión utilizado del 0 al 4). Barra de escala: 25µm. (D) Porcentaje de tumores con diferentes niveles de expresión de Tau (baremo 0-3) analizado mediante IHQ. Gliomas estratificados en LGG (n=22) y GB (n=55). (E,F) Análisis de los niveles transcripcionales (mARN) de *Tau/MAPT* en pacientes con glioma clasificados como LGG o GB (E) o en función de la clasificación histopatológica de la OMS (F). Datos del TCGA-LGG+GB RNA-seq (n=692). **** p< 0,0001. n.s.: no significativo.

1.2. Correlación entre la expresión de Tau y la progresión de la patología

Usando los datos del TCGA observamos que una mayor expresión de *Tau/MAPT* en los tumores se asocia con un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes, ya sea de LGG o de GB (Figura 2A y 2B). Estos datos fueron corroborados en otras cuatro cohortes de gliomas (datos no mostrados), además de en nuestra propia cohorte de muestras de GB, en los que los niveles de *Tau/MAPT* fueron medidos mediante qRT-PCR (Figura 2C).

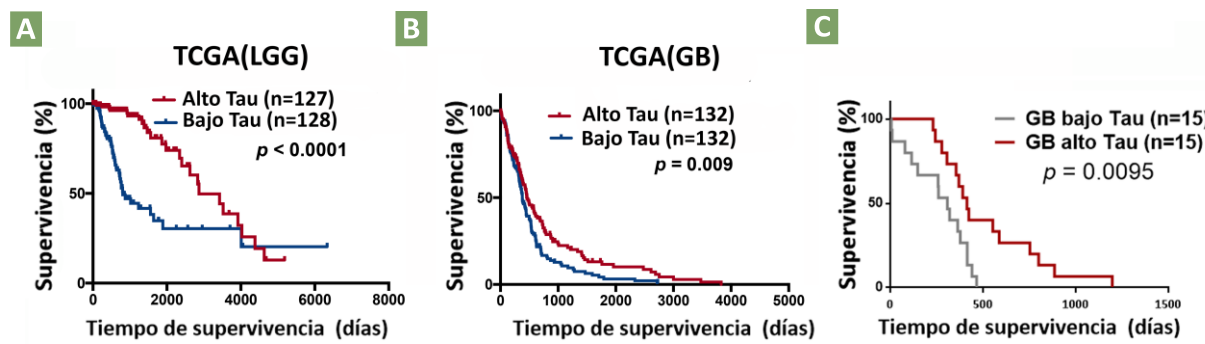


Figura 2. Los niveles de expresión de *Tau* correlacionan con un aumento en la supervivencia de los pacientes. (A,B) Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes con LGG (A) y pacientes con GB (B). Datos del TCGA estratificados en dos grupos según la expresión de *Tau/MAPT*. Cohorte TCGA LGG-RNA seq (n=255) (A) y Cohorte TCGA-GBM RNA seq (n=264) (B). **(C)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes con GB de nuestra propia cohorte (n=30). Pacientes estratificados en dos grupos en función de la expresión de *Tau/MAPT* (medida por qRT-PCR).

Asimismo, realizamos un análisis de la expresión de *Tau* en función de la progresión de la patología comparando tumores primarios con recidivas, tanto con los datos de pacientes del TCGA (**Figura 3A**) como en nuestra propia cohorte (**Figura 3B**). En ambos análisis detectamos una disminución de la expresión de *Tau* en los tumores recurrentes en comparación con los tumores primarios.

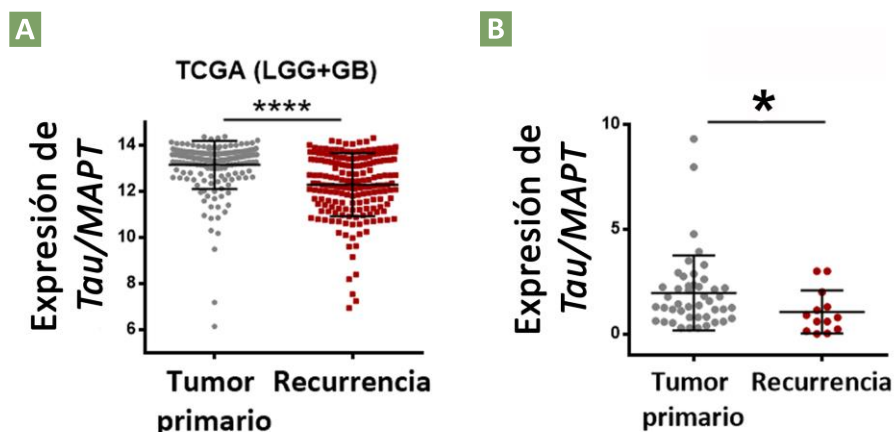


Figura 3. Los niveles de expresión de *Tau* correlacionan con la evolución de la patología. (A,B) Análisis de los niveles transcripcionales (mARN) de *Tau/MAPT* en pacientes con glioma en función de la progresión de la patología comparando tumor primario con tumor recurrente, tanto con los datos del TCGA- LGG+GBM RNA-Seq (n=692) (A) como en pacientes de nuestra propia cohorte (n=58) (medido por qRT-PCR) (B). *HPRT* fue usado para la normalización de la expresión. * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$.

Para evaluar más detalladamente la participación de Tau en la agresividad del glioma, medimos su expresión en un panel de xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs, del inglés *patient derived xenograft*) utilizando cebadores específicos de genes humanos (**Figura 4A**). Como esperábamos, la expresión de *Tau/MAPT* es variable en las distintas muestras. La posterior selección de tres de estas líneas celulares con diferentes niveles de expresión y su inyección en el cerebro de ratones inmunodeficientes, mostró la correlación directa entre la expresión de *Tau/MAPT* y el incremento en la supervivencia (**Figura 4B**), tal y como hemos ido describiendo anteriormente. El análisis de los cortes histológicos de dichas muestras, usando anticuerpos específicos frente a Tau y GFAP, confirmó la expresión mayoritaria de Tau en las células tumorales (**Figura 4C**), sin descartar que pueda estar presente también en neuronas que puedan haber quedado atrapadas en el tumor. Finalmente, para corroborar el papel de Tau en la progresión tumoral, inhibimos su expresión en una línea de PDX humana enriquecida en Tau (12o02), usando una secuencia de ARNsh, e inyectamos las células interferidas en el cerebro de ratones inmunodeficientes. Así observamos un aumento en la agresividad de los tumores tras la eliminación de Tau (**Figura 4D**).

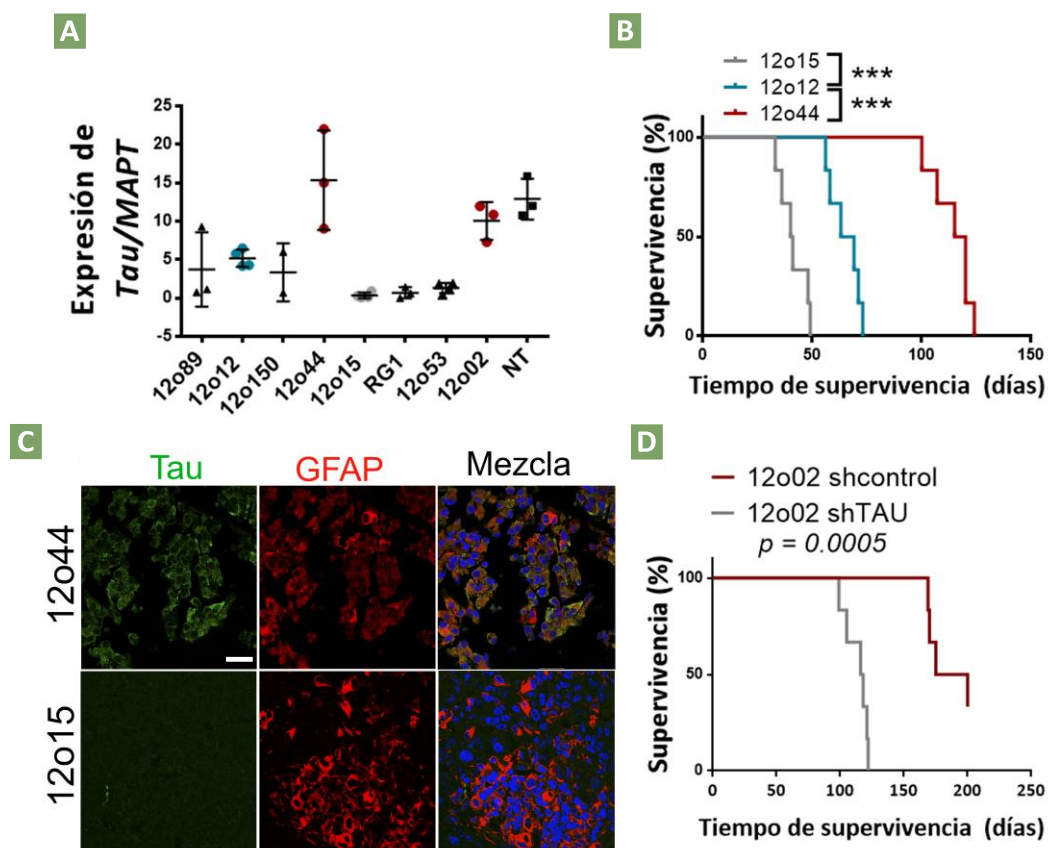


Figura 4. La expresión de Tau en gliomas es específica de las células tumorales y correlaciona con un comportamiento menos agresivo de estos tumores. (A) Análisis de los niveles transcripcionales (mARN) de *Tau/MAPT* medido por qRT-PCR de diferentes PDXs, implantados en el flanco de ratones inmunodeficientes, y de tejido normal (NT) de pacientes como control. *HPRT* fue usado para la normalización de la expresión. **(B)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les inyectó tres PDXs con diferente expresión de Tau (n=6/condición). **(C)** Imágenes representativas de IF de la co-tinción de Tau y GFAP en cortes de tumores del experimento B. Barra de escala: 25 μ m **(D)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les inyectó la línea celular 12o02 infectadas previamente con el ARNsh contra Tau (shTau) o un ARNsh control (shcontrol) (n=6/condición). *** p< 0,001.

En conjunto los datos de este apartado confirman la expresión específica de Tau en las células tumorales y la correlación entre sus niveles y una menor agresividad de los gliomas. Esto nos permite sugerir que la cuantificación de Tau podría tener un valor pronóstico para esta patología y que la pérdida de esta proteína podría asociarse con la reaparición del tumor, lo que está altamente relacionado con la mortalidad de los gliomas.

2. Relación entre la expresión de Tau y las mutaciones en IDH

2.1. Distribución de las principales alteraciones genéticas de los gliomas en relación a la expresión de Tau

Para estudiar el papel de Tau en los gliomas comenzamos analizando *in silico*, sobre los datos del TCGA, los cambios genéticos más importantes asociados a la patología en relación a los niveles de Tau. En este análisis encontramos que una alta expresión de Tau está presente en tumores con mutaciones en *IDH1* y *ATRX*, y por el contrario, una baja expresión de Tau se asocia a tumores con mutaciones en *EGFR* y *PTEN* (**Figura 5A**). Esta correlación fue validada analizando la distribución de las mutaciones somáticas en tumores con alta expresión de Tau, confirmándose que la asociación más significativa es con *IDH1* mutante (*IDH1 mut*), tal y como se observa en el gráfico de Volcano (**Figura 5B**). Seguidamente confirmamos esta correlación en nuestra cohorte de pacientes utilizando las tinciones de Tau por IHQ (Figura 1C). En este caso dividimos los pacientes en dos grupos según la presencia o ausencia de la mutación en *IDH1*, y cuantificamos los niveles de Tau con el mismo sistema de gradación (del 0 a 3), observándose un claro enriquecimiento de la expresión de dicha proteína en los gliomas *IDH1 mut* (**Figura 5C**).

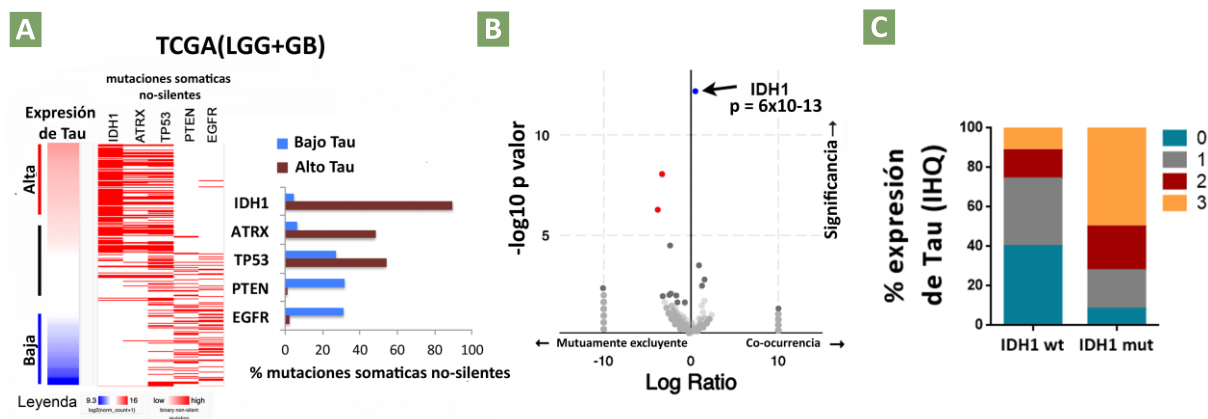


Figura 5 La expresión de Tau se asocia con las mutaciones en IDH1/2. (A) Análisis de las mutaciones somáticas comúnmente presentes en los gliomas, agrupadas en base a la expresión de *Tau*. Datos del TCGA (cohorte LGG+GBM n=461 PANCAN AWG). **(B)** Representación mediante un “Volcano plot” de la distribución de las mutaciones somáticas en gliomas con alta expresión de *Tau*, en comparación con gliomas con baja expresión. La flecha indica la mutación que correlaciona de manera más significativa con la alta expresión de *Tau*. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM). **(C)** Porcentaje de tumores con diferente baremo de expresión de Tau (baremo 0-3) analizado mediante IHQ, comparando los gliomas *IDH1 wt* (n=35) con los gliomas *IDH1 mut* (n=36)

Por otro lado, el análisis mediante IF en una selección de muestras de pacientes *IDH mut*, mostró como la mayoría de las células tumorales que se tiñen con el anticuerpo que reconoce de manera específica la forma mutada de IDH1 expresan Tau (**Figura 6A y 6B**). Esta observación confirma la fuerte correlación entre IDH mut y la expresión de Tau, además de corroborar la expresión específica de dicha proteína en las células del glioma.

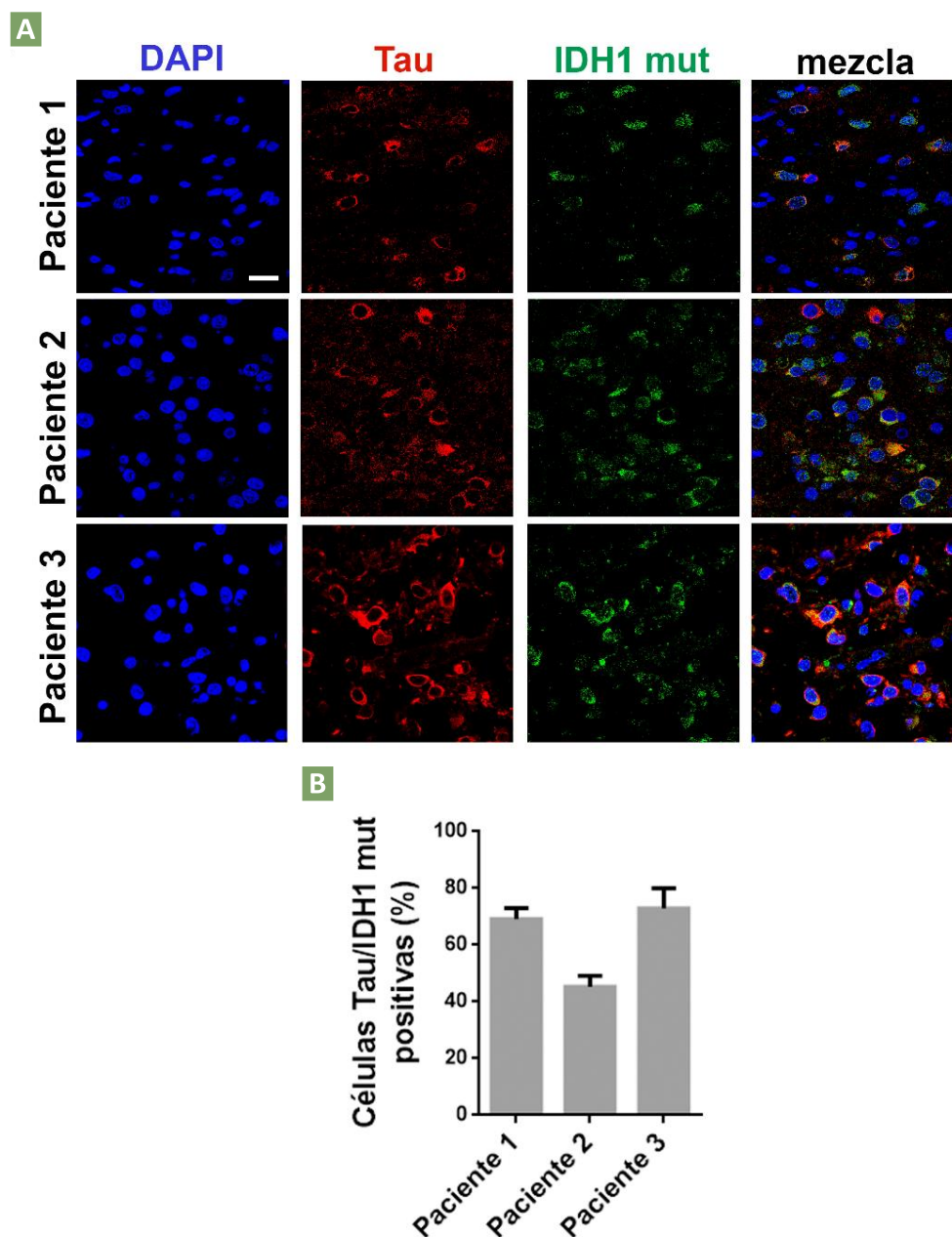


Figura 6. Co-expresión de IDH mutante y Tau en muestras de pacientes con glioma. (A) Imágenes representativas de IF de la co-tinción de Tau e IDH1 mutante en cortes de tumores de pacientes con presencia de la mutación. Barra de escala: 25 μ m **(B)** Cuantificación del número de células teñidas para Tau sobre el número de células positivas para IDH1 mutante en cada uno de los pacientes de la Figura A.

Esta correlación entre las mutaciones en *IDH1* y Tau es independiente del grado tumoral, ya que los niveles de *Tau/MAPT* son significativamente más altos en tumores *IDH1 mut* en comparación con tumores *IDH1* salvaje (*IDH1 wt*), tanto en la cohorte de pacientes con GB (**Figura 7A**) como en la cohorte de pacientes con LGG (**Figura 7B**). Además, es interesante destacar que la presencia de mutaciones en *IDH1/2* identifica a un subgrupo de tumores con mejor pronóstico, tanto en gliomas de bajo como de alto grado (**Figura 7C**).

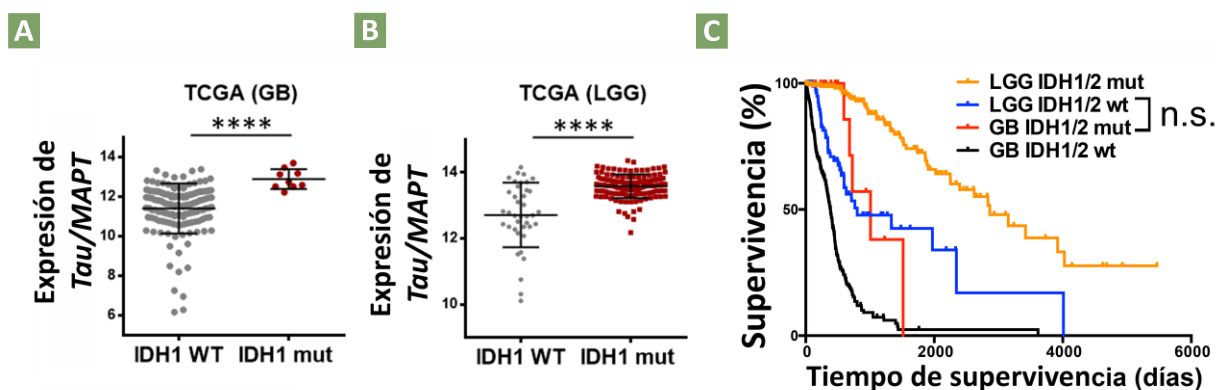


Figura 7. Los tumores mutantes para *IDH1/2* tienen niveles más altos de Tau y generan gliomas con mejor pronóstico. (A,B) Análisis de los niveles (mARN) de *Tau/MAPT* en pacientes con GB RNA-seq (n=149) (A) y LGG RNA-seq (n=170) (B) agrupados en función del estatus genético de *IDH1*. Datos del TCGA. (C) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes del TCGA con GBM (n=299) o con LGG (n=451) estratificados en base al estatus de *IDH1/2*. **** $p < 0,0001$.

2.2. Correlación entre los niveles de expresión de Tau y la expresión de *IDH1* mutante

Los resultados anteriores muestran una estrecha relación entre las mutaciones en *IDH1/2* y la expresión de Tau, lo que nos lleva a especular con una posible función reguladora de estas enzimas sobre el promotor de *Tau/MAPT*. Para corroborar esta hipótesis decidimos utilizar dos modelos tumorales: 1) una línea celular de glioma derivada de una muestra de paciente (PDX), llamada RG1, en la que sobre-expresamos *IDH1 wt* o la forma mutada más común de *IDH1*, *IDH1 R132H*; 2) un modelo murino de glioma, caracterizado por la presencia de *NRAS* y la ausencia de *Tp53* y *ATRX*, sobre el cual también se había sobre-expresado la forma salvaje y la forma mutada de *IDH1* (Núñez FJ et al., 2019). En ambos casos, cuando las células se implantaron en el cerebro de ratones, observamos un crecimiento significativamente más lento en presencia de la mutación de *IDH1* (**Figura 8A y 8B**). Además, cuando analizamos mediante WB la expresión proteica del tejido de estos tumores, observamos un claro aumento de la expresión de Tau en los gliomas tras la sobre-expresión de *IDH1 mut* (**Figura 8C y 8D**).

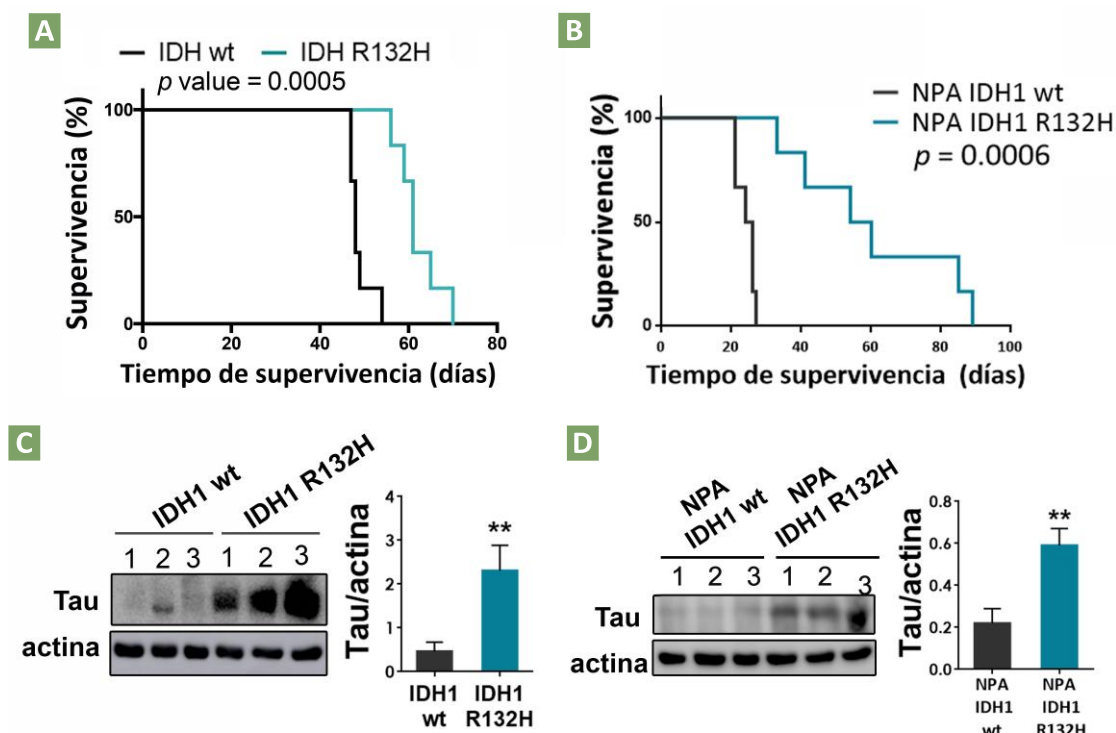


Figura 8. La sobre-expresión de IDH1 mutante (R132H) incrementa los niveles de Tau y la supervivencia de gliomas implantados en el cerebro de ratones. (A y B) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les inyectó la línea celular RG1 con sobre-expresión de IDH1 wt o IDH1 mutante (R132H) (A) o las líneas celulares NPA IDH1 wt y NPA IDH1 R132H (B) (n=6/condición) (C,D) Análisis por WB y cuantificación de la expresión de Tau del extracto del tejido tumoral de los experimentos A y B respectivamente, usando como control la expresión de actina. ** p < 0,01.

De manera adicional al efecto de las mutaciones en *IDH*, recientemente se ha demostrado que la expresión de IDH wt promueve el crecimiento tumoral y la resistencia a terapia de los gliomas en ausencia de mutaciones. Estos mismos autores sugieren además que a medida que aumentan los niveles de expresión de IDH wt, aumenta la agresividad de los tumores (Calvert et al., 2017). En este mismo sentido también se ha descrito que el fenotipo metabólico y epigenético inducido por la presencia de mutaciones en IDH puede ser reproducido por la inhibición genética o farmacológica de IDH1 wt (Molenaar et al., 2018). Todo esto sugiere que los niveles y el estatus genético de *IDH* es lo que determina el fenotipo final. Esta hipótesis podría explicar la correlación inversa que observamos entre la expresión de *IDH1* wt y la de *Tau/MAPT* (Figura 9A) y la alta expresión de *Tau/MAPT* que observamos tanto en tumores *IDH1* mut como en tumores con baja expresión de *IDH1* wt (Figura 9B). Además, esta correlación inversa entre la expresión de IDH1 wt y la de Tau fue corroborada en un panel de muestras de PDX (Figura 9C). En estas muestras, todas ellas IDH wt, la menor expresión de Tau correlaciona con una menor supervivencia de los animales tras un implante ortotópico (Figura 9D).

Estos resultados sugieren que la expresión de Tau se asocia con una menor agresividad de los gliomas, independientemente de la presencia o no de mutaciones en *IDH1*.

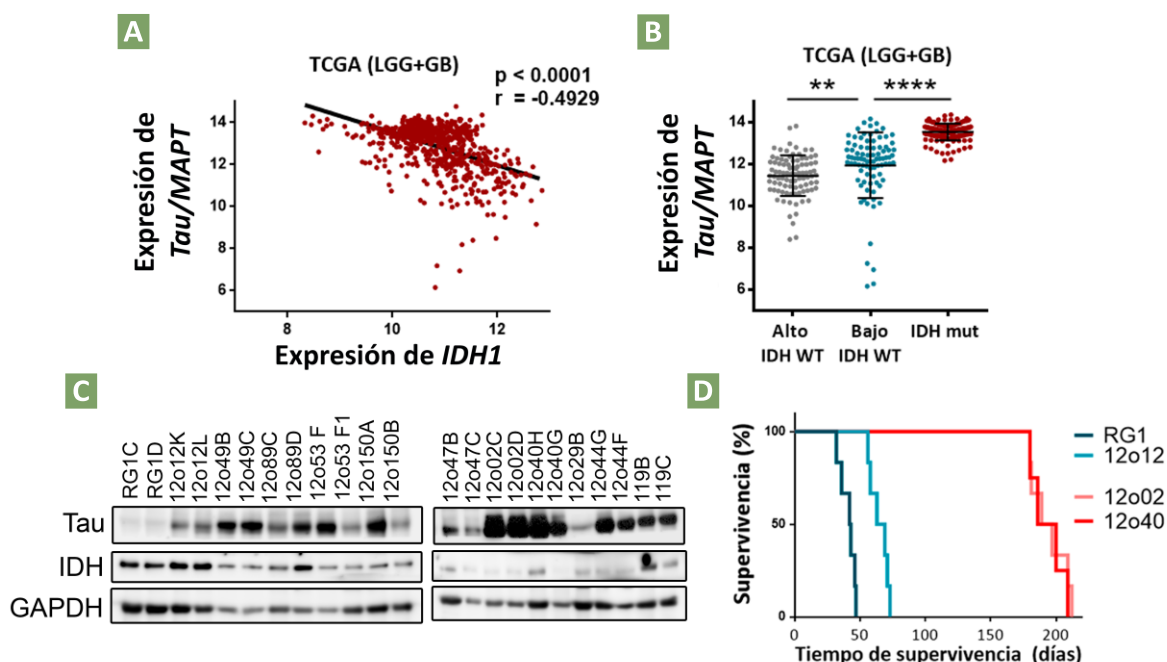


Figura 9. La expresión de Tau correlaciona con una baja expresión de IDH wt. (A) Análisis de correlación entre la expresión de *Tau/MAPT* e *IDH1 wt* usando un dot-plot de dispersión para su representación. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM, n=669). (B) Análisis de los niveles de expresión (mARN) de *Tau/MAPT* en pacientes con gliomas de bajo y alto grado en función del estatus genético de *IDH1*. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM, n=319). (C) Análisis por WB de la expresión Tau y de *IDH1 wt* en extractos de tejido de gliomas *IDH1/2 wt* derivados de pacientes y crecidos en ratones inmunodeficientes. (D) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les implantó de manera ortotópica gliomas con mayor o menor expresión de Tau (n=6/condición). ** p < 0,01 y **** p < 0,0001.

3. IDH mutante induce la expresión de Tau mediante la metilación de su promotor

Tal y como se mencionó en la introducción, las mutaciones en *IDH* inducen de manera generalizada la metilación del genoma (fenotipo G-CIMP), que inhibe la expresión de numerosos genes. Sin embargo, recientemente se ha demostrado por primera vez que la metilación específica inducida por mutaciones en *IDH* es capaz de promover la expresión génica de *PDGFRα* en gliomas (Flavahan et al., 2016). Esto se produce por la metilación del ADN en sitios específicos de unión a CTCF (del inglés *cohesin and CCCTC-binding factor*) en el promotor de dicho gen. La unión de CTCF genera horquillas en el ADN que impiden la interacción de las secuencias enhancer con la zona promotora, promoviendo la represión de

la expresión génica. Cuando el promotor está metilado, la proteína CTCF no puede unirse y como consecuencia se induce la transcripción.

En relación con Tau, comprobamos que la expresión de dicho gen es significativamente más elevada en los GB con fenotipo G-CIMP que en el resto de GB (**Figura 10A**). También observamos una correlación positiva entre la expresión de *Tau/MAPT* y la de *PDGFRa* en la cohorte de gliomas de bajo y alto grado del TCGA (**Figura 10B**). Estos resultados nos llevaron a hipotetizar que el promotor de *Tau/MAPT* podría estar regulado positivamente por los cambios epigenéticos inducidos por la mutación de *IDH1*. Para comprobarlo, primero analizamos la presencia de islas CpG en la región promotora del gen de *Tau /MAPT* mediante las herramientas de "genome-Xena Browser". Este análisis nos permitió identificar los posibles sitios de metilación de dicho promotor, que serían fundamentalmente tres islas CpG: CpG-302, CpG-26 y CpG-21, así como las sondas de medición de la metilación de cada una de estas islas CpG (**Figura 10C**). Posteriormente, comparamos el estado de metilación de las diferentes islas CpG del promotor de *Tau/MAPT* en tumores con y sin mutaciones en *IDH1*. Así, encontramos un aumento del estado de metilación en tumores *IDH1 mut* en comparación con los *IDH1 wt* en dos de las zonas regulatorias, en la isla CpG-26 y en la isla CpG-302, que correlacionaban con un aumento en la expresión de Tau (**Figura 10D**).

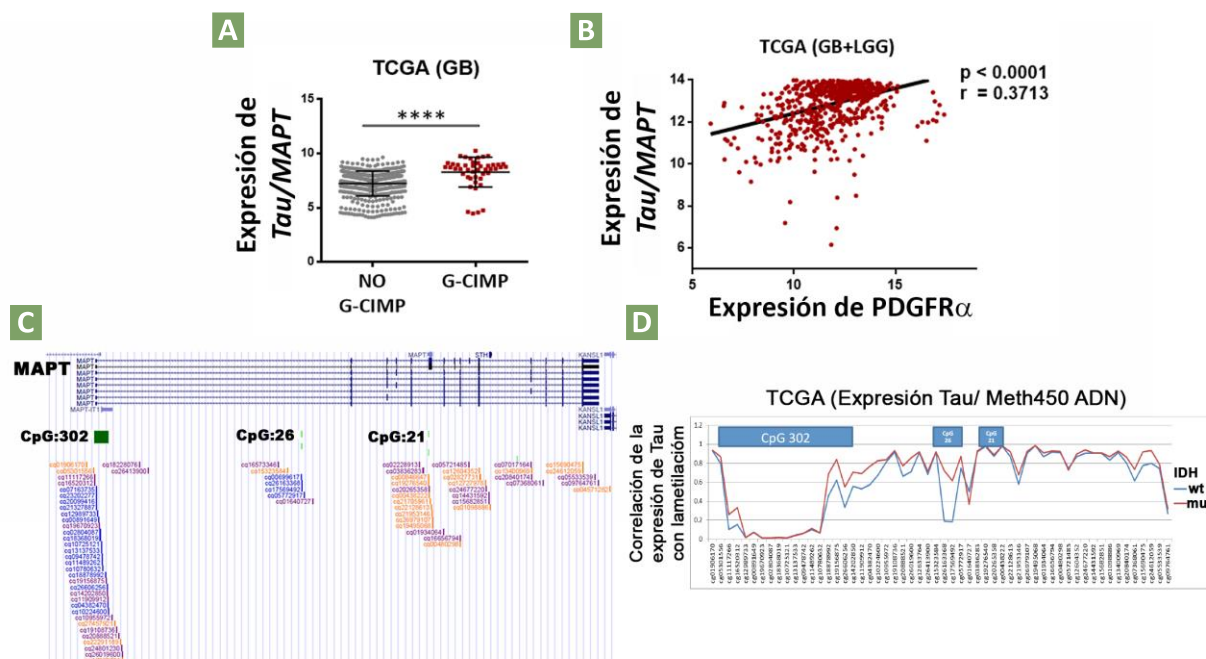


Figura 10. La expresión de Tau está asociada con el fenotipo metilador inducido por IDH mutante. (A) Análisis de los niveles expresión (mARN) de Tau/MAPT en pacientes con GB en función de la presencia o no del fenotipo G-CIMP. Datos del TCGA-GBM (n=521). (B) Análisis de correlación entre la expresión de Tau/MAPT y PDGFR α , representado mediante un plot de dispersión. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM, n=702). (C) Representación del locus de Tau/MAPT con las posibles isletas CpG en la zona promotora mostrando la localización de sondas de metilación con genome Browser. (D) Análisis del estado de metilación de las isletas CpG del promotor de Tau/MAPT en pacientes con LGG (TCGA-LGG, n=515). Las líneas azul y roja muestran los niveles de metilación en gliomas IDH wt e IDH mutante, respectivamente. **** $p < 0,0001$.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de regulación de la expresión de Tau por *IDH1 mut*, analizamos la unión de CTCF a su promotor. Para ello utilizamos los datos del ChIP-seq para dicho factor de transcripción, donde analizamos la unión del mismo al promotor de Tau/MAPT comparando gliomas *IDH1 wt* con gliomas *IDH1 mut*. En dicha comparación observamos una clara unión de CTCF a la isla CpG-26 en gliomas *IDH1 wt*, mientras que en los tumores mutantes para *IDH1* se pierde la capacidad de unión a esta isla debido a que ésta se encuentra metilada (Figura 11A). Por último, incubamos líneas primarias de GB con 2-HG, el oncometabolito producido cuando se expresa la forma mutante de *IDH*, y corroboramos la inducción de la expresión de Tau/MAPT a nivel de ARN mensajero por qRT-PCR (Figura 11B). Además, este efecto se veía revertido por la adición de Azacitidina, un agente de-metilante del ADN (Figura 11C). En conjunto, estos resultados demuestran que la metilación en la región CpG-26 está gobernada por la presencia de mutaciones en *IDH1*. Cuando dicha isla CpG se encuentra metilada se modifica la unión de CTCF al promotor de Tau/MAPT, permitiendo así su expresión.

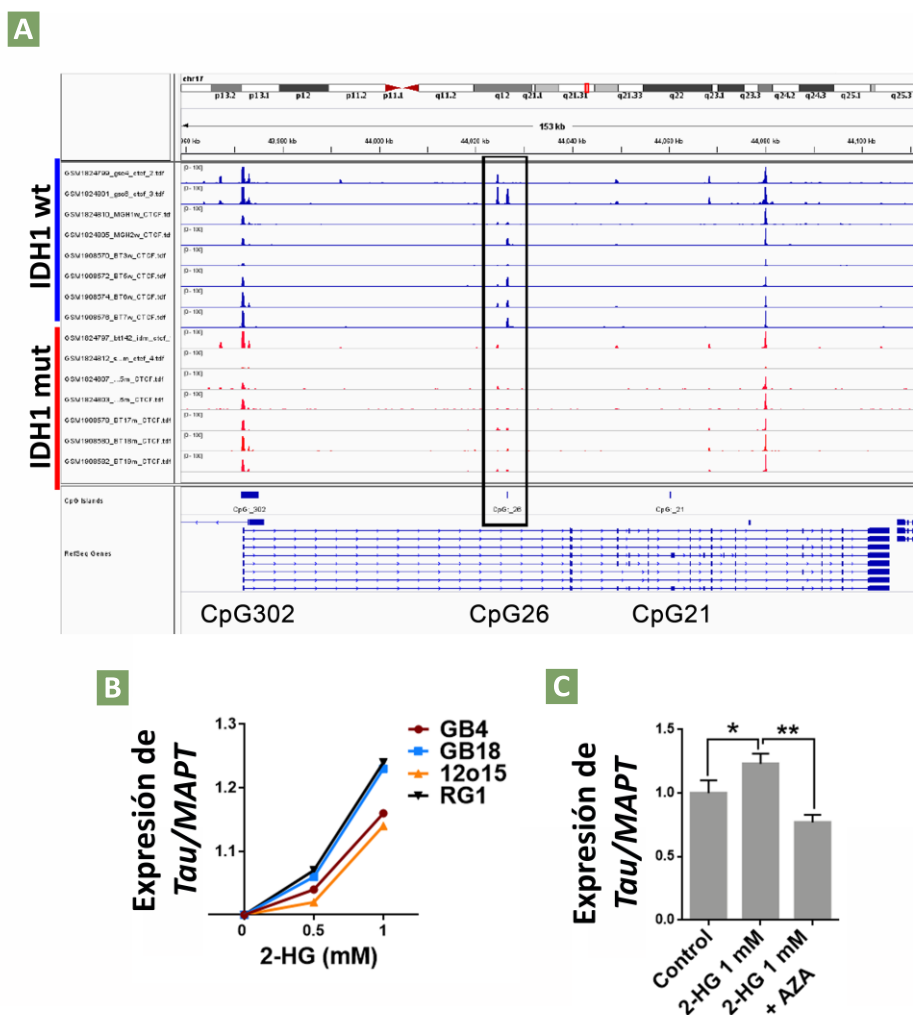


Figura 11. La expresión de *Tau* puede ser controlada por el estado de metilación de su zona promotora. (A) Análisis por Chip-Seq del perfil de unión de CTCF a las diferentes isletas CpG del promotor de *Tau/MAPT* en gliomas IDH wt e IDH mut. **(B)** Análisis de los niveles expresión (mARN) de *Tau* (qRT-PCR) en diferentes líneas primarias en presencia de diferentes cantidades de 2-HG. **(C)** Análisis de los niveles expresión (mARN) de *Tau* (qRT-PR) en la línea primaria RG1 en presencia de 2-HG 1mM con y sin Azacitidina (AZA) 5 µM. * p < 0,05, ** p < 0,01.

4. Tau controla la agresividad tumoral a través de la actividad de EGFR

4.1. Distribución excluyente entre altos niveles de *Tau* y las mutaciones en EGFR

Los datos presentados hasta ahora sugieren que *Tau*, cuya transcripción se induce en respuesta a mutaciones de *IDH*, podría determinar la agresividad del glioma. Para comprender este mecanismo realizamos en primer lugar un análisis de los procesos biológicos

que se asocian con el grupo de genes que co-expresan con *Tau* en gliomas, usando para ello el programa “DAVID gene ontology”. Como se esperaba, encontramos una asociación de *Tau* con procesos relacionados con microtúbulos y neurogénesis, incluyendo el control axonal y de dendritas y la regulación de la sinapsis (**Figura 12**), lo que sugiere que el papel de *Tau* en las células tumorales podría estar relacionado con su función fisiológica (Avila et al., 2012).

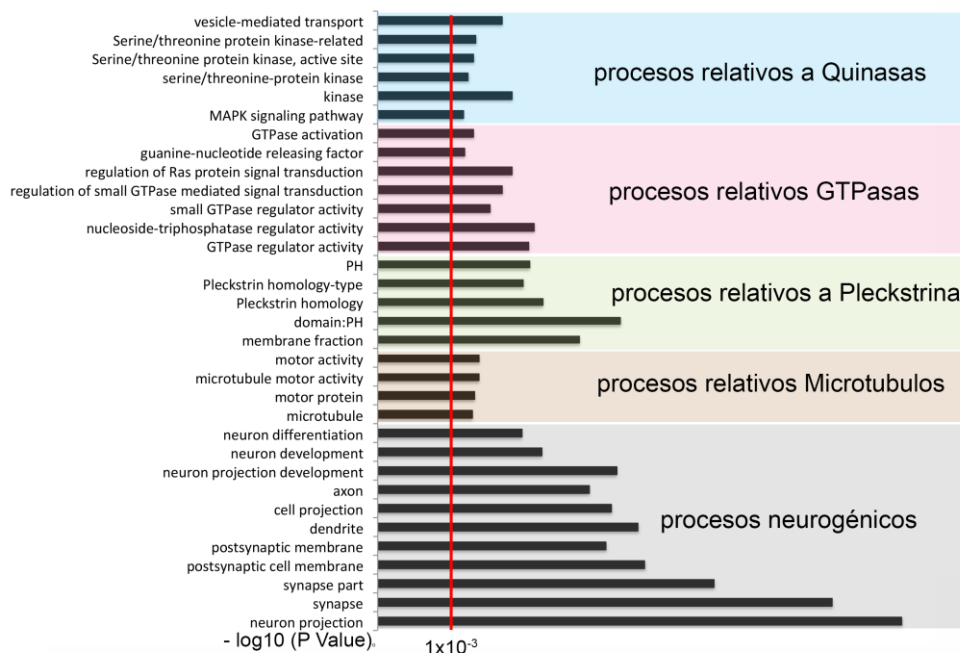


Figura 12. Los genes que se co-expresan con *Tau* se asocian a determinados procesos relacionados con receptores con actividad tirosina quinasa. Procesos biológicos asociados con la funcionalidad de *Tau* obtenidos mediante el análisis de los 500 genes que correlacionan en expresión con *Tau* usando la cohorte del TCGA- LGG+GBM y analizados con el programa “DAVID Gene ontology”.

Sin embargo, los otros procesos asociados con *Tau* están relacionados de alguna manera con la señalización de receptores tirosina quinasa (RTK): transporte de vesículas, regulación de MAPK/GTPasa y procesos relacionados con dominios de Pleckstrina (**Figura 12**). Teniendo en cuenta esta asociación y sabiendo la implicación de muchos receptores RTK en el desarrollo tumoral de los gliomas, realizamos un análisis *in silico*, donde pudimos observar que las mutaciones en *IDH1/2*, junto a niveles altos de expresión de *Tau*, son mutuamente excluyentes con las mutaciones en *EGFR* y *PTEN* (**Figura 13A**), lo que se corroboró en un gráfico de Volcano (**Figura 13B**). Esto sugiere que *Tau* podría estar modulando esta vía de señalización. Para corroborar este resultado, separamos los datos de los pacientes del TCGA en dos grupos: tumores con mutaciones en *EGFR* (*EGFR mut*) y pacientes con tumores sin mutación, pero con amplificación génica de *EGFR* (*EGFR amp*) y se estimó la implicación clínica de *Tau*, dividiendo cada grupo según la expresión alta o baja de dicho gen. Como se muestra en la (**Figura 13C**

y 13D) los pacientes con mutaciones en *EGFR* no muestran cambios en las curvas de supervivencia en función de los niveles de *Tau*. Sin embargo, hay una fuerte implicación de *Tau* en los pacientes con amplificación en *EGFR*, ya que una alta expresión de dicho gen correlaciona con una mayor supervivencia en este subgrupo de pacientes. Este resultado sugiere que en el grupo de gliomas *EGFR amp* existe una interacción entre la función IDH1/*Tau* y la vía de *EGFR/PI3K*. En base a estos datos nos planteamos que *Tau* podría tener un efecto inhibitorio en la señalización de *EGFR* en los gliomas con amplificación de dicho receptor. Sin embargo, en presencia de mutaciones en el receptor, donde generalmente la señalización de *EGFR* está constitutivamente activa, la función de *Tau* podría dejar de ser relevante.

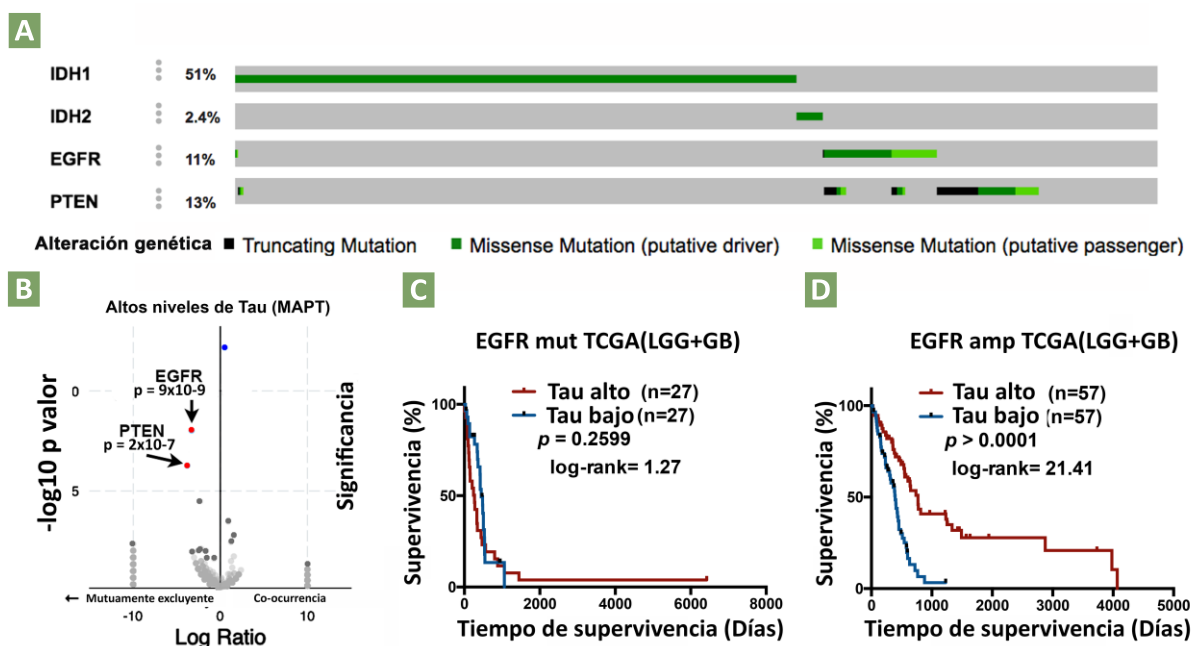


Figura 13. Análisis de distribución de las mutaciones de IDH y de EGFR/PTEN en gliomas. (A) Distribución de las mutaciones somáticas de *IDH1/2*, *EGFR* y *PTEN* en los gliomas. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM, n=812). (B) Representación mediante un gráfico de Volcano de la distribución de las mutaciones somáticas en gliomas con alta expresión de *Tau*/MAPT, en comparación con gliomas con baja expresión. Las flechas indican las mutaciones más excluyentes con una elevada expresión de *Tau*. (C-D) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes con mutaciones (n=54) (C) o amplificaciones (Cohorte TCGA LGG+GBM n=114) (D) en *EGFR*. Cada grupo fue estratificado en función de la expresión de *Tau*.

4.2. Tau inhibe la actividad de EGFR

Para profundizar en la implicación de *Tau* en función de *EGFR* decidimos utilizar dos modelos de glioma dependientes de *EGFR*. En primer lugar, generamos un modelo murino (ver Figura M1, Materiales y Métodos) a partir de progenitores de la zona subventricular (SVZ) de ratones p16/p19 KO, que fueron transformados oncogénicamente con retrovirus que

expresaban la forma salvaje de EGFR (SVZ EGFR wt/amp) o la forma mutante vIII del receptor (SVZ EGFR vIII), la cual tiene un fuerte potencial oncogénico (Zahonero and Sanchez-Gomez, 2014). Tal y como se puede observar en la **(Figura 14A y 14B)** los ratones con implantes ortotópicos de SVZ EGFR wt/amp con sobre-expresión de Tau presentan un incremento en la supervivencia. Por el contrario, esta sobre-expresión no tuvo ningún efecto en el crecimiento de los tumores SVZ EGFR vIII. Para corroborar estos resultados se utilizaron dos líneas de PDX humanas, la línea RG1 con presencia de *EGFR* amplificado y la 12o150, que presenta una mutación puntual para *EGFR*, además de la amplificación. La sobre-expresión de Tau en estas dos líneas mostró el mismo efecto que en los gliomas murinos, un incremento en la supervivencia en los ratones a los que se les implantó las células RG1 (*EGFR amp*), y resistencia al efecto de Tau por parte de la línea con mutación en el receptor (12o150) (*EGFR mut*) **(Figura 14Cy 14D)**. Cuando analizamos la expresión proteica mediante WB del tejido tumoral, tanto en el modelo de glioma murino (SVZ) como en los modelos de glioma humano (PDX), observamos que Tau inhibe la activación de EGFR, reduciendo significativamente su fosforilación en los tumores con amplificación de *EGFR*, efecto que no ocurre en los gliomas con mutación en el receptor **(Figura 14E y 14F)**. Estos datos correlacionan con los estudios *in silico* y confirman que la expresión de Tau modula el crecimiento de los gliomas dependientes de EGFR, siempre y cuando no estén presentes alteraciones génicas adicionales, ya sean deleciones o mutaciones puntuales, que hacen que la vía de señalización sea independiente de Tau.

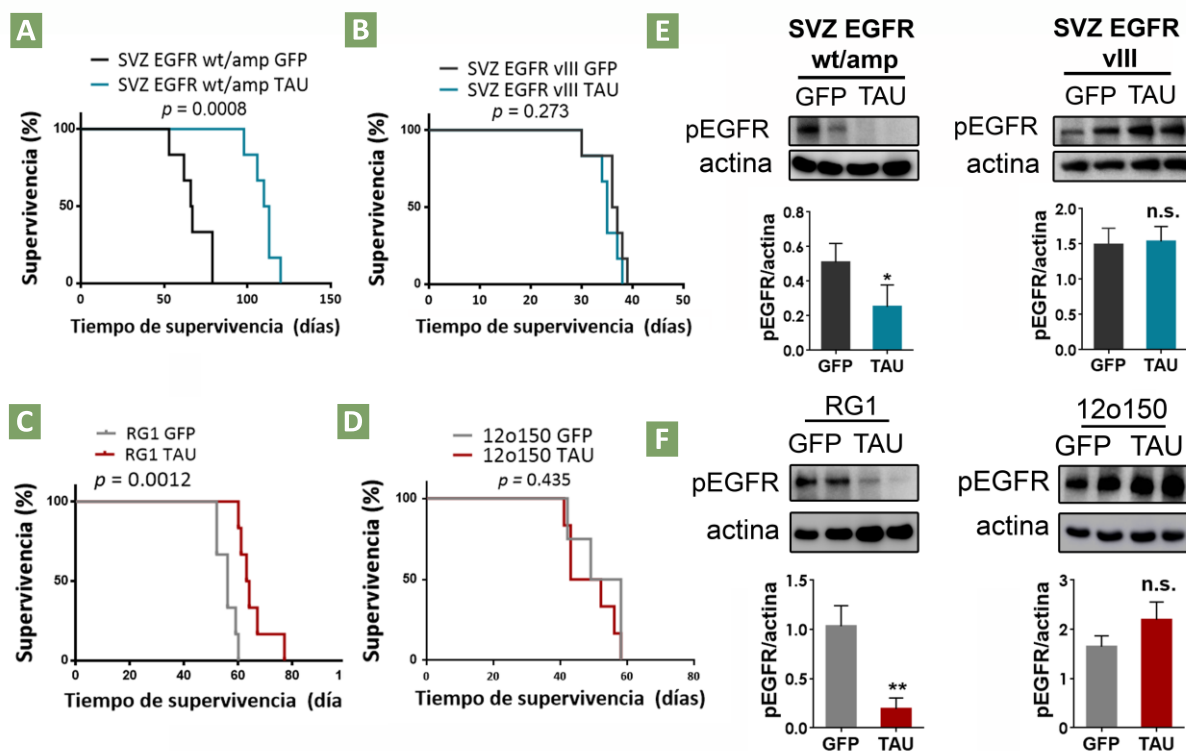


Figura 14. Tau inhibe la actividad de EGFR en tumores EGFR wt/amp. (A-D) Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les implantó las líneas de glioma SVZ EGFR wt(A) y SVZ EGFR VIII(B), y las líneas de GB humano, RG1 (EGFR amp) (C) y 12o150 (EGFR mut) (D) tras la sobre-expresión de Tau o de GFP (como control) (n=6/condición). **(E, F)** Análisis por WB y cuantificación de la fosforilación de EGFR (p-EGFR) en los extractos de tejido tumoral de los experimentos (A,E) usando actina como control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. n.s.: no significativo.

La principal función de Tau es la unión y subsecuente estabilización de los microtúbulos (ver Introducción). Para determinar si el efecto de Tau observado en los gliomas está relacionado con esta función, inyectamos la línea RG1 (EGFR amp) en el cerebro de ratones inmunodeficientes y comprobamos la capacidad antitumoral de un derivado del Taxol, el Epothilone D (EpoD), agente estabilizador de microtúbulos que se ha demostrado que es capaz de atravesar la BBB (Zhang et al., 2012a). El tratamiento sistémico intraperitoneal con EpoD incrementó significativamente la supervivencia de los ratones (**Figura 15A**) y redujo la cantidad de fosfo-EGFR en los tumores (**Figura 15B**). Estos datos refuerzan la idea de que la función de Tau sobre los microtúbulos está ligada al efecto que genera sobre la señalización del receptor de EGFR, a través del cual puede inhibir el crecimiento y la agresividad de los gliomas.

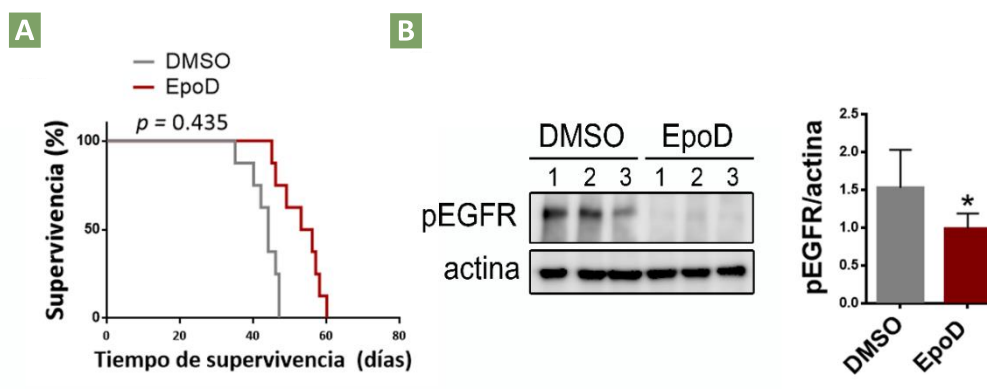


Figura 15. El tratamiento con Epothilone D (EpoD), un agente estabilizador de microtúbulos, inhibe la actividad de EGFR en tumores EGFR wt/amp. **(A)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes, que fueron inyectados con la línea celular RG1 (*EGFR amp*) y que fueron tratados intra-peritonealmente con EpoD (1mg/kg, dos veces a la semana) o con DMSO (n=6/condición). **(B)** Análisis por WB y cuantificación de p-EGFR en los extractos del tejido tumoral del experimento A. Actina fue usada como control. * $p < 0,05$.

5. Caracterización de los gliomas EGFR wt/amp y EGFR mut

5.1. Las mutaciones en EGFR favorecen la generación de tumores más agresivos

En el proceso de análisis del efecto de Tau en gliomas observamos importantes diferencias entre los tumores con amplificación de *EGFR* y los que presentan mutaciones en dicho gen. En la literatura existen numerosas evidencias que sugieren que la presencia de *EGFR mut* confiere una mayor capacidad para el inicio y el crecimiento de los gliomas (Zahonero and Sanchez-Gomez, 2014). Sin embargo, las diferencias entre los tumores generados no están bien descritas y creemos que podrían afectar a la respuesta de los gliomas tras la sobre-expresión de Tau. Por ello decidimos realizar un análisis comparativo de los tumores generados por células con amplificación y con mutación de *EGFR*. Comenzamos analizando en detalle los gliomas de ratón descritos anteriormente, SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR vIII, ya que el fenotipo de los tumores generados no va a estar influenciado por ningún otro tipo de mutaciones concomitantes, aparte de por las alteraciones en *EGFR*. Tal y como esperábamos, los tumores SVZ EGFR vIII fueron mucho más agresivos que los SVZ EGFR wt/amp (**Figura 16A**). Este resultado correlaciona con el peor pronóstico de los pacientes que tienen gliomas con mutaciones en *EGFR* (datos obtenidos del TCGA-LGG+GB) (**Figura 16B**). Asimismo, el análisis por IHQ e IF de los tumores reveló un crecimiento altamente compacto y proliferativo en tumores SVZ EGFR vIII, mientras que los tumores SVZ EGFR wt/amp presentaron una proliferación mucho menor, además de una distribución celular en el tejido mucho más dispersa (**Figura 16C**).

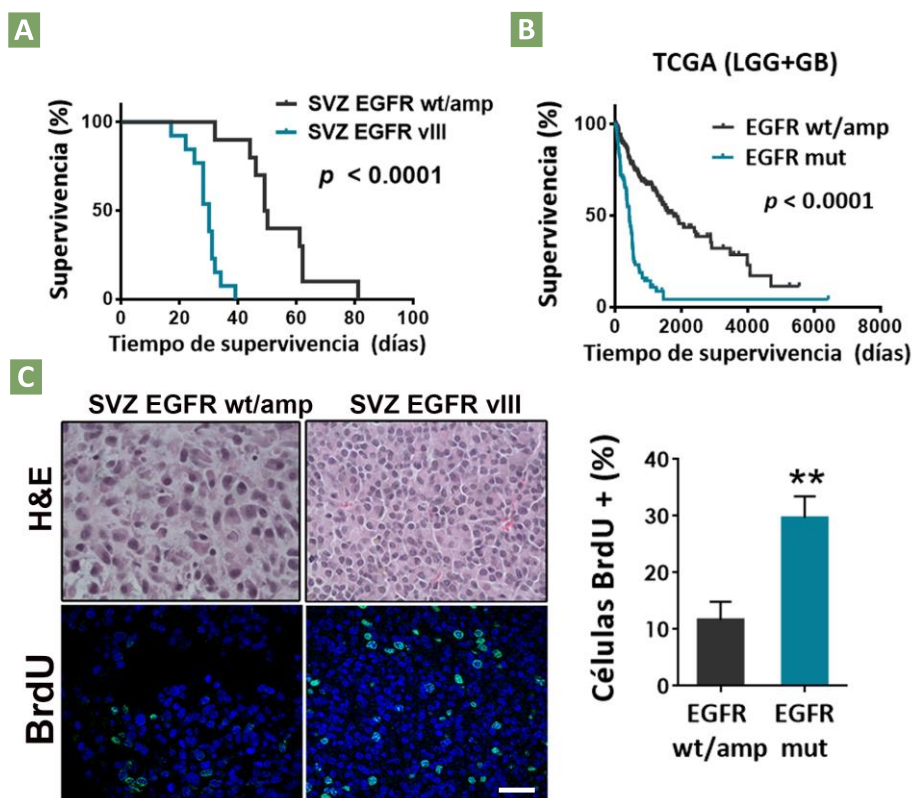


Figura 16. Las células SVZ EGFR vIII generan tumores más agresivos que las células SVZ EGFR wt/amp. (A) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les implantó la línea celular SVZ EGFR vIII (n=13) o la línea SVZ EGFR wt/amp (n=10). **(B)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes con glioma (cohorte TCGA LGG+GBM, n=722) estratificados en dos grupos en función del estatus genético de EGFR. **(C)** Imagen representativa de la tinción de H&E en cortes de tumores SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR vIII (Arriba) e imagen representativa de IF para la detección de células con incorporación de BrdU (Abajo). A la derecha la cuantificación de las células BrdU positivas por campo. Barra de escala: 40 μ m. ** p < 0,01.

5.2. Los tumores con mutaciones en EGFR están más vascularizados

Profundizando a nivel histológico observamos una estructura vascular diferencial en los tumores SVZ EGFR vIII, caracterizada por la presencia de vasos con un lumen mayor (denominados vasos dilatados) (**Figura 17A**), típicos de los GB (Hardee and Zagzag, 2012). Asimismo, el análisis *in silico* con los datos de pacientes del TCGA reveló diferencias significativas entre gliomas EGFR *mut* y EGFR *wt/amp* en cuanto a la expresión de una firma genética relacionada con angiogénesis y neo-vascularización (Firma Vascular). Este mismo tipo de análisis de expresión lo realizamos con genes relacionados con otro tipo de procesos del microambiente del tumor, como el infiltrado inmune (Firma Inmune), y no encontramos diferencias de expresión significativas al comparar los dos grupos de tumores en función del estado genético de EGFR (**Figura 17B**). Estos datos sugieren que la actividad del receptor de EGF mutado tiene un efecto específico sobre el fenotipo vascular. Para validar este resultado

seleccionamos del análisis *in silico* un conjunto de genes que abarcan todo tipo de señales relacionadas con la vasculatura (moléculas de secreción, moléculas estructurales, tanto de células endoteliales como periciticas, y moléculas involucradas en la formación de la matriz extracelular). Mediante análisis por qRT-PCR pudimos confirmar que la expresión de estos genes es significativamente mayor en los tumores SVZ EGFR vIII en comparación con los tumores SVZ EGFR wt/amp (**Figura 17C**), lo que confirma que los primeros tienen una mayor capacidad vascular.

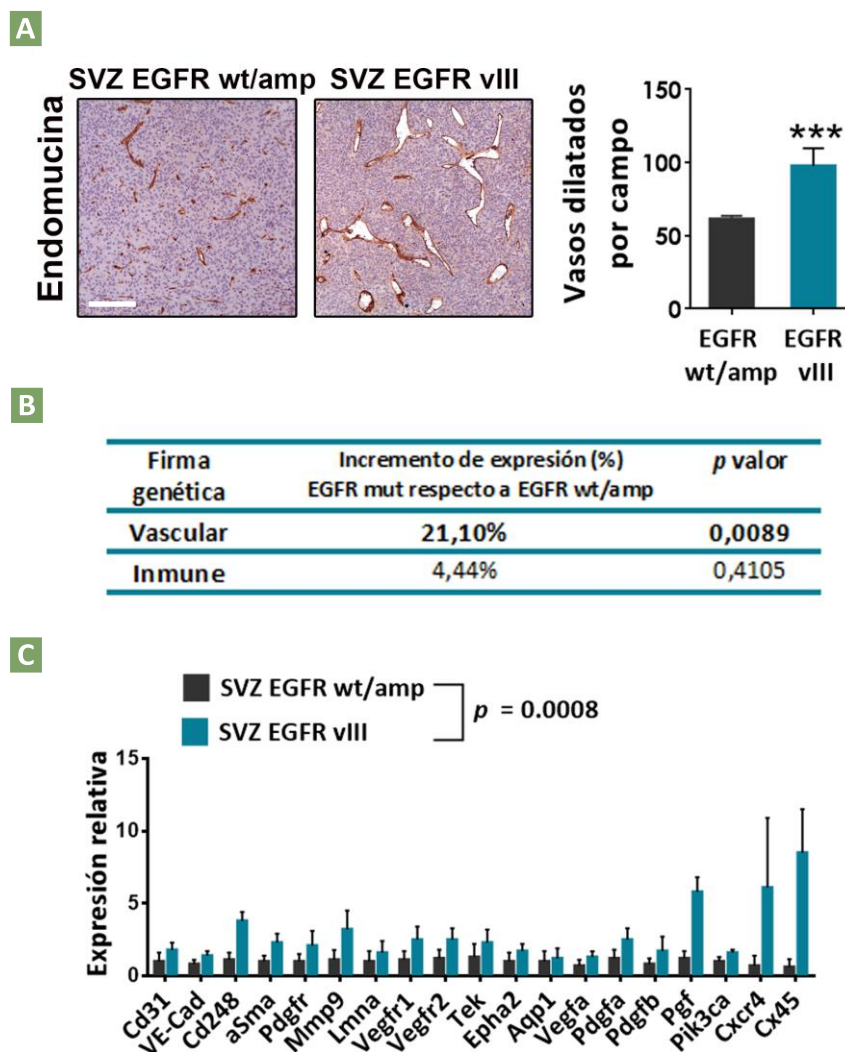


Figura 17. Las células SVZ EGFR vIII generan tumores más angiogénicos que las células SVZ EGFR wt/amp. (A) Imagen representativa de la IHQ de endomucina (marcador de endotelio) en cortes de tumores SVZ EGFRwt/amp y SVZ EGFR vIII y cuantificación del número de vasos dilatados por campo. Barra de escala: 100 μ m **(B)** Incremento de los niveles de expresión de los genes incluidos en una firma genética asociada a vasculatura y otra asociada al infiltrado inmune en gliomas. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM n= 702) divididos en función de las alteraciones genéticas de EGFR. **(C)** Análisis de expresión, mediante qRT-PCR, de la firma genética asociada a vasculatura en extracto de tumores SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR vIII. El gen de *Actina* fue usado para la normalización de la expresión. *** p < 0,001.

5.3. Los tumores con mutaciones en *EGFR* presentan un menor grado de rotura de la barrera hematoencefálica (BBB)

Los procesos de formación de la vasculatura de los gliomas determinan en última instancia la funcionalidad de la BBB. De hecho, la rotura de la BBB es un sello distintivo de la agresividad tumoral, ya que permite la entrada de fluidos y provoca el llamado edema vasogénico, que es una de las principales causas de mortalidad en los pacientes (Ryan et al., 2012). Por ello decidimos analizar la integridad de la BBB en los dos modelos de glioma murino, midiendo la extravasación de Gadolinio (Gd) mediante resonancia magnética, ya que su captación está directamente relacionada con un aumento de la permeabilidad de la barrera. Dicho análisis comparativo lo realizamos en ratones con tumores SVZ *EGFR* wt/amp y SVZ *EGFR* vIII. Para nuestra sorpresa, el análisis de MRI reveló una mayor captación en tumores SVZ *EGFR* wt/amp en comparación con tumores SVZ *EGFR* vIII (**Figura 18A**), siendo la diferencia cada vez mayor a medida que aumentaba el tiempo tras la inyección del Gd (**Figura 18B**). Dicho resultado fue corroborado cuando inyectamos a los animales el colorante Evans Blue y vimos que había una mayor extravasación del mismo en tumores SVZ *EGFR* wt/amp que en los mutantes (**Figura 18C**), lo que refuerza que la integridad de la BBB está comprometida en los primeros.

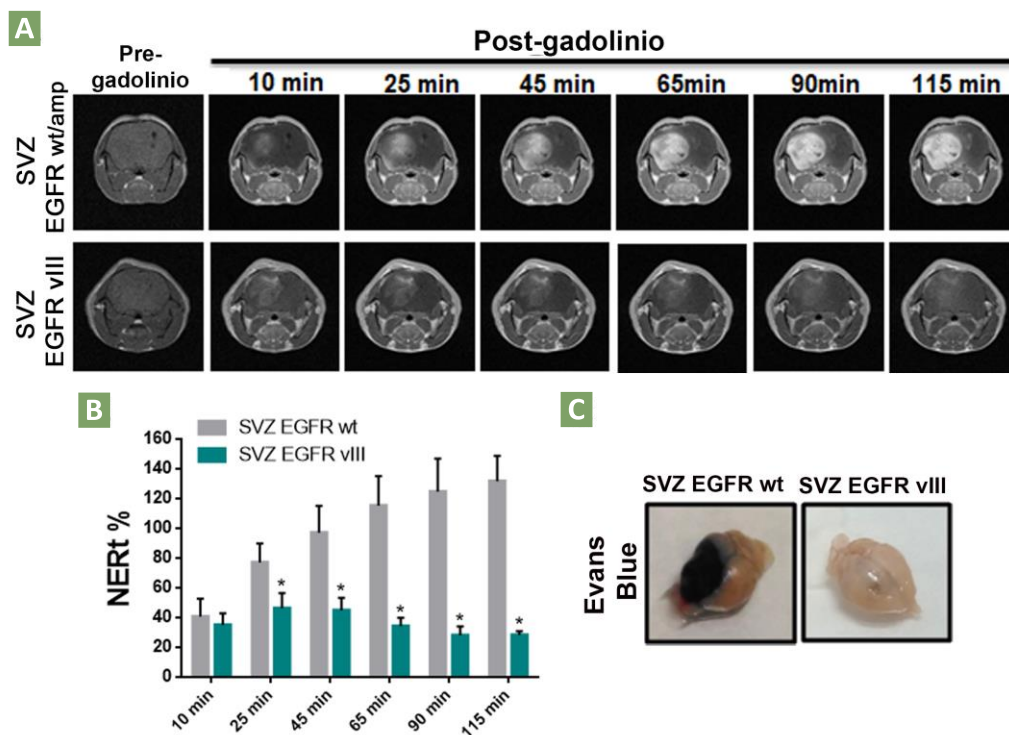


Figura 18. Los gliomas SVZ EGFR wt/amp presentan mayor rotura de vasos que los gliomas SVZ EGFR wt/amp. (A) Imágenes representativas de MRI (secuencias T1 + contraste) de cerebros de ratones a los que se les implantó en el cerebro la línea SVZ EGFR wt/amp o la línea SVZ EGFR vIII. Imágenes y cuantificación **(B)** a distintos tiempos tras la inyección del Gadolinio (Gd) **(C)** Imagen representativa de la extravasación de Evans Blue en un cerebro de un ratón con un glioma SVZ EGFR wt/amp o con un glioma SVZ EGFR vIII.

En conjunto, estos datos sugieren que las células de glioma con mutaciones en *EGFR* provocan una gran respuesta angiogénica, generando tumores altamente vascularizados. Por otro lado, las células con amplificación en el receptor generan una red vascular menos densa, pero en la que la integridad de la BBB está más comprometida.

6. Diferencias en la función pericitica entre gliomas *EGFR wt/amp* y gliomas *EGFR mut*

6.1. Las mutaciones en *EGFR* inducen una mayor capacidad de la célula tumoral para transformarse en pericito

La integridad de la BBB en los gliomas depende de dos componentes celulares: las células endoteliales y los pericitos. Estos últimos son los que recubren la superficie del vaso y estabilizan el flujo sanguíneo, por ello se llaman también células murales (Bergers and Song, 2005). En los últimos años se ha demostrado que las células madre de los gliomas, especialmente aquellas con características mesenquimales (GSC MES), son capaces de adquirir características y funciones de pericito mediante un proceso de trans-diferenciación (Scully et al., 2012) (Cheng et al., 2013) (Zhou et al., 2017). De hecho, estos mismos autores sugieren que la mayoría de los pericitos en los GB agresivos proceden de las células tumorales (Cheng et al., 2013). Este no es un fenómeno exclusivo de los gliomas ya que se ha asociado con el mantenimiento de la integridad vascular en otro tipo de tumores (Shenoy et al., 2016). Por todo ello, nos planteamos la posibilidad de que las diferencias en la vasculatura y, por defecto, en la integridad de la BBB, entre tumores *EGFR mut* y *EGFR amp/wt*, podrían estar relacionadas con la capacidad diferencial de estas células tumorales para transformarse y funcionar como pericitos. Para corroborar esta hipótesis determinamos en primer lugar la capacidad de las células tumorales, tanto *EGFR wt* como mutante, de transformarse a pericitos. La expresión del gen reportero GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*) nos permitió aislar por FACS (del inglés *Fluorescence activated cell sorting*) las células tumorales procedentes de gliomas SVZ *EGFR wt/amp* y SVZ *EGFR vIII* implantados de manera ortotópica. En dichas células analizamos mediante qRT-PCR la expresión de marcadores específicos de pericitos (*PDGFR β* , α -SMA, *NG2* Y *CD248*) (**Figura 19A**) y observamos que en ambos tipos de glioma hay expresión de dichos marcadores, aunque es mayor la expresión en células tumorales *EGFR vIII*. Además, usando la expresión de GFP de las células tumorales, pudimos observar mediante IF la co-localización de GFP y el marcador de pericito α -SMA tanto de las células tumorales SVZ *EGFR wt* como SVZ *EGFR vIII* (**Figura 19B**). Esta misma idea la corroboramos en los gliomas generados por los dos PDX utilizados anteriormente, RG1 (*EGFR amp*) y 12o150 (con una mutación puntual en *EGFR*). En este caso nos aseguramos que la expresión era específica de la célula tumoral utilizando cebadores que solo amplifican la secuencia de los genes humanos. Al igual que en el modelo murino observamos una expresión de todos los marcadores de pericito en ambos tumores, siendo mayor en el tumor con mutación en *EGFR* (**Figura 19C**). Estos datos sugieren que la capacidad de la célula tumoral de transformarse en pericito podría estar gobernada por la

actividad de EGFR y que ésta sería mayor en presencia de mutaciones, ya sean deleciones o mutaciones puntuales.

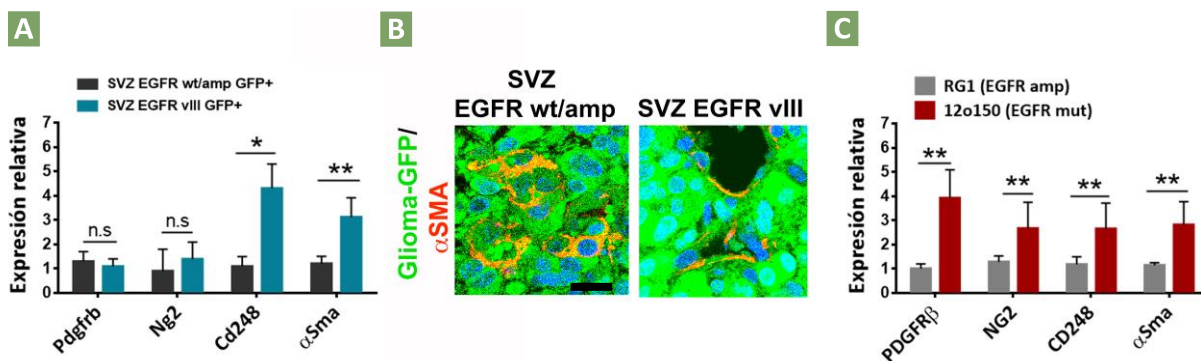


Figura 19. Las células de gliomas EGFR mut expresan más marcadores de pericitos que las células EGFR wt/amp. (A) Análisis de expresión (qRT-PCR) de los marcadores específicos de pericitos en células tumorales procedentes de tumores SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR VIII (aisladas por FACS gracias a la expresión de GFP). Actina usada para la normalización de la expresión. **(B)** Imágenes representativas de IF de la co-tinción de GFP y αSMA en cortes de tumores SVZ EGFRwt/amp o SVZ EGFR VIII. Barra de escala: 20 μm **(C)** Análisis de expresión (qRT-PCR) de los marcadores de pericitos en células tumorales procedentes de tumores RG1 (EGFR amp) y 12o150 (EGFR mut) (usando cebadores específicos de humano). HPRT fue usado para la normalización de la expresión. * p < 0,05, ** p < 0,01. n.s.: no significativo.

6.2. Los pericitos muestran una mayor capacidad para unirse al endotelio en los tumores EGFR mut

La capacidad funcional de los pericitos depende de su localización e interacción con los distintos componentes del vaso. Con el fin de caracterizar dicha localización realizamos una doble IF del endotelio (utilizando el marcador específico endomucina) y de la célula pericitica (con un anticuerpo frente α-SMA) en cortes de tumores SVZ EGFR wt/amp y EGFR VIII, así como en cortes de tumores de PDX EGFR amplificado (RG1) y mutante (12o150). El análisis de estas tinciones nos permitió determinar que los pericitos de tumores con mutación en EGFR aparecen en contacto directo con las células endoteliales mientras que en tumores con amplificación en EGFR, parte de los pericitos aparecen deslocalizados respecto del endotelio (**Figura 20A y 20B**). Estos datos sugieren que, aunque las células del glioma con activación de la vía de EGFR experimentan el proceso de trans-diferenciación a pericitos, solo en presencia de mutaciones en EGFR estos pericitos son reclutados de manera efectiva a los vasos.

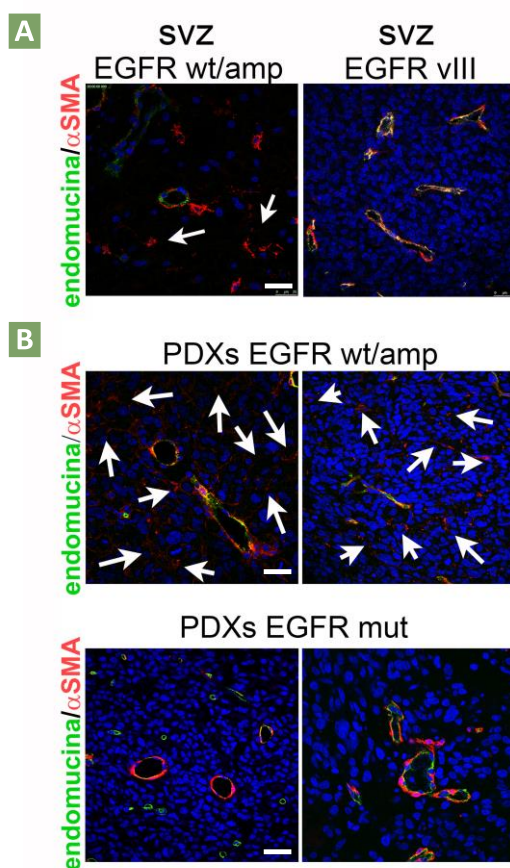


Figura 20. La localización de los pericitos depende del estatus genético del receptor *EGFR*. (A y B) Imágenes representativas de IF de la co-tinción de endomucina y α SMA en cortes de tumores SVZ EGFRwt/amp o SVZ EGFR vIII (A) y PDX (B) con presencia de amplificación o mutación en *EGFR*. Las flechas señalan células α SMA positivas que se encuentran deslocalizadas de las células endomucina positivas. Barra de escala: 25 μ m.

6.3. La mutación de *EGFR* favorece la incorporación del pericito al vaso mediante la expresión de *CXCR4* y *CX45* y la consecuente activación de p-PDGFR β

Con el fin de caracterizar el mecanismo causante del diferente comportamiento de los pericitos tumorales en función del estatus genético de *EGFR* decidimos cuantificar mediante qRT-PCR la expresión de los genes incluidos en la firma genética descrita anteriormente (Figura 17C) en células SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR vIII crecidas in vitro. Como podemos ver en la **Figura 21**, se observó un aumento significativo de la expresión de *Cxcr4* y *Cx45*, dos moléculas implicadas en el reclutamiento y adhesión celular. Asimismo, se detectó un aumento significativo en la expresión de *Cd248*, que es un marcador que se asocia fundamentalmente con pericitos tumorales (Simonavicius et al., 2008). Estos resultados sugieren que las mutaciones en *EGFR* inducen un comportamiento diferencial de las células de glioma incluso en ausencia

del microambiente tumoral, y que estos cambios están encaminados a favorecer el desarrollo vascular dentro del tumor.

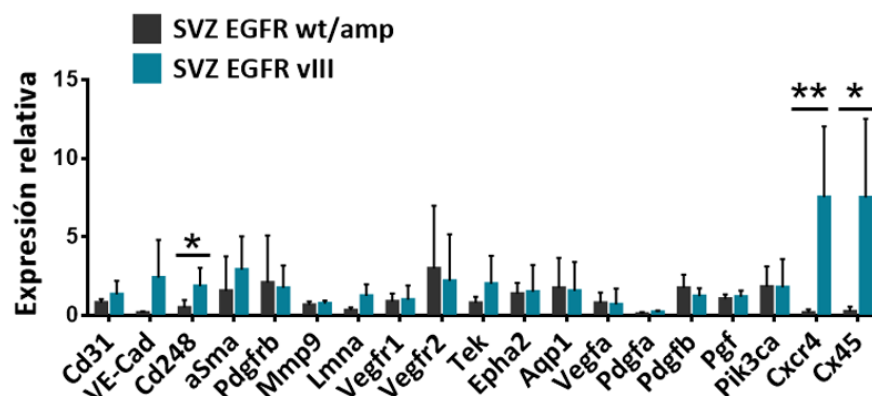


Figura 21. La mutación de EGFR activa la expresión de Cxcr4 y Cx45, moléculas implicadas en reclutamiento y adhesión celular. Análisis de expresión mediante qRT-PCR de un conjunto de genes relacionados con la angiogénesis (firma génica figura 15C) en células SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR VIII crecidas *in vitro*. Actina fue usada para normalizar la expresión. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Posteriormente estudiamos a nivel proteico varias vías de señalización importantes en el desarrollo angiogénico y vascular que se han asociado con EGFR. Para ello utilizamos extractos de tumores SVZ EGFR wt/amp y EGFR VIII y, como control, extractos de tumores generados por la línea GL261, un modelo de glioma de ratón que no presenta ninguna alteración del gen de EGFR pero que se ha descrito que presenta las anomalías vasculares típicas de estos tumores (Park et al., 2016). Como se observa en la **Figura 22A** detectamos altos niveles de fosforilación de EGFR en los tumores SVZ EGFR VIII en comparación con tumores SVZ EGFR wt/amp, sin ninguna diferencia en cuanto a la vía de AKT/ β -catenina. Sin embargo, sí que observamos un fuerte aumento en los niveles de fosforilación de PDGFR β en SVZ EGFR VIII, sin diferencias en la cantidad de PDGFR β total. Es interesante reseñar que no se detectó fosfo-PDGFR β ni en las células SVZ EGFR VIII crecidas *in vitro* ni en los extractos de tumores GL261, lo que sugiere que la activación de este receptor ocurre solo en el microambiente tumoral y solo en respuesta a la presencia de mutaciones en EGFR. Además, este aumento de fosfo-PDGFR β lo confirmamos al comparar mediante WB extractos de PDXs EGFR *mut* con extractos de PDXs EGFR wt/amp (**Figura 22B y 22C**). Asimismo, el análisis mediante IF confirmó que dicha fosforilación se localiza de manera específica en los pericitos adyacentes a los vasos tumorales (**Figura 22D**). En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de mutaciones en EGFR en las células de glioma favorece de manera autónoma-celular la expresión de marcadores de células periciticas. Dentro del tumor, estas células tendrían por tanto una mayor capacidad para migrar y adherirse a la célula endotelial, lo que conllevaría la subsecuente activación de

la vía de PDGFR β , probablemente en respuesta al ligando secretado por la célula endotelial (Ostman, 2004).

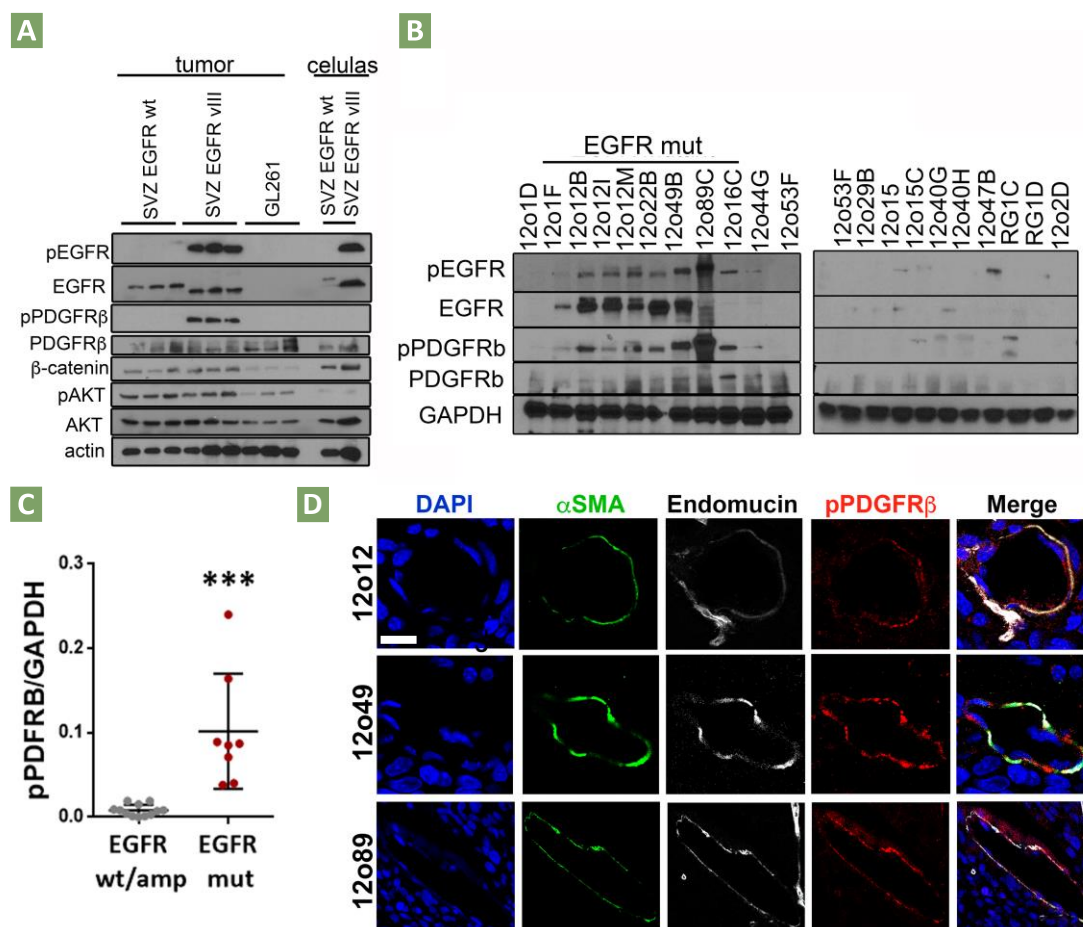


Figura 22. Los gliomas EGFR mutantes activan la vía de señalización de PDGFR β . (A) Análisis por WB de EGFR, p-EGFR, p-AKT, AKT, β -catenina, p-PDGFR β y PDGFR β en el extracto de tejido de tumores SVZ EGFR wt/Amp, SVZ EGFR VIII y GL261. Extractos de las células SVZ EGFR wt/amp y SVZ EGFR VIII crecidas in vitro fueron utilizadas como control. Actina fue usada para normalizar la expresión. (B y C) Análisis por WB y cuantificación de p-EGFR, EGFR, p-PDGFR β y PDGFR β en extractos de tejido tumoral de PDX. GAPDH fue utilizado como control. (D) Imágenes representativas de IF de la co-función de endomucina, α SMA y p-PDGFR β en cortes de tumores PDX con mutaciones en EGFR. Barra de escala: 25 μ m. *** p < 0,001.

Varios grupos han descrito que la activación de PDGFR β es necesaria para la correcta integración de los pericitos en la pared del vaso (Abramsson et al., 2003). Con el fin de confirmar si esto mismo está ocurriendo en los gliomas EGFR mut, inyectamos células SVZ EGFR VIII y tratamos los animales con sunitinib, un inhibidor de PDGFR β . Dicho fármaco administrado de manera sistémica intraperitonealmente disminuyó significativamente el crecimiento del tumor, incrementando la supervivencia de los ratones (Figura 23A y 23B). Además, el bloqueo de la actividad del receptor de PDGFR β genero una reducción de la cantidad de vasos tumorales (Figura 23C) y una deslocalización de los pericitos (Figura 23D), observándose un

fenotipo similar al de los gliomas *EGFR wt/amp*. Estos datos sugieren que la señalización de *EGFR mut* fomenta el anclaje de los pericitos a los vasos del glioma a través de la activación de *PDGFRβ*, lo que a su vez favorece la neovascularización del tumor y por tanto la agresividad del glioma.

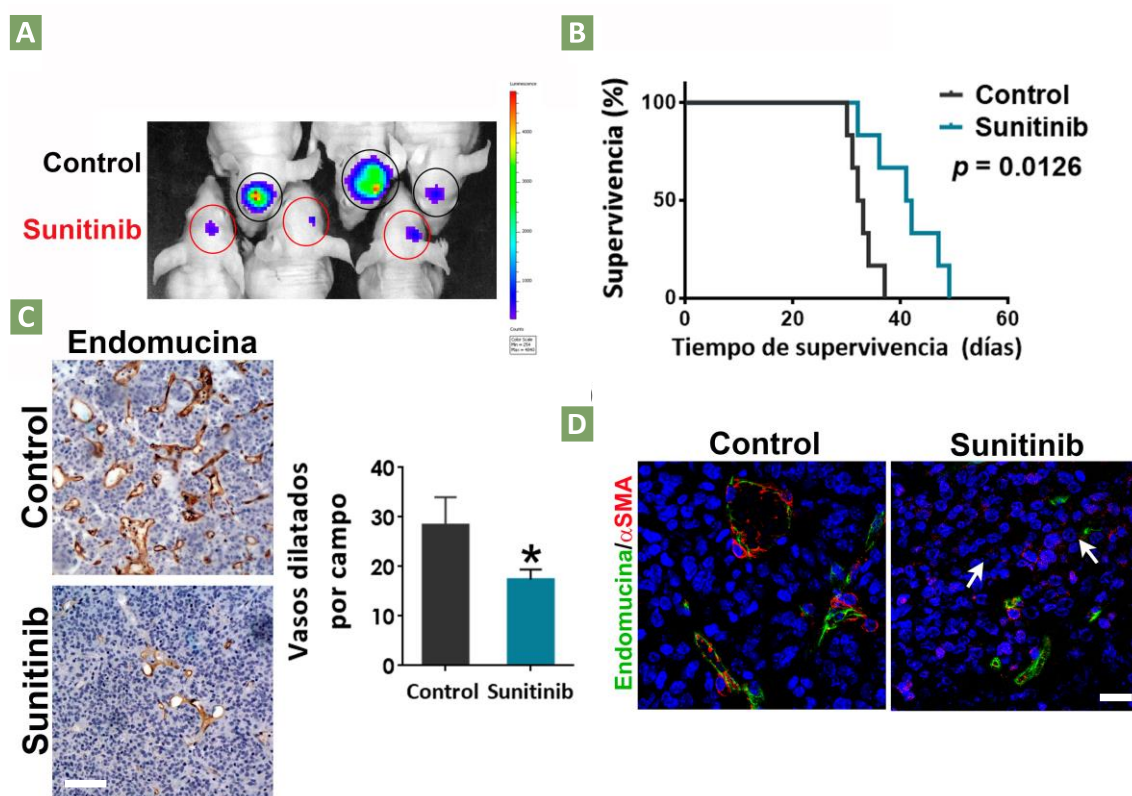


Figura 23. El tratamiento con Sunitinib genera tumores menos agresivos al reducir la vasculatura de gliomas *EGFR mut*. **(A)** Imagen representativa de la bioluminiscencia generada por las células tumorales en ratones con gliomas SVZ *EGFR vIII* tras el tratamiento con el vehículo (Control) (Arriba) o con Sunitinib (Abajo). **(B)** Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones a los que se les inyectó la línea celular SVZ *EGFR vIII* y que fueron tratados intraperitonealmente con Sunitinib (6 mg/kg 5 veces a la semana) o con el vehículo (Control) (n=6/condición). **(C)** IHQ de endomucina en cortes de tejido de tumores SVZ *EGFR vIII* control y tratados con Sunitinib. A la derecha se muestra la cuantificación del número de vasos dilatados por campo. Barra de escala: 100 μ m. **(D)** IF de la co-tinción de endomucina y α SMA. Las flechas señalan células α SMA positivas que se encuentran deslocalizadas de las células endomucina positivas. Barra de escala: 25 μ m. * $p < 0,05$.

7. Tau normaliza la vasculatura en gliomas con amplificación de EGFR

7.1. Tau bloquea la transformación de la célula tumoral a pericito en los gliomas EGFR wt/amp

Teniendo en cuenta que una de las principales diferencias entre tumores EGFR amplificados y mutantes es el desarrollo vascular, y que la sobre-expresión de Tau inhibe exclusivamente el crecimiento de los gliomas EGFR wt/amp, ya que no tiene efecto en los tumores EGFR mut (Figura 14), hipotetizamos que la función de Tau en los gliomas podría estar relacionada con el desarrollo vascular. Por ello decidimos caracterizar la vasculatura de los PDX EGFR amp, con y sin sobre-expresión de Tau (RG1 GFP y RG1 TAU). En primer lugar, realizamos un análisis histológico general, donde observamos una disminución de la proliferación celular en los tumores con sobre-expresión de Tau (**Figura 24A**), lo que probablemente esté ligado al aumento de supervivencia ya descrito anteriormente. Asimismo, observamos una reducción significativa en el número de vasos sanguíneos dilatados en los tumores RG1 TAU en comparación con los controles (**Figura 24B**).

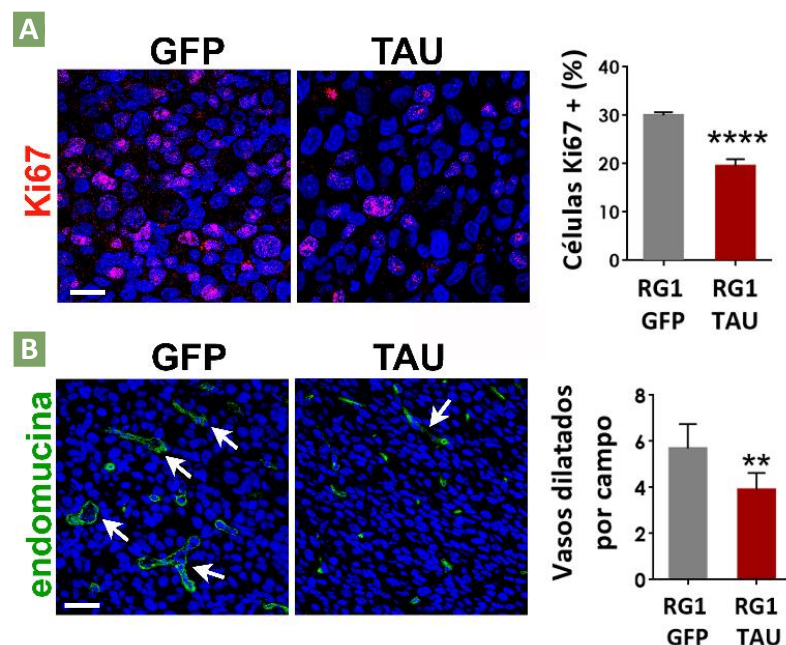


Figura 24. La sobre-expresión de Tau reduce el crecimiento tumoral y la vasculatura de gliomas EGFR wt/amp. (A) IF para la detección de células Ki67 positivas y su cuantificación en cortes de tejido tumoral RG1 GFP y RG1 TAU. Barra de escala: 25 μ m. **(B)** IHQ de endomucina y cuantificación del número de vasos dilatados por campo en cortes de tejido tumoral RG1 GFP y RG1 TAU. Barra de escala: 50 μ m. ** p < 0,01 y **** p < 0,0001.

Posteriormente realizamos una doble tinción de IF con el marcador específico de endotelio (endomucina) y de pericito (α SMA y CD248), donde observamos una clara disminución en la cantidad de células periciticas, especialmente las deslocalizadas del endotelio, en los tumores con mayor expresión de Tau (**Figura 25A**). Es importante reseñar que esta disminución afecta principalmente a los pericitos derivados de células tumorales y no a los pericitos endógenos ya que detectamos la bajada en la expresión de marcadores periciticos cuando se usaron cebadores específicos de los genes humanos (**Figura 25B**) pero no cuando se usaron cebadores de ratón (**Figura 25C**). Es importante destacar que la sobre-expresión de Tau no afecta a esta diferenciación de los pericitos tumorales en PDX *EGFR mut* como el 12o150 (**Figura 25D**). Estos resultados sugieren que Tau inhibe la diferenciación de las células del glioma a pericito en tumores *EGFR wt/amp*, sin afectar a los pericitos del huésped.

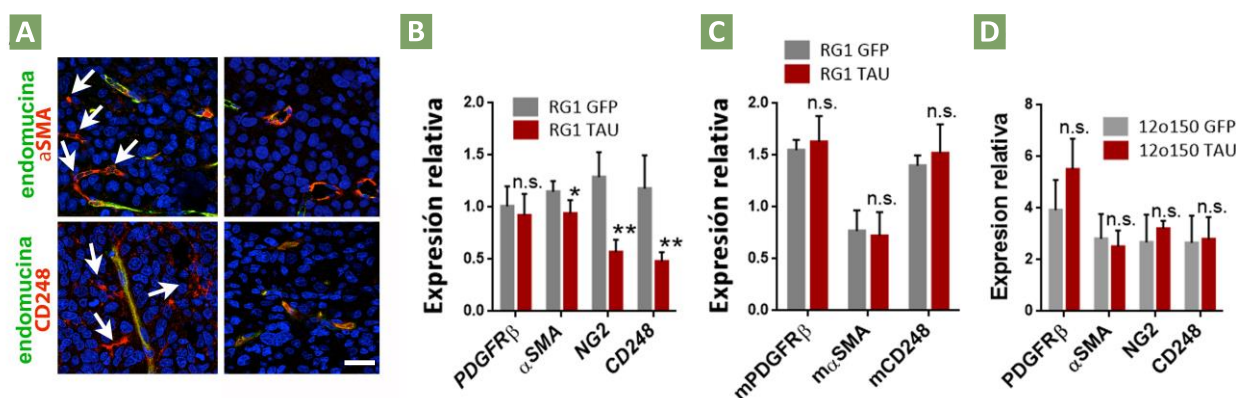


Figura 25. La sobre-expresión de Tau bloquea la transformación de la célula tumoral a pericito en gliomas *EGFR wt/amp*. (A) Imágenes representativas de IF de la co-tinción de endomucina y α SMA (arriba) y de endomucina y CD248 (abajo) en cortes de tumores RG1 GFP y RG1 TAU. Las flechas señalan células α SMA o CD248 positivas que se encuentran deslocalizadas de las células endoteliales. Barra de escala: 25 μ m. (B y C) Análisis de expresión mediante qRT-PCR de los marcadores específicos de pericitos en las células tumorales procedentes de tumores RG1 GFP y RG1 TAU (usando cebadores específicos de los genes humanos) (B) y en las células del huésped (usando cebadores específicos de los genes de ratón) (C). *HPRT* y *Actina* fueron utilizados respectivamente para la normalización de la expresión. (D) Análisis de expresión mediante qRT-PCR de los marcadores de pericitos en las células tumorales procedentes de tumores 12o150 GFP y TAU usando cebadores específicos de los genes humanos y *HPRT* como normalizador de la expresión. * p < 0,05, ** p < 0,01. n.s.: no significativo.

En paralelo detectamos una disminución en la aparición de hemorragias en los tumores RG1 TAU, evento que frecuentemente se observa en los tumores control RG1 GFP (**Figura 26A**) y generalmente en tumores *EGFR wt/amp* pero no en tumores con *EGFR mut* (datos no mostrados). También observamos que la sobre-expresión de Tau redujo la extravasación de IgG (**Figura 26B**) así como la producción de Angiopoyetina 2 (Ang2) (**Figura 26C**). Como consecuencia de esto último también se produjo un descenso significativo del ratio *Ang2/Ang1* (medido por qRT-PCR) (**Figura 26D**) el cual se utiliza como medida de la normalización de la vasculatura (Scholz et al., 2016). Con todo ello concluimos que en tumores *EGFR amp*, la sobre-expresión de Tau inhibe el proceso de transformación de las células tumorales a pericitos, que se encontraban normalmente deslocalizados del endotelio, consiguiéndose así una normalización de la vasculatura y una recuperación de la integridad de la BBB.

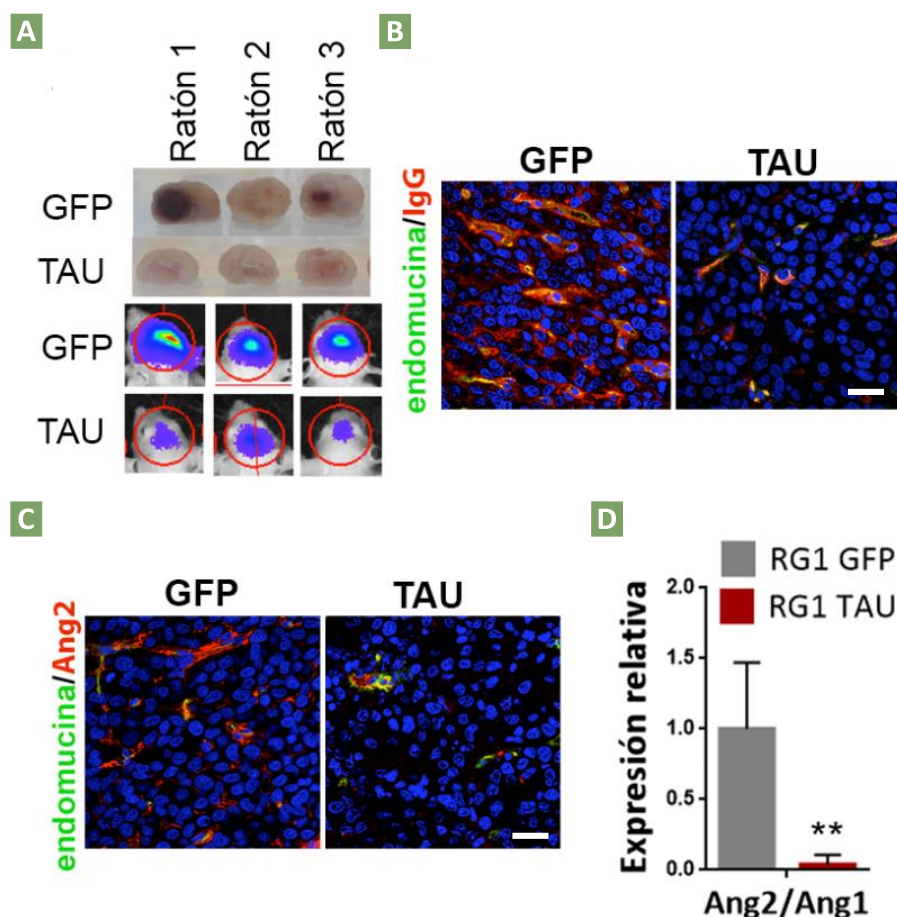


Figura 26. La sobre-expresión de Tau normaliza la vasculatura del tumor en gliomas *EGFR wt/amp*. (A) Imagen representativa de los tumores RG1 GFP y RG1 TAU tras la disección de los cerebros (Arriba) o antes del sacrificio (mediante la visualización de la Bioluminiscencia) (Abajo). (B y C) Imagen representativa de IF de la co-función de endomucina e IgG (B) y de endomucina y Ang2 (C) en cortes de tumores RG1 GFP y RG1 TAU. Barra de escala: 25 μm (D) Ratio de la expresión *Ang2/Ang1* medido por qRT-PCR en tumores RG1 GFP y RG1 TAU. Actina fue usada para normalizar la expresión. ** p < 0,01.

7.2. La inhibición del marcador pericítico CD248, genera el mismo efecto que Tau en gliomas *EGFR wt/amp*

Los resultados anteriores sugieren que los pericitos derivados del tumor (que en su mayoría se encuentran deslocalizados) tienen un importante papel en el desarrollo vascular de los tumores *EGFR wt/amp*. Con el fin de validar esta observación decidimos inhibir la formación de dichos pericitos de una manera alternativa, mediante la inhibición de la expresión del gen *CD248*. Elegimos dicha molécula por estar involucrada en la microvasculatura tumoral y por expresarse en vasos generados por tumores, especialmente en los gliomas (Cheng et al., 2013; Simonavicius et al., 2008). Además, existe una fuerte correlación inversa entre la expresión de *CD248* y la de *Tau/MAPT* en la cohorte del TCGA (**Figura 27A**). Dato que fue corroborado en nuestra propia cohorte de pacientes mediante qRT-PCR, detectándose unos niveles más bajos de *CD248* en los tumores con mayor expresión en *Tau* (**Figura 27B**).

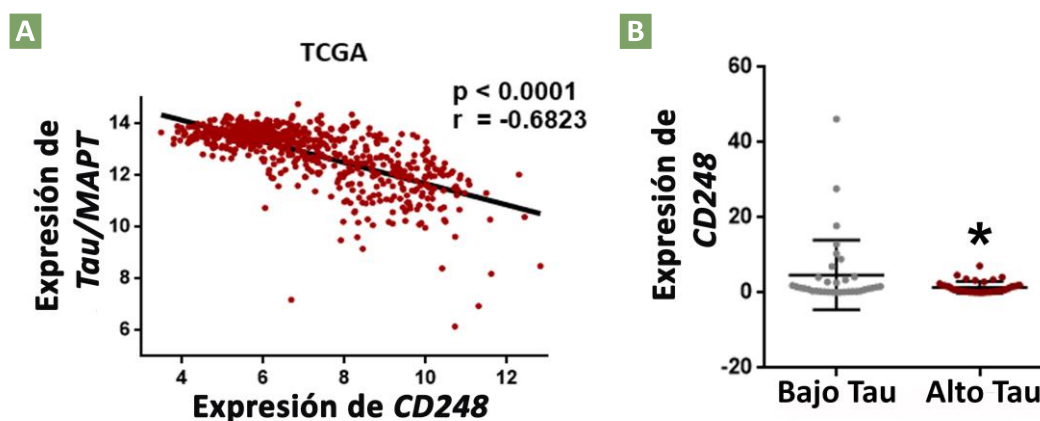


Figura 27. La expresión de *Tau/MAPT* muestra una correlación inversa con *CD248*, marcador de pericito tumoral. (A) Análisis de correlación entre la expresión de *Tau/MAPT* y la de *CD248* usando un dot-plot de dispersión para su representación. Datos del TCGA (Cohorte LGG+GBM, n=669). **(B)** Análisis de los niveles de expresión de *CD248* mediante qRT-PCR en nuestra propia cohorte de pacientes con gliomas (n=75) agrupados en función de la alta o baja expresión de *Tau/MAPT*, medido también por qRT-PCR. *HPRT* fue usado para la normalización de la expresión. * $p < 0,05$.

Así pues, inhibimos la expresión de *CD248* en la línea RG1 con diferentes secuencias de ARNsh con el objetivo de eliminar de manera específica los pericitos tumorales. En primer lugar, medimos mediante qRT-PCR los niveles de expresión de *CD248* (**Figura 28A**) y seleccionamos el ARNsh más efectivo (shCD248 21). Posteriormente inyectamos las células interferidas RG1 shcontrol y RG1 shCD248 21 en los cerebros de ratones inmunodeficientes, donde observamos un incremento significativo de la supervivencia tras la inhibición de *CD248* (**Figura 28B**). El

análisis molecular mediante qRT-PCR de los tumores generados mostró una reducción de la expresión de *CD248* y de otros marcadores periciticos (**Figura 28C**). Además, se observó una clara reducción de la extravasación de IgG (**Figura 28D**) así como del ratio *Ang2/Ang1* en los tumores sh*CD248* en comparación con los controles (**Figura 28E**), lo que sugiere que la eliminación de los pericitos tumorales genera una normalización de la vasculatura.

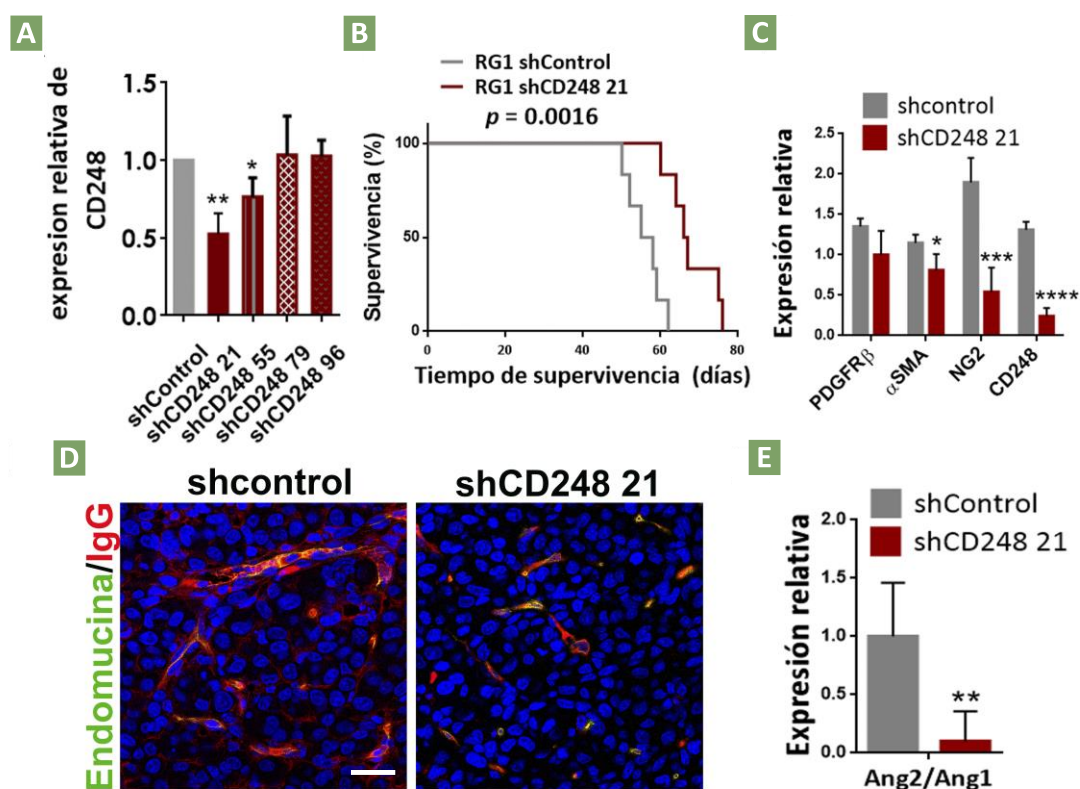


Figura 28. La inhibición de la expresión de *CD248* mediante ARNsh reduce la agresividad tumoral. **(A)** Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de *CD248* en la línea RG1 después de la infección con diferentes construcciones lentivirales que expresan ARNsh contra el gen *CD248* o ARNsh control. *HPRT* fue usado para la normalización de la expresión. **(B)** Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes a los que se les inyectó la línea celular RG1 infectada previamente con el ARNsh más efectivo (sh*CD248* 21) o con el ARNsh control (shControl) (n=6/condición). **(C)** Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de marcadores de pericitos en extractos de tumores RG1 shcontrol y sh*CD248* 21. *HPRT* fue usado para la normalización de la expresión. **(D)** Imagen representativa de IF de la co-función de endomucina e IgG en cortes de tumores RG1 shcontrol y sh*CD248* 21. Barra de escala: 25 μ m **(E)** Análisis del ratio de la expresión *Ang2/Ang1* en estos mismo extractos. Actina fue usado para la normalización de la expresión. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Estos resultados confirman que el comportamiento agresivo de los gliomas *EGFR amp* depende en parte de la presencia de los pericitos tumorales deslocalizados y de las anomalías vasculares que estos pericitos inducen. Al impedir la función de las células tumorales como pericito, ya sea por la sobre-expresión de Tau o por la inhibición de *CD248* en tumores *EGFRwt/amp*, se normaliza la vasculatura, se recupera la integridad de la BBB y, como consecuencia de todo ello, se desarrollan gliomas menos agresivos.

8. Tau normaliza la vasculatura bloqueando la capacidad mesenquimal de las células tumorales

8.1. Tau inhibe la capacidad mesenquimal de las células tumorales a través de la vía EGFR/NF- κ B/TAZ

Finalmente, nos propusimos entender el mecanismo a través del cual Tau impide el proceso de transformación de las células tumorales a pericitos. Es importante tener en cuenta que estas células tienen características mesenquimales (Bergers and Song, 2005), por ello nos planteamos la hipótesis de que Tau podría estar regulando la aparición de alguna de estas características a través del bloqueo de la actividad del receptor de EGF.

En primer lugar, realizamos un análisis bioinformático sobre la cohorte de GB del TCGA para observar la distribución de Tau en relación con diferentes perfiles de expresión asociados con los distintos subtipos del GB: el MES, el PN y el CL. El análisis de GSEA (del inglés "Gene Set Enrichment Analysis") mostró una fuerte correlación directa de la expresión de *Tau* con el subtipo PN y una correlación inversa con el subtipo MES (**Figura 29A**). También analizamos como se distribuían los niveles de *Tau* según la expresión de un conjunto de genes con funciones más específicas. Así observamos que la expresión de *Tau/MAPT* correlaciona de forma directa con la firma genética de la vía de PDGFR α , y de forma inversa con otras, como con la firma genética de la vía de NF- κ B. (**Figura 29B**), estrechamente asociada con la transición mesenquimal (Bhat et al., 2013) y cuya activación ha sido observada anteriormente en los GB (Nogueira et al., 2011).

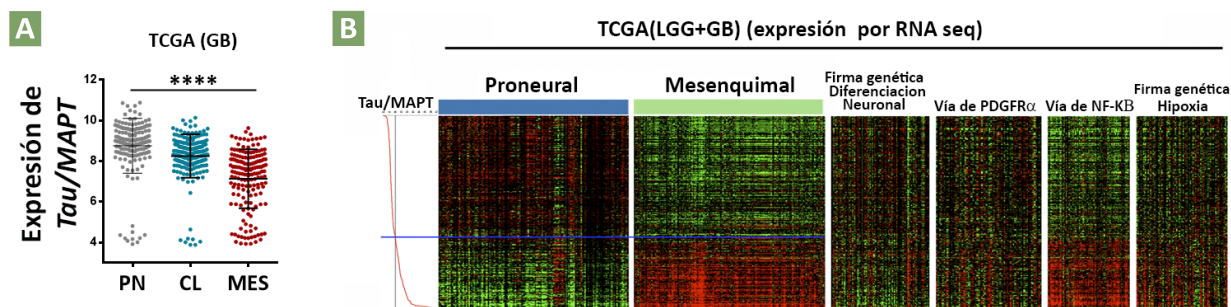


Figura 29. La expresión de *Tau* muestra una correlación inversa con el fenotipo mesenquimal en gliomas. (A) Análisis de los niveles expresión (mRNA) de *Tau/MAPT* en pacientes con GB del TCGA-GBM (RNA-seq) (n= 528) agrupados en función de los subtipos (PN: proneural, MES: mesenquimal y CL: clásico). **(B)** Mapa de calor de la expresión de genes agrupados en diferentes firmas genéticas (MES, PN, diferenciación neuronal, Vía de PDGFR α , vía de NF- κ B e hipoxia) en función de la expresión de *Tau/MAPT* en la cohorte de TCGA-LGG+GB RNA-seq (n=705) **** p< 0,0001.

Posteriormente, realizamos un análisis mediante qRT-PCR de los tumores RG1 GFP y RG1 TAU con el fin de caracterizar la expresión de diferentes genes que participan en el establecimiento del fenotipo MES. De todos ellos solo el gen *TAZ*, que es un regulador clave del proceso de mesenquimalización de los gliomas (Bhat et al., 2011), mostró una bajada de expresión en los tumores con sobre-expresión de *Tau* en comparación con los controles **(Figura 30A)**. Estos resultados podrían apoyar la idea de que *Tau* funciona como un inhibidor de la transformación mesenquimal de las células tumorales, bloqueando de manera específica el eje NF- κ B/*TAZ* (Bhat et al., 2013). Dichos datos fueron corroborados en los tumores RG1 GFP y RG1 TAU a nivel proteico mediante WB, en el que observamos como *Tau* provoca una inhibición de la fosforilación de EGFR junto a una fuerte disminución de la fosforilación de NF- κ B y de la expresión de *TAZ* **(Figura 30B)**. Es importante destacar que la sobre-expresión de *Tau* no afecta a ninguna de estas moléculas en tumores con mutación en EGFR (12O150), donde tampoco modifica los niveles de fosforilación del receptor **(Figura 30C)**.

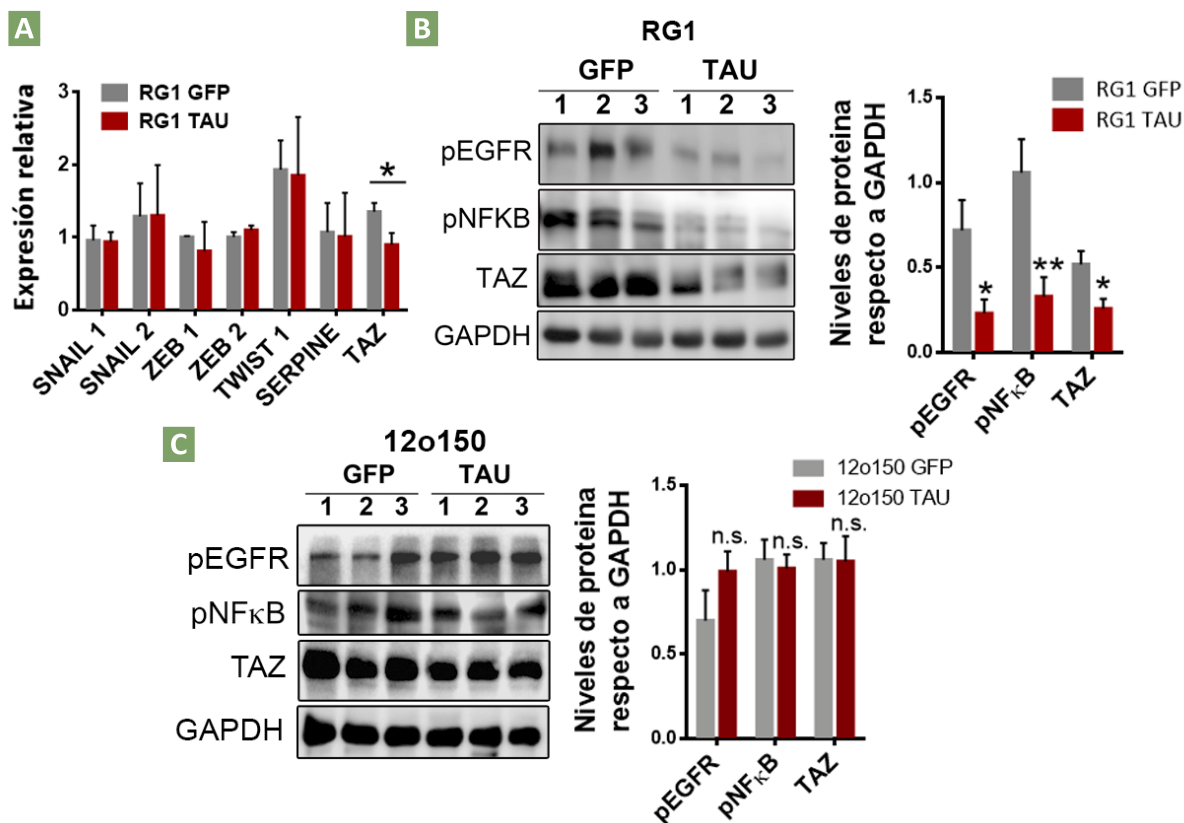


Figura 30. Tau bloquea el fenotipo mesenquimal en tumores EGFR amp/wt mediante la inhibición del eje EGFR/NF-κB/TAZ. (A) Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de genes implicados en el fenotipo MES en extractos de tumores RG1 GFP y RG1 TAU. **(B y C)** Análisis por WB y cuantificación de p-EGFR, p-NF-κβ (p65) y TAZ en extractos de tumores RG1 GFP y TAU (B) y 12o150 (C) GFP y TAU. GAPDH fue usado como control. * p < 0,05, ** p < 0,01. n.s.: no significativo.

La inhibición del fenotipo MES observado en los tumores que sobre-expresan Tau está acompañada por una fuerte inducción de la expresión de *OLIG2* (**Figura 31A**), un factor de transcripción que se usa con frecuencia como un marcador del fenotipo PN (Leelatian and Ihrie, 2016). Este dato se obtuvo mediante un análisis de expresión por qRT-PCR de los tumores RG1 GFP y RG1 TAU, que fue confirmado mediante IF en los cortes histológicos. En dichas tinciones observamos que la sobre-expresión de Tau reprime la expresión nuclear de TAZ a la par que induce la expresión nuclear de *OLIG2* en las células tumorales, mostrando el cambio de fenotipo MES a PN (**Figura 31B**). Esta correlación directa entre *Tau/MAPT* y *OLIG2* y la inversa entre *Tau/MAPT* y TAZ fueron confirmadas tanto *in silico* sobre la base de datos del TCGA, como por qRT-PCR con los datos de nuestra propia cohorte de pacientes (**Figura 31C y 31D**).

En conjunto, nuestros resultados indican que la sobre-expresión de Tau, en tumores *EGFR* amplificados, induce un cambio en el fenotipo del glioma, reprimiendo los reguladores mesenquimales e induciendo los proneurales en las propias células tumorales, todo ello a través de la regulación de la vía EGFR/NF-κβ-TAZ.

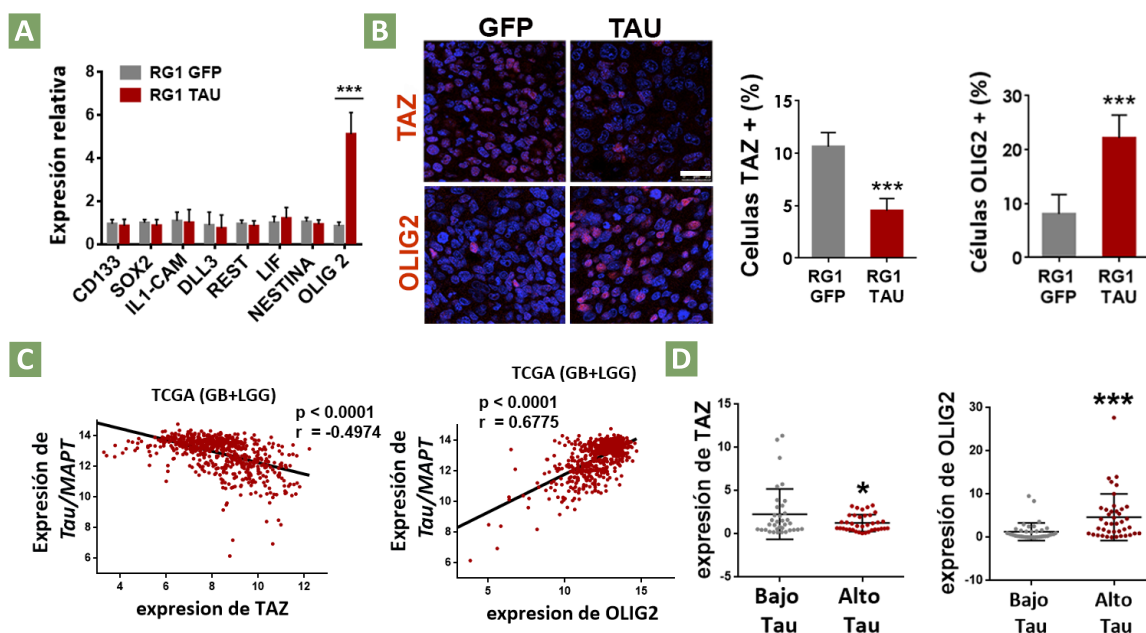


Figura 31. La sobre-expresión de Tau induce un cambio de fenotipo en los gliomas *EGFR amp*, reprimiendo el fenotipo mesenquimal e induciendo el proneural. (A) Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de genes implicados en el fenotipo PN en extractos de tumores RG1 GFP y RG1 TAU. *HPRT* fue usada para la normalización de la expresión. **(B)** Imágenes representativas de IF de TAZ (arriba) y OLIG2 (abajo) en cortes de tejido RG1 GFP y RG1 TAU, y su cuantificación (células positivas (%)/campo). Barra de escala: 25 μ m **(C)** Análisis de correlación entre la expresión de *Tau/MAPT* y la de *TAZ* y entre la expresión de *Tau/MAPT* y la de *Olig2*, representado mediante dot-plot de dispersión usando los datos del TCGA LGG+GB, n=669. **(D)** Análisis de los niveles de expresión de *TAZ* y *Olig2* mediante qRT-PCR en nuestra propia cohorte de pacientes (n=72) agrupados en función de la alta o baja expresión de *Tau/MAPT*, medido también por qRT-PCR. *HPRT* fue usada para la normalización de la expresión. * p < 0,05, *** p < 0,001.

De manera adicional, para reforzar la función de Tau como inhibidor del fenotipo MES, analizamos “la capacidad iniciadora de tumor”, que está estrechamente asociada a las características mesenquimales de las células tumorales. Para ello realizamos un ensayo de iniciación de tumores con diluciones límite de las células RG1 GFP y RG1 TAU. Tal y como esperábamos, la sobre-expresión de Tau redujo el número de tumores generados en todas las concentraciones utilizadas **(Figura 32A y 32B)**

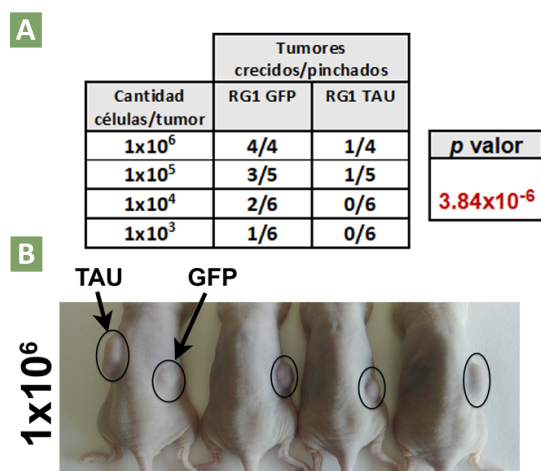


Figura 32. La sobre-expresión de Tau inhibe la capacidad iniciadora de tumores. (A) Análisis estadístico del ensayo de crecimiento tumoral subcutáneo tras la inyección de la línea RG1 GFP Y RG1 TAU a diferentes diluciones en los flancos de ratones inmunodeficientes. **(B)** Imagen representativa de los ratones del ensayo A.

8.2. La inhibición de la capacidad mesenquimal de las células tumorales impide su transformación a pericito

Para corroborar la asociación entre la capacidad mesenquimal que tienen las células tumorales y la adquisición de las propiedades y funciones del pericito, decidimos estudiar la asociación del gen *TAZ* (como regulador clave del fenotipo MES) con la vasculatura. En primer lugar, analizamos los procesos biológicos asociados a 500 genes que correlacionan en expresión con *TAZ* en gliomas, utilizando el software “DAVID gene ontology”. Sorprendentemente, los procesos biológicos más relevantes asociados a la expresión de *TAZ* fueron los implicados en angiogénesis, matriz extracelular y morfogénesis de vasos sanguíneos (**Figura 33A**). De acuerdo con esto, un análisis de expresión *in silico* de diferentes firmas genéticas relacionados con angiogénesis, reveló diferencias muy significativas entre gliomas con alta y baja expresión de *TAZ* (**Figura 33B**), lo que refuerza la implicación del factor transcripcional *TAZ* en el control de la vasculatura y la angiogénesis en los gliomas, resultado que concuerda con lo descrito por otros autores (Bhat et al., 2011).

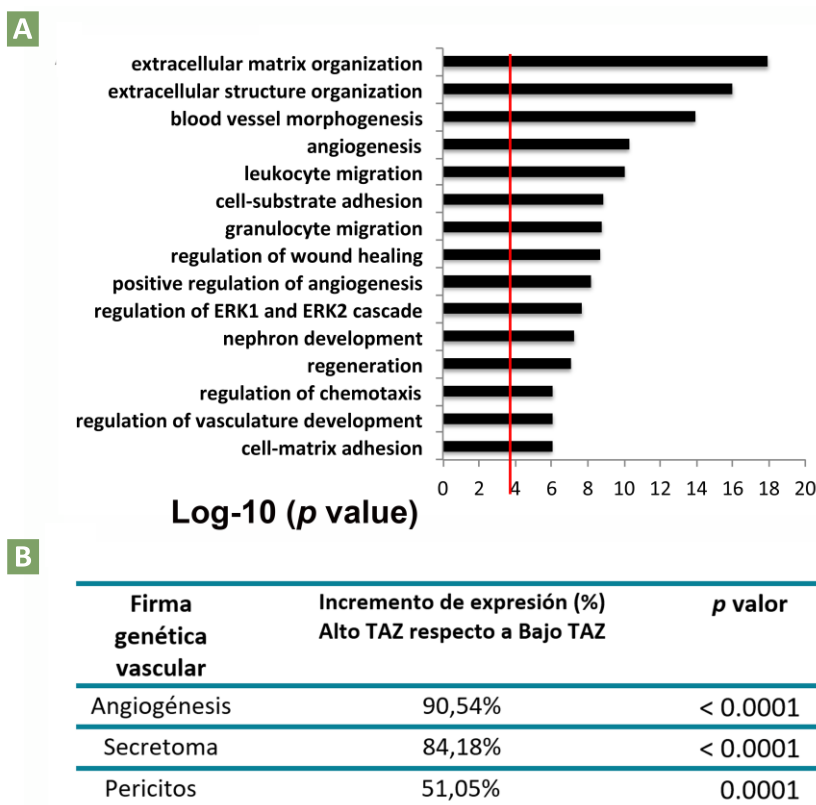


Figura 33. Implicación de TAZ en el control de la vasculatura tumoral. (A) Procesos biológicos asociados con la funcionalidad de TAZ obtenidos mediante el análisis de los 500 genes que correlación en expresión con TAZ usando los datos del TCGA-LGG+GB y analizado con el programa “DAVID Gene ontology”. **(B)** Incremento de los niveles de expresión (%) de los genes incluidos en diferentes firmas genéticas asociadas a la vasculatura del glioma sobre la cohorte de TCGA LGG+GB divididos en función de la alta o baja expresión de TAZ.

Seguidamente, para confirmar la implicación de la transformación mesenquimal en la vasculatura, inhibimos la expresión de TAZ en la línea RG1 e inyectamos las células interferidas en los cerebros de ratones inmunodeficientes. Así, observamos una reducción significativa del crecimiento de los tumores RG1 shTAZ frente a los controles (**Figura 34A**). El análisis molecular mediante qRT-PCR de estos tumores mostró una reducción de la expresión de todos los marcadores de pericitos (**Figura 34B**), además de verse reducida la relación *Ang2/Ang1* (**Figura 34C**), confirmándose así que la inhibición de la capacidad mesenquimal de las células tumorales reduce su transformación a pericitos, viéndose afectada por tanto la vasculatura.

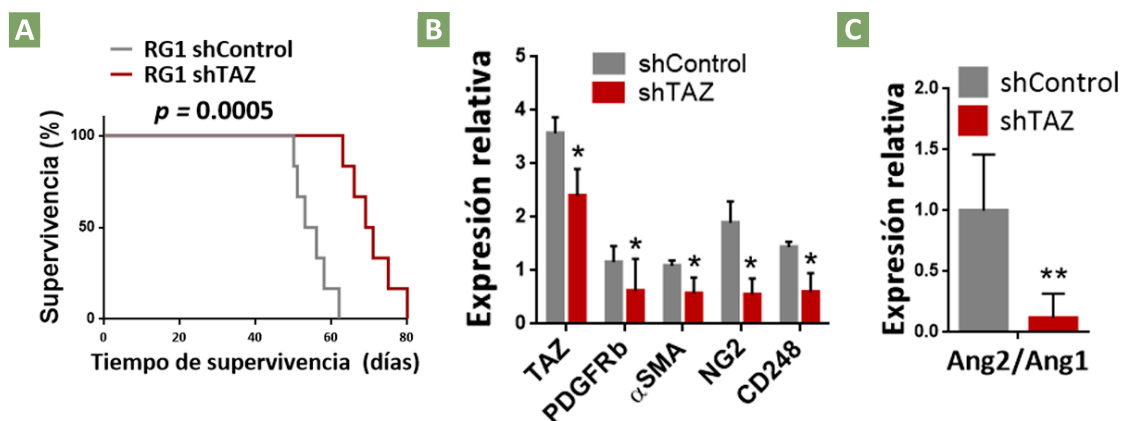


Figura 34. La inhibición de TAZ genera tumores menos agresivos al inhibir la capacidad angiogénica y vascular del glioma. (A) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inmunodeficientes en los que se les inyectó células RG1 infectadas previamente con construcciones lentivirales que expresan un ARNsh contra TAZ (shTAZ) o un ARNsh control (shcontrol) (n=6/condición). En el extracto de tumores RG1 shcontrol y RG1 shTAZ, se analizaron los niveles de expresión mediante qRT-PCR de los marcadores específicos de pericitos **(B)**, así como el ratio de la expresión *Ang2/Ang1* **(C)**. *HPRT* fue usado para la normalización de la expresión. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

9. Validación de los resultados en muestras de pacientes con glioma

En conjunto nuestros resultados nos permiten proponer que el estatus genético y transcriptómico del eje IDH-Tau-EGFR determina la capacidad de las células tumorales para funcionar como pericitos, controlando el fenotipo vascular del glioma. Con el fin de analizar la traslación de este modelo a la clínica decidimos utilizar una cohorte de muestras de pacientes, caracterizados previamente a nivel de expresión génica y mutacional. Esto nos permitió clasificar las muestras en tres grupos: tumores *IDH mut*, tumores *IDH wt-EGFR wt/amp* y tumores *IDH wt-EGFR mut*. En primer lugar, evaluamos la expresión de *Tau/MAPT* **(Figura 35A)** mediante qRT-PCR, observándose altos niveles transcripcionales en gliomas *IDH mut*, niveles intermedios en gliomas *IDH wt-EGFR wt/amp* y una baja expresión en gliomas *IDH wt-EGFR mut*. Posteriormente evaluamos la expresión de dos marcadores vasculares, *CD248* **(Figura 35B)**, de pericito tumoral y *CD34* **(Figura 35C)**, de endotelio. Ambos aumentan de manera gradual a medida que disminuye la expresión de *Tau*, lo que correlaciona con los resultados obtenidos en los modelos murinos y PDX, donde *Tau* inhibe la agresividad tumoral inhibiendo la vasculatura. Es importante destacar que dentro de los gliomas *IDH wt* los tumores que presentan mutaciones en *EGFR* tienen mayor expresión de ambos marcadores vasculares que los tumores *EGFR wt/amp* (Figura 35B y 35C).

A continuación, analizamos a nivel histológico mediante IHQ (**Figura 35D**) la vasculatura de estos tumores. La cuantificación de la densidad vascular (**Figura 35E**) utilizando CD34 mostró un aumento gradual a medida que aumenta la agresividad del tumor (Michaelsen et al., 2018). Además, la presencia de vasos dilatados fue mucho mayor en tumores *EGFR mut* que en los otros dos grupos de gliomas (**Figura 35F**), lo que sugiere que esta estructura vascular es específica de este tipo de gliomas, tal y como habíamos observado en los xenografts y aloinjertos. Asimismo, también comprobamos que los tumores con mayor expresión de Tau (los gliomas *IDH mut*) muestran menos pericitos CD248 positivos que el resto de gliomas (Figura 35D).

Por otro lado, respecto al estatus de *EGFR*, hemos correlacionando en los pacientes con gliomas *EGFR mut* el aumento de la cantidad de los pericitos (Figura 35C) y la efectividad del reclutamiento de estos al vaso (Figura 35D), que sin embargo aparecen deslocalizados en algunas muestras de gliomas *EGFR wt*. En relación a esto, también observamos un claro aumento de la expresión de *CXCR4* y *CX45* en los tumores *EGFR mut* con respecto al resto de gliomas (**Figura 35G y 35H**). Este dato, junto a la activación específica de p-PDGFR β (**Figura 35I**), reafirma nuestra hipótesis de que las mutaciones de *EGFR* inducen una mayor agresividad de los gliomas a través de cambios vasculares, en concreto a través de cambios en la presencia y funcionalidad de los pericitos tumorales.

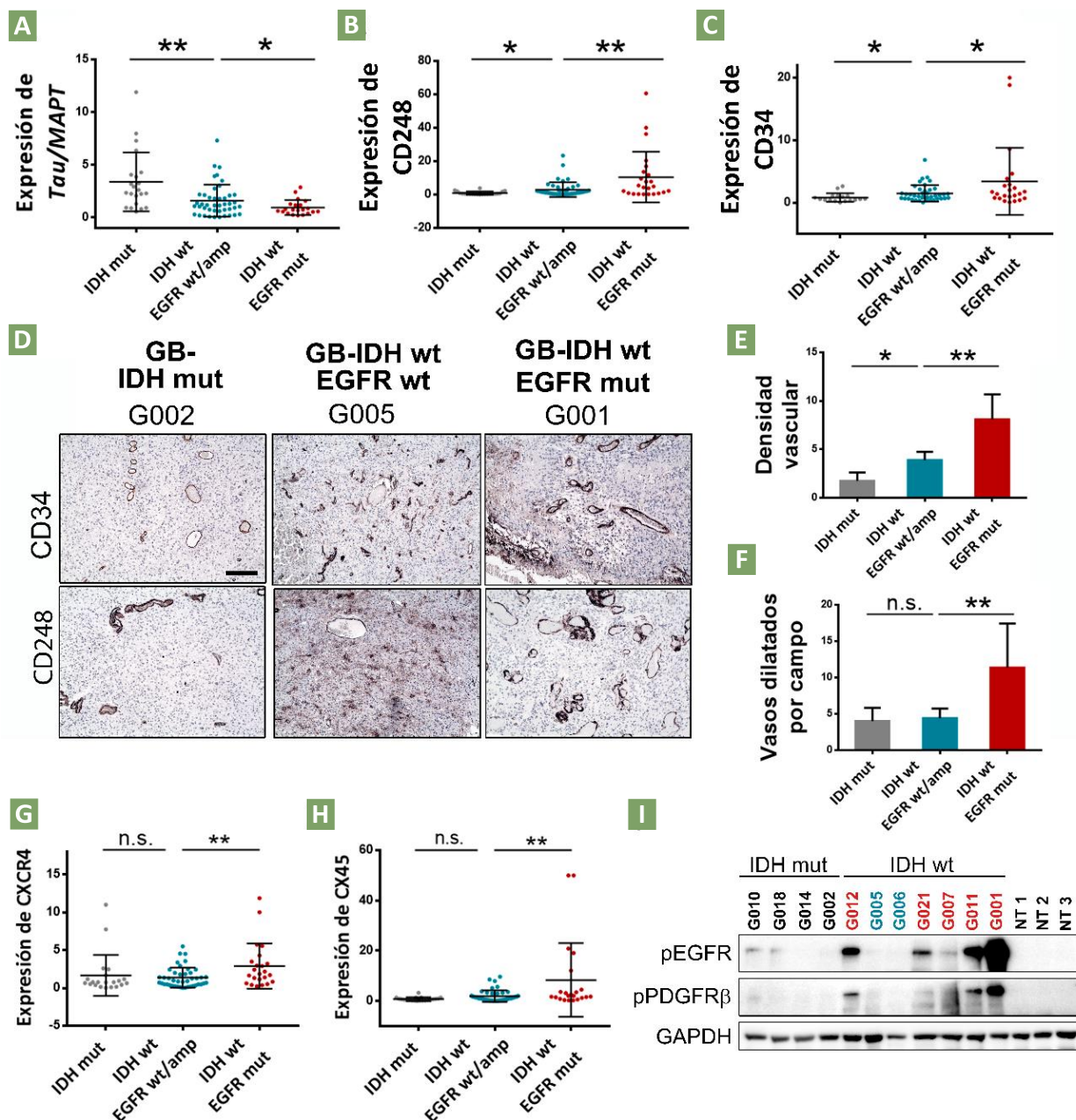
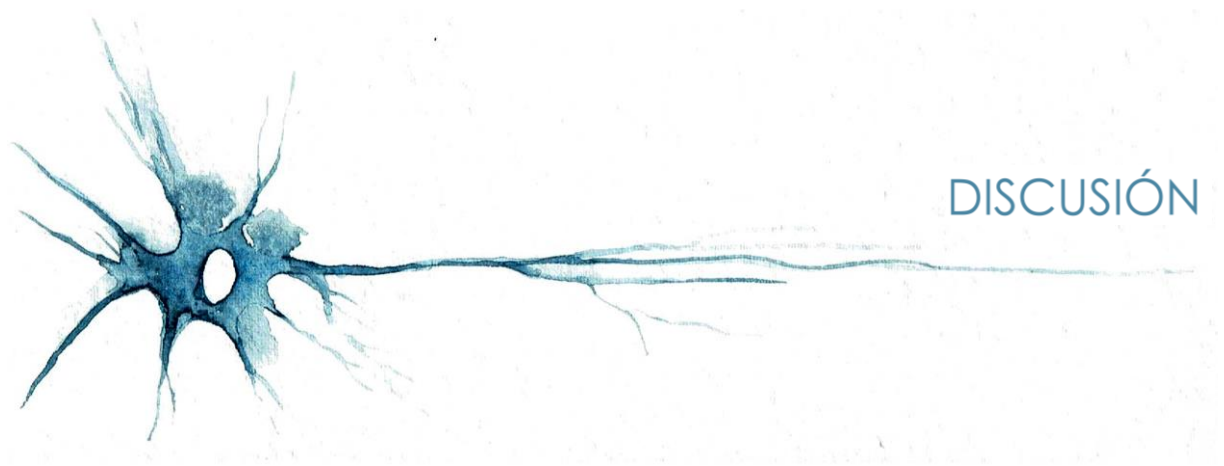


Figura 35. Traslación de los modelos vasculares en función de IDH-Tau-EGFR en muestras de pacientes. Pacientes estratificados en función del estatus de EGFR e IDH en tres subgrupos: tumores IDH mut, tumores IDH wt-EGFR wt/amp y tumores IDH wt-EGFR mut. **(A, B y C)** Análisis de los niveles de expresión mediante qRT-PCR de Tau (A), CD248 (B) y CD34 (D) en el extracto de tumores de pacientes. HPRT fue usado para la normalización de la expresión. **(D)** Imágenes representativas de IHC de CD34 (arriba) y CD248 (abajo) en muestras de pacientes de los tres subgrupos. Barra de escala: 100 µm. **(E)** Cuantificación de la densidad vascular utilizando CD34 como marcador **(F)** Cuantificación del número de vasos dilatados por campo utilizando CD34 como marcador **(G y H)** Análisis de los niveles de expresión mediante qRT-PCR de CXCR4 (G) y CX45 (H). HPRT usado para la normalización de la expresión **(I)** Análisis por WB de la señalización de p-EGFR y p-PDGFRβ en el extracto de tejido de los pacientes. GAPDH fue utilizada como normalizador de la expresión. *p < 0,05, **p < 0,01, n.s.: no significativo.



DISCUSIÓN

1. *IDH* y gliomas. Regulación epigenética de la expresión de *Tau*

En los últimos años se han realizado números estudios para caracterizar los gliomas a nivel molecular. Esto ha permitido la incorporación de algunos parámetros a la clasificación de la OMS y a la rutina del diagnóstico histopatológico (Louis et al., 2016). Entre ellos cabe destacar la detección de las mutaciones en los genes *IDH1/2* como marcadores de un grupo de gliomas con mejor pronóstico (Yan et al., 2009). Es interesante destacar que los modelos de glioma en ratón han demostrado que los tumores que expresan formas mutadas de *IDH* son menos agresivos (Amankulor et al., 2017), aunque no se conoce bien cuál es el mecanismo subyacente. De hecho, nosotros hemos tenido un resultado similar al sobre-expresar *IDH1 mut* en una línea primaria de GB y comprobar que favorece la supervivencia de los animales.

Una de las principales funciones oncogénicas de *IDH* mutante está asociada a su capacidad para transformar el metabolito α -KG en 2-HG, mediante una reducción dependiente de NADPH. El cambio en la concentración de ambos metabolitos provoca la inhibición de las demetilinasas TET, incrementando la metilación de las zonas CpG del ADN. Esto altera la conformación de la cromatina y provoca la inhibición de determinados factores de transcripción implicados en la diferenciación celular (Bardella et al., 2016; Lu et al., 2012). Aunque la hipermetilación del ADN se ha asociado normalmente con la inactivación de la expresión génica, se ha demostrado recientemente que la mutación de *IDH* en gliomas favorece la expresión de algunos genes como *PDGFR α* (Flavahan et al., 2016) o los que codifican enzimas reparadoras de daño en el ADN (Nunez et al., 2019). Uno de los mecanismos por los cuales *IDH* mutante induce la expresión génica se basa en impedir la formación de una estructura de la cromatina que es represora de la transcripción, el llamado “insulator”. Dicha estructura se caracteriza por la presencia de “loops” en el ADN donde se une el factor de transcripción CTCF, encargado de reprimir la expresión al mantener separada la secuencia reguladora o “enhancer” del promotor del gen (**Figura D1**). **Nuestros resultados indican que la expresión de *Tau* es mayor en aquellos gliomas que expresan mutaciones en *IDH*. Asimismo, hemos podido comprobar que el mecanismo de inducción transcripcional del gen de *Tau* por *IDH mut* es similar al descrito para *PDGFR α* . Así, hemos identificado que la inducción de la metilación en la isla CpG-26, dentro de la región promotora de *Tau/MAPT*, impide la unión de CTCF y la formación de las estructuras represoras, permitiendo así la expresión del gen.**

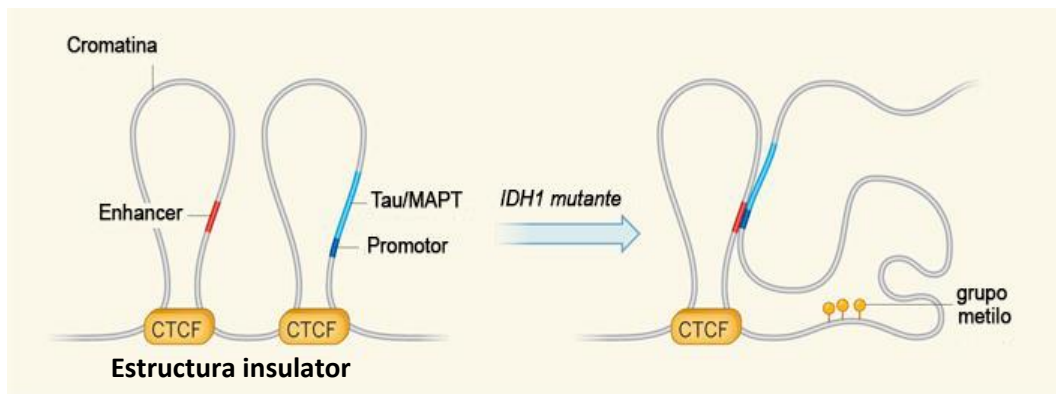


Figura D1. La hipermetilación del ADN generado por *IDH* mutante impide la formación de la estructura represora de la transcripción (estructura "insulator"), induciendo así la expresión génica de determinados genes como *Tau/MAPT*. (Figura adaptada de Grimmer MR et al., 2016)

Aparte de la ganancia de función oncogénica debido a las mutaciones en *IDH* se ha propuesto que podría existir una pérdida de función de la proteína wt. Se ha observado por ejemplo que la proteína mutante tiene una capacidad muy reducida para producir NADPH en comparación con *IDH* wt. Este defecto en la capacidad reductora de la célula podría sensibilizar a las células de GB frente al estrés oxidativo inducido por la radiación y/o la quimioterapia (Bleeker et al., 2010). Además, este efecto metabólico podría explicar la elevada toxicidad de la depleción de NAD⁺ en los tumores (no solo gliomas) mutantes para *IDH1* (Tateishi et al., 2015). Asimismo, se ha demostrado recientemente que la inhibición genética o farmacológica de la enzima *IDH* wt reduce los niveles de α -KG y NADPH, generando unos efectos metabólicos y de metilación del ADN similares a los de la proteína mutante (Calvert et al., 2017). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados sugieren que la expresión de *Tau*, no solo se induce por la presencia de *IDH* mut, sino que correlacionan de forma inversa con los niveles transcripcionales de *IDH* wt. **Estos resultados nos permiten hipotetizar que los niveles y el estatus genético de *IDH* es lo que determina la activación del promotor del gen de *Tau*. Asimismo, los datos aquí presentados sugieren que *Tau* podría participar en la inhibición de la agresividad tumoral subyacente a la mutación de *IDH* o a la presencia de niveles más bajos de *IDH* wt.**

2. Tau y EGFR

Nuestros primeros resultados acerca del mecanismo de acción de Tau en gliomas indican que su expresión tiene un efecto inhibitorio sobre la vía de señalización de EGFR. Este efecto solo se da en tumores con sobre-expresión de la forma wt del receptor, siendo resistentes a Tau los tumores que expresan mutaciones puntuales o la isoforma VIII de EGFR. Es interesante destacar, en relación a este dato, que nuestro análisis bioinformático mostró que las mutaciones en IDH, junto a una alta expresión de Tau, tienen una distribución mutuamente excluyente con las mutaciones en EGFR en muestras de pacientes con glioma, lo que refuerza que Tau no tiene ninguna función en dichos tumores. Sin embargo, existe un grupo de tumores que presentan de manera conjunta mutaciones en IDH y amplificaciones del receptor. Además, se ha demostrado que el receptor de EGF se sobre-expresa incluso en ausencia de la amplificación génica (Reifenberger et al., 1996). Estos datos sugieren que **la expresión de Tau podría ser relevante en un grupo numeroso de gliomas, donde controlaría la agresividad tumoral mediante la regulación de la señalización de EGFR**. En concreto, nuestros resultados sugieren que la estabilización de los microtúbulos podría ser el mecanismo a través del cual se produce dicha inhibición, ya que fuimos capaces de reproducir el bloqueo de EGFR en presencia de un compuesto como el EpoD. Dicha molécula pertenece a la familia de los taxanos, que compiten con Tau por los mismos sitios de unión a los microtúbulos y los estabilizan. Estas moléculas se utilizan como agentes quimioterapéuticos para diferentes cánceres, sobre todo el Paclitaxel (Taxol) o el docetaxel (Taxodere), aunque tienen el hándicap de que no atraviesan la BBB. Sin embargo, se ha demostrado que EpoD es capaz de llegar al cerebro y reducir la patología del Alzheimer en modelos de ratón (Zhang et al., 2012a). Nosotros hemos demostrado que **el tratamiento sistémico con EpoD de ratones con gliomas genera un efecto en la supervivencia similar al generado por la sobre-expresión de Tau, sin ningún efecto secundario aparente. Además, hemos corroborado que el tratamiento con EpoD reduce claramente la fosforilación de EGFR**, lo que sugiere que es la regulación de la dinámica de los microtúbulos lo que está afectando a la señalización del receptor. De hecho, esta regulación es clave para el tráfico vesicular, que modula tanto la señalización de los RTK (como EGFR), como su reciclaje y degradación. Además, el tráfico vesicular también regula la actividad de diferentes fosfatasa como PTEN e INPP4B (del inglés, *Inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B*) (Li Chew et al., 2015; Naguib et al., 2015). En este sentido, se ha demostrado recientemente en otro tipo de cánceres que la estabilización de los microtúbulos puede inactivar al receptor de EGFR (Wu et al., 2013), así como alterar el tráfico endocítico (Li et al., 2012) o activar proteínas tirosina fosfatasa que impiden la activación del receptor (Wu et al., 2013). Experimentos futuros podrán servir para caracterizar en detalle esta regulación. En cualquier caso, nuestros resultados permiten proponer una nueva aplicación de los compuestos que ya se están analizando en terapias frente a

Alzheimer u otras Tautopatías como agentes anti-cancerígenos. De hecho, el Cabazitaxel, otro derivado del taxol que tiene actividad anti-tumoral en gliomas (Semiond et al., 2013) está siendo evaluado en un ensayo fase II para gliomas refractarios a TMZ, solo o en combinación con cisplatino (NCT01740570, NCT01866449).

3. EGFR y vasculatura

Las propiedades tumorigénicas de EGFR son muy variadas e incluyen funciones de célula autónoma, como aumento de la capacidad de proliferación o de migración de las células tumorales, y otras de célula no autónoma, regulando el microambiente tumoral. En este sentido, existen un gran número de estudios en glioma, especialmente relacionados con la isoforma VIII, que revelan diversos mecanismos por los que la activación de la vía de señalización de EGFR modifica el microambiente de la célula tumoral, incluyendo la vasculatura, aunque aún no están bien caracterizados (Zahonero and Sanchez-Gomez, 2014). Tampoco está del todo claro si estas funciones son reguladas de manera diferencial por la sobre-expresión de la forma wt o la sobre-expresión de las formas mutantes de EGFR, aunque se ha propuesto que lo primero estaría más relacionado con el comportamiento invasivo y lo segundo con la capacidad angiogénica (Eskilsson et al., 2016; Talasila et al., 2013). Estos datos estarían de acuerdo con nuestros resultados en el modelo de glioma murino (SVZ EGFR wt vs SVZ EGFR VIII), que tiene la ventaja de depender mayoritariamente de EGFR. Nosotros hemos observado que **los tumores que expresan EGFR VIII están mucho más vascularizados que los que expresan EGFR wt, lo que facilita su crecimiento compacto y proliferativo. Además, los tumores SVZ EGFR VIII presentan una estructura vascular diferencial caracterizada por vasos con mayor lumen**, a los que comúnmente se les denomina vasos dilatados. Anteriormente se había descrito una mayor área vascular en los tumores EGFR VIII, aunque se había asociado simplemente con una mayor capacidad de secreción de moléculas angiogénicas en presencia de esta mutación (Eskilsson et al., 2016; Katanasaka et al., 2013). Nuestros estudios *in silico*, validados con nuestro modelo murino, también sugieren que existe una mayor expresión de moléculas pro-angiogénicas en tumores *EGFR mut*. Sin embargo, las diferencias más notables las observamos en relación a la función de los pericitos, los cuales confieren una mayor robustez a los vasos en los tumores SVZ EGFR VIII frente a los SVZ EGFR wt. Esto podría explicar que exista muy poca rotura de vasos en los gliomas *EGFR mut*. Esta relación entre EGFR y los pericitos en gliomas no ha sido descrita anteriormente. De hecho, algunos autores han especulado que los tumores generados por el xenoinjerto de células humanas expresando EGFR VIII tienen una mayor permeabilidad vascular que los que expresan EGFR wt, aunque esto no ha sido estudiado en profundidad (Katanasaka et al., 2013). Además, también se ha descrito que pacientes con mutación en *EGFR* presentan mayor captación de

contraste en MRI, lo cual se ha asociado a la implicación de EGFR mut en los procesos angiogénicos. Una mayor cantidad de vasos iría asociado a un aumento del volumen y del flujo sanguíneo cerebral, parámetros que quedarían reflejados en las imágenes de MRI (Arevalo-Perez et al., 2016; Kickingereeder et al., 2016). Nuestro estudio comparativo de las imágenes de resonancia de tumores SVZ EGFR wt y SVZ EGFR vlll muestra una captación similar de Gd a tiempos cortos. Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo tras la inyección del agente de contraste, la captación de los tumores SVZ EGFR wt aumenta intensamente mientras que la de los tumores EGFR vlll disminuye. Estos resultados en conjunto nos llevan a hipotetizar que en las secuencias convencionales de MRI, que se toman a tiempos cortos, la captación de Gd podría ser mayor en tumores EGFR mutantes debido a la existencia de un mayor flujo sanguíneo. Sin embargo, a tiempos más largos tras la inyección de Gd, los tumores EGFR wt presentarían una mayor captación, como reflejo de una mayor rotura vascular. Sin embargo, este tipo de estudios tan largos serían inviables a día de hoy en la práctica clínica.

4. Papel de los pericitos tumorales en gliomas. Regulación por EGFR

Respecto al proceso de neo-vascularización tumoral, cabe destacar el papel de los pericitos, ya que regulan tanto el desarrollo como el mantenimiento de los vasos. En condiciones fisiológicas los pericitos actúan como células murales pegadas estrechamente a la pared de los vasos generando una estructura de soporte y protección. Sin embargo, en condiciones tumorales dichos pericitos, además de generar la estabilidad del vaso, pueden adquirir diversas funciones angiogénicas, llegando a estar implicadas incluso en el crecimiento y la proliferación vascular (Armulik et al., 2011). Existe cierta controversia con respecto a la funcionalidad de los pericitos en condiciones tumorales debido a su gran capacidad para adaptarse al microambiente y adquirir diferentes funciones e incluso diferentes localizaciones (Attwell et al., 2016). A día de hoy, el establecimiento del papel de los pericitos en el cáncer sigue siendo un desafío, por ello la necesidad de estudios que caractericen su heterogeneidad, determinando los diferentes subtipos de pericitos con marcadores de expresión diferenciales y con funciones específicas. Además, hasta hace unos años se creía que en situaciones tumorales los pericitos procedían de progenitores del propio tejido sano o de células derivadas de la médula ósea que extravasaban al tejido tumoral (De Palma et al., 2008; Du et al., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que una alta proporción de estos pericitos son derivados de las propias células tumorales en el caso de los GB (Cheng et al., 2013). Esto sugiere que el propio tumor puede gobernar el desarrollo vascular y por consecuencia el microambiente, fomentando el crecimiento de tumores altamente

agresivos. Sin embargo, hasta la fecha se desconocía si las alteraciones genéticas presentes en las células de gliomas podrían afectar de manera diferencial a este proceso de generación de pericitos tumorales. **En este trabajo hemos demostrado que la habilidad de la célula tumoral para trans-diferenciarse a pericito está gobernada por la actividad de EGFR y que, además, en presencia de mutaciones en dicho receptor, la capacidad del pericito tumoral para unirse estrechamente al vaso está incrementada.** Esto, unido a la mayor capacidad angiogénica de las células tumorales que expresan EGFR mut, indica que las mutaciones en este receptor incrementan de una manera global la capacidad vascular de los gliomas.

Recientemente se ha demostrado que el reclutamiento de los pericitos al endotelio está mediado por la interacción SDF-1/CXCR4. La célula endotelial, tanto del cerebro sano como del glioma, expresa SDF-1, formando un gradiente quimio-atrayente que recluta células periciticas, que expresan el receptor CXCR4 (Ehtesham et al., 2009; Folkins et al., 2009; Kokovay et al., 2010; Song et al., 2009). CXCR4 es precisamente uno de los genes que se encuentran sobre-expresados de manera diferencial en las células tumorales en presencia de EGFR mutante, por lo que podría participar en la migración de dichas células hacia el endotelio **(Figura D2)**. Asimismo, la elevada expresión de CX45 en las células con EGFR mutante podría participar en la unión directa entre el endotelio y el pericito, así como favorecer el intercambio de metabolitos y activar diferentes vías de señalización entre ambas células **(Figura D2)**. Esto último podría explicar la mayor activación de PDGFR β en las células *EGFR mut* (Kopanic et al., 2014). De la misma manera, la falta de expresión de CXCR4 y CX45 en las células tumorales *EGFR wt/amp* podría explicar su menor afinidad por las células endoteliales y el que aparezcan con frecuencia deslocalizadas. A pesar de ello, no podemos descartar que otras moléculas, expresadas diferencialmente en los tumores con amplificación de *EGFR*, puedan contribuir activamente a la deslocalización de los pericitos en dichos gliomas.

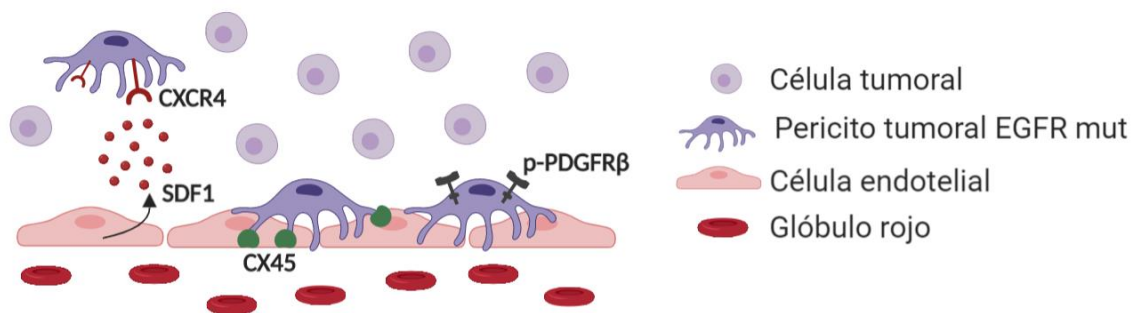


Figura D2. Esquema ilustrativo de la función pericitica de las células tumorales con presencia de mutación en EGFR.

La activación de PDGFR β ocurre de manera específica en las células periciticas ubicadas alrededor del endotelio. Esta activación es crucial para la unión de dichas células a la pared del vaso y también para generar las señales adecuadas de maduración y proliferación vascular (Abramsson et al., 2003). El hecho de que haya una clara activación de PDGFR β en los tumores *EGFR mut* contradice algunos datos de la literatura que sugieren que la señalización mediada por EGFR vIII inhibe la transcripción de *PDGFR β* (Akhavan et al., 2013). Sin embargo, a diferencia de lo descrito por dichos autores, nosotros hemos podido comprobar que la activación de PDGFR β es necesaria para el crecimiento tumoral de los gliomas que expresan EGFR vIII, ya que el tratamiento del tumor con sunitinib produjo un aumento significativo en la supervivencia de los animales que portan dichos tumores.

En resumen, nuestro trabajo apoya la teoría de que los distintos perfiles genéticos de los gliomas pueden determinar la capacidad de las células tumorales para trans-diferenciarse a pericitos, así como la funcionalidad de los mismos, controlando por tanto el proceso general de neo-vascularización. Las células con mutaciones en EGFR generan pericitos que interaccionan directamente con la vasculatura, dando una buena estructuración a los vasos. Por otro lado, las células con amplificación en EGFR *wt* generan pericitos que no son capaces de estructurar vasos sólidos, favoreciendo la rotura de la BBB.

El mecanismo vascular asociado a las mutaciones en *EGFR* podría dar una explicación adicional al aumento de la agresividad de este tipo de tumores. Además, dicha estructura vascular caracterizada por uniones celulares estrechas entre las células endoteliales y los pericitos restringe el paso de moléculas ((Tietz and Engelhardt, 2015), lo que podría ser un obstáculo para la administración de fármacos. Esto podría explicar la mayor resistencia a terapias tradicionales de los gliomas *EGFR mutantes*. Nuestros resultados subrayan por tanto la importancia de determinar el estatus genético de *EGFR* en gliomas, ya que éste podría

condicionar la administración y la eficacia de los diferentes agentes anti-cancerígenos. Asimismo, también tendría gran relevancia para predecir la respuesta a los nuevos enfoques terapéuticos, focalizados en la vasculatura del tumor. Hasta la fecha, este tipo de terapias se han centrado principalmente en la supresión de la formación de nuevos vasos y en la destrucción de los vasos tumorales preexistentes para reducir la capacidad de crecimiento de las células tumorales. Sin embargo, los fármacos anti-angiogénicos, como el Bevacizumab, no han tenido mucho éxito en pacientes con gliomas (Ferrara and Kerbel, 2005; Gilbert et al., 2014) (Kim et al., 2018). En cualquier caso, sería interesante determinar si los diferentes fenotipos vasculares observados en nuestros modelos murinos son más o menos sensibles a este tipo de moléculas y cuál podría ser su traslación a la clínica.

5. Tau y mesénquima

Nuestros resultados indican que la sobre-expresión de Tau es capaz de reducir la transformación de la célula tumoral a pericito mediante el bloqueo de la vía de señalización de EGFR y la subsecuente inhibición de NF-κB y TAZ. Ambas moléculas juegan un papel fundamental en los gliomas (Gargini et al., 2016; Nogueira et al., 2011) y son reguladores clave del fenotipo mesenquimal en dichos tumores (Bhat et al., 2011; Bhat et al., 2013). Existen numerosas evidencias del papel de NF-κB en la vía de señalización de EGFR (Zahonero and Sanchez-Gomez, 2014) aunque la relación con TAZ no está tan clara. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que NF-κB interacciona directamente con el promotor de TAZ (Ferraiuolo et al., 2018), lo que podría explicar la inhibición de su expresión en presencia de Tau. TAZ es un regulador transcripcional que funciona en asociación con YAP para modular cómo las células perciben su entorno e interaccionan con él. En el cáncer, el tándem YAP/TAZ induce propiedades de célula madre, favoreciendo el inicio y la progresión tumoral, así como los procesos de metástasis (Zanconato et al., 2016). También se ha descrito su participación en los procesos de angiogénesis embrionarios, regulando la migración de las células vasculares, la formación de vasos sanguíneos y la formación de la BBB (Sakabe et al., 2017). De hecho, nuestros resultados sugieren que gran parte de las vías que se regulan de manera paralela a TAZ en los gliomas están relacionadas con la vasculatura. Asimismo, hemos demostrado que **TAZ juega un papel esencial en la transformación de la célula tumoral a pericito. Por lo tanto, TAZ podría jugar un papel clave en la regulación de la angiogénesis del GB, interviniendo en varios procesos vasculares simultáneamente.**

Es importante recordar que los pericitos son células con características y marcadores mesenquimales (Bergers and Song, 2005). De hecho, algunos autores han propuesto que el fenómeno de EMT descrito en numerosos carcinomas les confiere a las células tumorales

características de pericitos, lo cual resulta indispensable para la estabilización vascular y el crecimiento tumoral (Shenoy et al., 2016). En los gliomas, la adquisición de un fenotipo mesenquimal ha sido el foco de muchos estudios, en los cuales se ha asociado este fenómeno con la inducción de propiedades de célula madre, con la capacidad iniciadora de tumor y con la capacidad directa de controlar el microambiente, donde la vasculatura juega un papel clave (Wang et al., 2017). Nuestros resultados indican que **la inhibición de la capacidad mesenquimal mediada por Tau afecta primordialmente a la adquisición de propiedades pericíticas por parte de las células de glioma**, disminuyendo la expresión de marcadores de dichas células como son *NG2* y *CD248*. Además, esta disminución en la plasticidad tumoral afectó también a la capacidad de inicio tumoral. Esto sugiere que la plasticidad celular y la capacidad vascular son dos fenómenos estrechamente asociados y ligados ambos a la agresividad de los gliomas. Por otro lado, los datos aquí presentados demuestran que los pericitos tumorales son fundamentales para el crecimiento de estos tumores, ya que éste se ve inhibido tras el bloqueo específico de la expresión de *CD248*. Asimismo, los gliomas en los que se redujo la expresión de dicho marcador presentaron una vasculatura más normalizada, efecto similar generado por la expresión de Tau en el glioma. Estos resultados subrayan de nuevo la importancia de los pericitos en gliomas y la necesidad de estudios más detallados acerca de su funcionalidad, analizando si el silenciamiento de otros genes pericíticos como *NG2*, *α-SMA* o *PDGFRβ* podría tener una influencia diferente en el desarrollo vascular del tumor. Asimismo, **nuestros resultados sugieren que las terapias dirigidas a inhibir la función de las células pericíticas podrían ser efectivas para frenar el crecimiento de los gliomas**. En este sentido cabe destacar el tratamiento con un inhibidor del receptor tirosina-quinasa TIE-2 (BAY-826), con el que se ha observado una disminución de la densidad de los vasos y una mejora a la respuesta de tratamientos en GB altamente vascularizados (Schneider et al., 2017). Otra estrategia propuesta es el uso del inhibidor de BMX, Ibrutinib, una quinasa que está expresada de manera específica en los pericitos derivados de células de glioma. Dicho estudio muestra como su administración, no solo genera un efecto en el crecimiento del propio tumor al alterar la vasculatura, sino también mejora la eficacia terapéutica de muchos agentes anti-cancerígenos (Zhou et al., 2017). Por último, el uso de un anticuerpo humano contra *CD248* (MORab-004), específico para los pericitos, se encuentra en fase I de estudio (Diaz et al., 2015), con resultados muy esperanzadores. Estos han revelado una reducción drástica de los vasos tumorales al reducir la expresión tanto de *CD248* como *α-SMA*, afectando de esta manera a la maduración de los vasos tumorales y en última instancia al desarrollo del tumor (Rybinski et al., 2015).

6. Efecto de Tau en la vasculatura del Alzheimer y de los gliomas

Nuestros resultados indican que la expresión de **Tau en los gliomas** provoca una reducción de la agresividad tumoral, al **bloquear la transformación de las células del glioma a pericito**. **Como consecuencia** de ello, Tau **normaliza la vasculatura recuperando la integridad de la BBB**. Curiosamente, **existe una disfunción neurovascular importante en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer, asociada con la pérdida de pericitos** (Sagare et al., 2013) **y la degradación de la BBB** (Kisler et al., 2017). Asimismo, se ha observado que varias de las proteínas asociadas con el Alzheimer generan defectos vasculares como es el caso de APOE, el cual parece favorecer procesos inflamatorios ligados a la función de los pericitos que sensibilizan la BBB y la hacen sensible al daño (Bell et al., 2012). Más recientemente se ha observado que los oligómeros de $A\beta$ generan estrés oxidativo, lo cual afecta a la función de los pericitos, induciendo la constricción vascular y reduciendo el flujo sanguíneo del cerebro (Nortley et al., 2019). Además, se ha observado que los ratones que sobre-expresan Tau mutado (P301L) desarrollan alteraciones en los vasos sanguíneos (Bennett et al., 2018). **Por ello, sería interesante estudiar en profundidad la participación de Tau en el desarrollo vascular y determinar en qué trastornos neurológicos la utilización de fármacos relacionados con la estabilización de microtúbulos podría tener un buen efecto terapéutico**. Incluso sería conveniente desarrollar nuevos compuestos que modulen la función de los pericitos, lo que podría ser un enfoque terapéutico novedoso para varios trastornos neurológicos (Cheng et al., 2018).

7. Propuesta de una nueva estratificación de los gliomas según el fenotipo vascular

A pesar de la intensa investigación sobre la biología de los gliomas, y en especial de los GB, poco se conoce acerca de cómo se regula la formación de vasos durante la progresión de estos tumores. Sin embargo, los cambios vasculares determinan el incremento de bajo a alto grado. **En base a nuestros resultados, nosotros proponemos la existencia de tres fenotipos vasculares dentro de los gliomas (Figura D3), estratificados en función de la actividad de los pericitos tumorales, que está regida por las alteraciones genéticas intrínsecas del tumor**. El primer subgrupo de gliomas, **el menos agresivo**, sería **controlado por las mutaciones en IDH1/2** y estaría caracterizado por la presencia de una vasculatura normalizada, similar a la de los vasos presentes en el tejido sano. En el otro extremo encontraríamos **los gliomas más agresivos, con presencia de mutaciones en EGFR**, los cuales se caracterizarían, no solo por ser

tumores más densos y proliferativos, sino por ser tumores **altamente vascularizados y con cierto grado de estabilidad de la BBB**. Esto sería debido a la presencia de pericitos tumorales y su gran capacidad para unirse a los vasos y generar una estructura lo suficientemente estable para que haya un buen flujo sanguíneo. Por último, habría un **subgrupo intermedio, inducido por la amplificación o sobre-expresión de EGFR**. Este grupo tendría una cierta capacidad angiogénica, pero generaría una **vasculatura con una estructura y funcionalidad defectuosa**, ya que, a pesar de la presencia de los pericitos tumorales, estos no tendrían capacidad para unirse a los vasos y estabilizarlos. **Como consecuencia** de ello estos gliomas presentarían **una gran rotura de la BBB y un flujo sanguíneo entorpecido**, lo que podría generar respuestas hipóxicas debido a la falta de oxigenación.

La estratificación propuesta nos muestra que los gliomas son capaces de crecer de forma agresiva en ausencia de una vasculatura sólida. Esto sugiere que las estrategias terapéuticas vasculares tienen que ser adaptada a cada tipo de glioma. Nuestros resultados predicen, por ejemplo, que los gliomas *EGFR mut* serían más sensibles a inhibidores de PDGFR β , que reducirían la vasculatura y podrían ayudar a que funcionaran terapias tradicionales. En el caso de los gliomas *EGFR wt* o con rotura de vasos se podrían aplicar terapias específicas como los estabilizadores de los microtúbulos que podrían normalizar la vasculatura y mejorar también la eficiencia de las terapias tradicionales. En el caso de los tumores *IDH mut*, nuestros datos predicen que deberían ser menos dependientes de señales angiogénicas. Sin embargo, existe cierta controversia acerca del beneficio de las terapias que incluyen Bevacizumab en pacientes con GB *IDH mut* (Heiland et al., 2016; Cardona et al., 2019). En cualquier caso, los modelos de glioma utilizados en este estudio podrían ser muy útiles para determinar la mejor estrategia anti-vascular para cada tipo de glioma, así como la participación de IDH-Tau-EGFR en la respuesta tumoral.

Gliomas Difusos

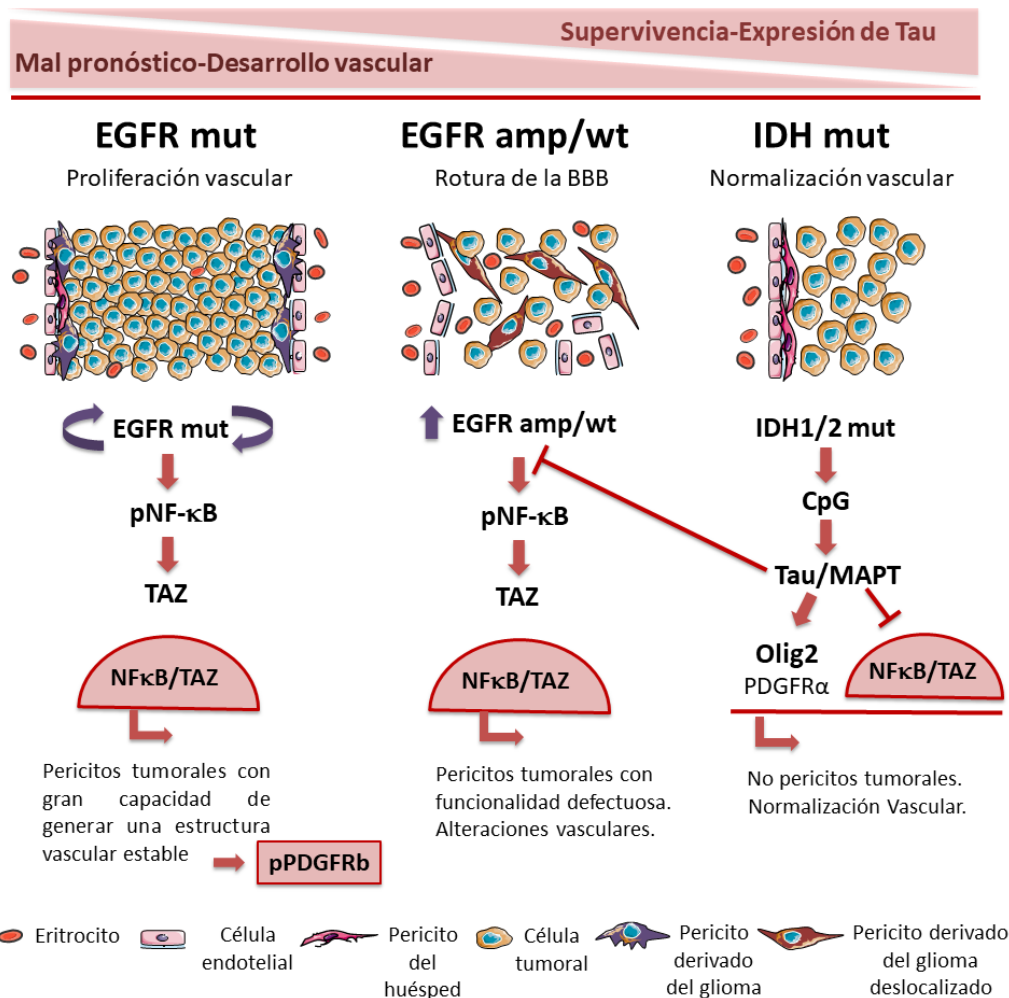


Figura D3. Estratificación de los gliomas en base al estatus genético de EGFR e IDH. Gliomas *EGFR mut* y *EGFR amp/wt* generan pericitos tumorales con distintas capacidades vasculares. Los pericitos vasculares definen la integridad de la BBB y la capacidad proliferativa del propio tumor. La expresión de Tau bloquea la transformación de la célula tumoral a pericito inhibiendo el eje EGFR-NF κ B-TAZ en tumores *IDH mut* e incluso en tumores *IDH wt EGFR amp/wt*.

El hecho de que los gliomas *IDH mut* tengan una vasculatura más normalizada está bastante aceptado ya que en general se caracterizan por tener una baja captación de contraste en secuencias T1 de MRI. De hecho, un trabajo reciente ha demostrado que *IDH mut* inhibe la expresión del Factor tisular, lo que genera un efecto anti-trombótico y una menor aparición de zonas necróticas en los tumores (Unruh et al., 2016; Unruh et al., 2019). Nuestros resultados sugieren un mecanismo adicional por el que *IDH mut* estaría regulando los procesos de vascularización de los gliomas, mediado por la inducción de *Tau* y por el bloqueo de la

capacidad de formación de pericitos tumorales. La existencia de dos fenotipos vasculares dentro del subgrupo de los gliomas *IDH wt* es más novedosa y hasta la fecha no se han podido distinguir estos dos grupos usando los parámetros convencionales de resonancia. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que nuevos parámetros de MRI podrían permitir cuantificar la integridad de la BBB y el estado de los vasos en los diferentes gliomas (Rathore et al., 2018). Estudios futuros nos permitirán distinguir si alguno de estos nuevos parámetros permite distinguir los subgrupos de gliomas propuestos en este trabajo y si, tal como predicen nuestros resultados, tienen correlación con el estatus genético de *EGFR*. De ser así se podría proponer nuevos biomarcadores de neuroimagen, con un valor diagnóstico y predictivo ya que, tal como hemos mencionado anteriormente, la cantidad de quimioterapia que puede llegar a los tumores podría también depender de estos fenotipos vasculares. Además, el infiltrado inmunitario y sus propiedades pro- o anti-tumorales también podrían verse afectadas por las anomalías vasculares (Missiaen et al., 2018).

En conjunto, nuestros resultados muestran como las alteraciones genéticas controlan la agresividad tumoral modificando el microambiente vascular, lo que podría tener un gran impacto a nivel de diagnóstico, pero también para el diseño de futuros enfoques terapéuticos. Nosotros proponemos nuevas estrategias a medida para cada subgrupo de glioma, dirigidas a modificar la vasculatura tumoral y, en particular, los pericitos derivados de tumores, combinadas con terapias convencionales o inmunoterapias. Estos nuevos abordajes podrían ser claves para conseguir frenar la agresividad de los gliomas.



- *Tau/MAPT*, un gen implicado en neurogénesis/neurodegeneración, se encuentra altamente expresado en gliomas, correlacionando además su expresión de forma inversa con la agresividad del tumor.
- Altos niveles de Tau se encuentran presente en tumores con mutaciones en *IDH1* y *ATRX*, y, por el contrario, bajo niveles de Tau están presente en tumores con mutaciones en *EGFR* y *PTEN*.
- *IDH1 mut* induce la expresión de *Tau* mediante la metilación específica de la región CpG 26 de su promotor. Esta metilación impide la unión de CTCF al promotor de *Tau*, la cual deja de formar la estructura de insulador represiva permitiendo así su expresión.
- El eje *IDH mut/Tau* muestra una distribución mutuamente excluyente con las mutaciones en *EGFR/PTEN*.
- La expresión exógena de Tau en tumores *EGFR wt/amp* genera un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral al bloquear la activación de EGFR, siendo los tumores *EGFR mut* resistentes a dicho efecto.
- Tumores con mutaciones en *EGFR* presentan una gran capacidad angiogénica generando tumores altamente vascularizados y por ello más agresivos. Por el contrario, tumores con amplificación de *EGFR* generan una red vascular más frágil que a su vez compromete la integridad de la barrera hematoencefálica.
- EGFR está involucrado en la capacidad de transformación de la célula tumoral a pericito. Sin embargo, solo en presencia de isoformas mutadas de EGFR, estos pericitos derivados de gliomas son reclutados de manera efectiva al endotelio generando una buena estructuración del vaso.
- El estatus de *EGFR* (mutado o amplificado) determina las diferencias vasculares. Las mutaciones en *EGFR* favorecen la incorporación del pericito derivado del glioma al vaso mediante la expresión de *CXCR4* y *CX45* y desencadenando la activación de la vía de PDGFR β .

- Tau inhibe, en tumores con amplificación en *EGFR*, la diferenciación de las células tumorales a pericitos. Dicho efecto genera tumores menos agresivos al desarrollar una vasculatura más normalizada y sin rotura de la BBB.
- La expresión de CD248 se asocia con la formación de una vasculatura aberrante y la inhibición de su expresión elimina los pericitos derivados del glioma, normalizando la vasculatura y preservando la BBB.
- La presencia de Tau en tumores *EGFR* amplificados provoca un cambio en el fenotipo del glioma, ya que reprime los reguladores mesenquimales e induce un fenotipo proneural, todo ello a través de la inhibición de la vía *EGFR/TAZ/NF-κβ*.
- TAZ, el master regulador del fenotipo mesenquimal, coordina funciones "Stem" y vasculares, específicamente permitiendo la transformación de las células tumorales a pericito.



BIBLIOGRAFÍA

- Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *The Journal of clinical investigation* 112, 1142-1151.
- Aghi, M., Cohen, K.S., Klein, R.J., Scadden, D.T., and Chiocca, E.A. (2006). Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer research* 66, 9054-9064.
- Ahn, G.O., and Brown, J.M. (2009). Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis* 12, 159-164.
- Akhavan, D., Pourzia, A.L., Nourian, A.A., Williams, K.J., Nathanson, D., Babic, I., Villa, G.R., Tanaka, K., Nael, A., Yang, H., *et al.* (2013). De-repression of PDGFRbeta transcription promotes acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma patients. *Cancer discovery* 3, 534-547.
- Alcantara Llaguno, S.R., Chen, J., and Parada, L.F. (2009). Signaling in malignant astrocytomas: role of neural stem cells and its therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 7124-7129.
- Amankulor, N.M., Kim, Y., Arora, S., Kargl, J., Szulzewsky, F., Hanke, M., Margineantu, D.H., Rao, A., Bolouri, H., Delrow, J., *et al.* (2017). Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes & development* 31, 774-786.
- Antonyak, M.A., Moscatello, D.K., and Wong, A.J. (1998). Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 273, 2817-2822.
- Arevalo-Perez, J., Kebede, A.A., Peck, K.K., Diamond, E., Holodny, A.I., Rosenblum, M., Rubel, J., Gaal, J., and Hatzoglou, V. (2016). Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Low-Grade Versus Anaplastic Oligodendrogliomas. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging* 26, 366-371.
- Armulik, A., Genove, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell* 21, 193-215.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O'Farrell, F.M., and Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36, 451-455.
- Avila, J., de Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Simon, D., Llorens-Martin, M., Engel, T., Lucas, J.J., Diaz-Hernandez, M., and Hernandez, F. (2012). Looking for novel functions of tau. *Biochemical Society transactions* 40, 653-655.
- Bai, D., Ueno, L., and Vogt, P.K. (2009). Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *International journal of cancer* 125, 2863-2870.
- Bardella, C., Al-Dalahmah, O., Krell, D., Brazauskas, P., Al-Qahtani, K., Tomkova, M., Adam, J., Serres, S., Lockstone, H., Freeman-Mills, L., *et al.* (2016). Expression of Idh1 (R132H) in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis. *Cancer cell* 30, 578-594.
- Barghorn, S., Zheng-Fischhofer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* 39, 11714-11721.

- Baylin, S.B. (2008). Stem cells, cancer, and epigenetics. In *StemBook* (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute Copyright: (c) 2009 Stephen B. Baylin.).
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., *et al.* (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485, 512-516.
- Bennett, R.E., Robbins, A.B., Hu, M., Cao, X., Betensky, R.A., Clark, T., Das, S., and Hyman, B.T. (2018). Tau induces blood vessel abnormalities and angiogenesis-related gene expression in P301L transgenic mice and human Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, E1289-e1298.
- Bergers, G., and Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology* 7, 452-464.
- Bhat, K.P., Salazar, K.L., Balasubramanian, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., James, J.D., Gumin, J., Diefes, K.L., Kim, S.H., *et al.* (2011). The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes & development* 25, 2594-2609.
- Bhat, K.P.L., Balasubramanian, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., Wani, K., Heathcock, L., James, J.D., Goodman, L.D., *et al.* (2013). Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer cell* 24, 331-346.
- Bleau, A.M., Huse, J.T., and Holland, E.C. (2009). The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell cycle* (Georgetown, Tex) 8, 2936-2944.
- Bleeker, F.E., Atai, N.A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K.S., Tigchelaar, W., Troost, D., Vandertop, W.P., Bardelli, A., *et al.* (2010). The prognostic IDH1 (R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta neuropathologica* 119, 487-494.
- Bougnaud, S., Golebiewska, A., Oudin, A., Keunen, O., Harter, P.N., Mader, L., Azuaje, F., Fritah, S., Stieber, D., Kaoma, T., *et al.* (2016). Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. *Oncotarget* 7, 31955-31971.
- Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Brasch, H.D., Chibnall, A.M., Davis, P.F., Tan, S.T., and Itinteang, T. (2016a). Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in surgery* 3, 48.
- Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Tan, S.T., Peng, L., Davis, P.F., and Itinteang, T. (2016b). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in surgery* 3, 21.
- Brantley, E.C., and Benveniste, E.N. (2008). Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Molecular cancer research : MCR* 6, 675-684.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., *et al.* (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462-477.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell* 11, 69-82.
- Calvert, A.E., Chalastanis, A., Wu, Y., Hurley, L.A., Kouri, F.M., Bi, Y., Kachman, M., May, J.L., Bartom, E., Hua, Y., *et al.* (2017). Cancer-Associated IDH1 Promotes Growth and Resistance to Targeted Therapies in the Absence of Mutation. *Cell reports* 19, 1858-1873.

- Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., and Lo, H.W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Molecular cancer* 10, 26.
- Cardona AF., Rojas L., Wills B., Ruiz-Patiño A., Abril L., Hakim F., Jiménez E., Useche N., Bermúdez S., Mejía JA., et al. (2019). A comprehensive analysis of factors related to carmustine/bevacizumab response in recurrent glioblastoma. *Clinical and Translational Oncology* 10, 1364-1373.
- Cecener, G., Tunca, B., Egeli, U., Bekar, A., Tezcan, G., Erturk, E., Bayram, N., and Tolunay, S. (2012). The promoter hypermethylation status of GATA6, MGMT, and FHIT in glioblastoma. *Cellular and molecular neurobiology* 32, 237-244.
- Cheng, J., Korte, N., Nortley, R., Sethi, H., Tang, Y., and Attwell, D. (2018). Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. *Acta neuropathologica* 136, 507-523.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139-152.
- Colen, R.R., Wang, J., Singh, S.K., Gutman, D.A., and Zinn, P.O. (2015). Glioblastoma: imaging genomic mapping reveals sex-specific oncogenic associations of cell death. *Radiology* 275, 215-227.
- De Palma, M., Mazziere, R., Politi, L.S., Pucci, F., Zonari, E., Sifia, G., Mazzoleni, S., Moi, D., Venneri, M.A., Indraccolo, S., et al. (2008). Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer cell* 14, 299-311.
- Dean, M. (2005). The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods in enzymology* 400, 409-429.
- Demory, M.L., Boerner, J.L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Huttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S.J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *The Journal of biological chemistry* 284, 36592-36604.
- Dewhirst, M.W., Cao, Y., and Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature reviews Cancer* 8, 425-437.
- Diaz, L.A., Jr., Coughlin, C.M., Weil, S.C., Fishel, J., Gounder, M.M., Lawrence, S., Azad, N., O'Shannessy, D.J., Grasso, L., Wustner, J., et al. (2015). A first-in-human phase I study of MORAb-004, a monoclonal antibody to endosialin in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 1281-1288.
- Dirkse, A., Golebiewska, A., Buder, T., Nazarov, P.V., Muller, A., Poovathingal, S., Brons, N.H.C., Leite, S., Sauvageot, N., Sarkisjan, D., et al. (2019). Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nature communications* 10, 1787.
- Dittmann, K., Mayer, C., Wanner, G., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2007). The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor- and DNA-dependent kinase phosphorylation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 84, 328-334.

- Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (New York, NY)* 319, 1086-1089.
- Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., *et al.* (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature genetics* 41, 1350-1353.
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., *et al.* (2008). HIF1 alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer cell* 13, 206-220.
- Ehteshami, M., Mapara, K.Y., Stevenson, C.B., and Thompson, R.C. (2009). CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer letters* 274, 305-312.
- Endres, N.F., Engel, K., Das, R., Kovacs, E., and Kuriyan, J. (2011). Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor. *Current opinion in structural biology* 21, 777-784.
- Eskilsson, E., Rosland, G.V., Talasila, K.M., Knappskog, S., Keunen, O., Sottoriva, A., Foerster, S., Solecki, G., Taxt, T., Jirik, R., *et al.* (2016). EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogeneous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro-oncology* 18, 1644-1655.
- Feinstein, S.C., and Wilson, L. (2005). Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochimica et biophysica acta* 1739, 268-279.
- Ferraiuolo, M., Pulito, C., Finch-Edmondson, M., Korita, E., Maidecchi, A., Donzelli, S., Muti, P., Serra, M., Sudol, M., Strano, S., *et al.* (2018). Agave negatively regulates YAP and TAZ transcriptionally and post-translationally in osteosarcoma cell lines. *Cancer letters* 433, 18-32.
- Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.
- Ferron, S.R., Andreu-Agullo, C., Mira, H., Sanchez, P., Marques-Torrejon, M.A., and Farinas, I. (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nature protocols* 2, 849-859.
- Flavahan, W.A., Drier, Y., Liu, B.B., Gillespie, S.M., Venteicher, A.S., Stemmer-Rachamimov, A.O., Suva, M.L., and Bernstein, B.E. (2016). Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* 529, 110-114.
- Folkens, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C.R., Zhu, Z., Hoffman, R.M., and Kerbel, R.S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer research* 69, 7243-7251.
- Fransdemiche, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lante, F., and Buisson, A. (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 6084-6097.
- Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G., and James, C.D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer research* 60, 1383-1387.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E.A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M.H., and Verma, I.M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science (New York, NY)* 338, 1080-1084.

- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development* 21, 2683-2710.
- Garcia-Romero, N., Gonzalez-Tejedo, C., Carrion-Navarro, J., Esteban-Rubio, S., Rackov, G., Rodriguez-Fanjul, V., Oliver-De La Cruz, J., Prat-Acin, R., Peris-Celda, M., Blesa, D., *et al.* (2016). Cancer stem cells from human glioblastoma resemble but do not mimic original tumors after in vitro passaging in serum-free media. *Oncotarget* 7, 65888-65901.
- Gargini, R., Escoll, M., Garcia, E., Garcia-Escudero, R., Wandosell, F., and Anton, I.M. (2016). WIP Drives Tumor Progression through YAP/TAZ-Dependent Autonomous Cell Growth. *Cell reports* 17, 1962-1977.
- Gargini R., Segura-Collar B., and Sánchez-Gómez P. (2019). Novel functions of the neurodegenerative-related gene Tau in cancer. *Frontiers in Aging Neuroscience*.
- Geraldo, L.H.M., Garcia, C., da Fonseca, A.C.C., Dubois, L.G.F., de Sampaio, E.S.T.C.L., Matias, D., de Camargo Magalhaes, E.S., do Amaral, R.F., da Rosa, B.G., Grimaldi, I., *et al.* (2019). Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. *Trends in cancer* 5, 46-65.
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., *et al.* (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* 370, 699-708.
- Gilbertson, R.J., and Rich, J.N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nature reviews Cancer* 7, 733-736.
- Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO journal* 9, 4225-4230.
- Gunther, H.S., Schmidt, N.O., Phillips, H.S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K. (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 27, 2897-2909.
- Gupta, R., Webb-Myers, R., Flanagan, S., and Buckland, M.E. (2011). Isocitrate dehydrogenase mutations in diffuse gliomas: clinical and aetiological implications. *Journal of clinical pathology* 64, 835-844.
- Hardee, M.E., and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *The American journal of pathology* 181, 1126-1141.
- Hartmann, C., Hentschel, B., Wick, W., Capper, D., Felsberg, J., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Meyermann, R., Pietsch, T., *et al.* (2010). Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta neuropathologica* 120, 707-718.
- Hatanpaa, K.J., Burma, S., Zhao, D., and Habib, A.A. (2010). Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia (New York, NY)* 12, 675-684.

Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352, 997-1003.

Heiland DH., Masalha W., Franco P., Machein MR and Weyerbrock A. (2016). Progression-free and overall survival in patients with recurrent Glioblastoma multiforme treated with last-line bevacizumab versus bevacizumab/lomustine. *Jorunal of Neuro-Oncology* 3, 567-575.

Heimberger, A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1462-1466.

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.L., *et al.* (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067-1081.

Hsu, S.C., and Hung, M.C. (2007). Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *The Journal of biological chemistry* 282, 10432-10440.

Hu, J., Jo, M., Cavenee, W.K., Furnari, F., VandenBerg, S.R., and Gonias, S.L. (2011). Crosstalk between the urokinase-type plasminogen activator receptor and EGF receptor variant III supports survival and growth of glioblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 15984-15989.

Inzelberg, R., and Jankovic, J. (2007). Are Parkinson disease patients protected from some but not all cancers? *Neurology* 69, 1542-1550.

Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation* 119, 1417-1419.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428.

Katanasaka, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Morimoto, T., Tamura, T., and Koizumi, F. (2013). Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. *Molecular cancer* 12, 31.

Kickingreder, P., Gotz, M., Muschelli, J., Wick, A., Neuberger, U., Shinohara, R.T., Sill, M., Nowosielski, M., Schlemmer, H.P., Radbruch, A., *et al.* (2016). Large-scale Radiomic Profiling of Recurrent Glioblastoma Identifies an Imaging Predictor for Stratifying Anti-Angiogenic Treatment Response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 5765-5771.

Kim, M.M., Umemura, Y., and Leung, D. (2018). Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 24, 180-186.

Kisler, K., Nelson, A.R., Montagne, A., and Zlokovic, B.V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature reviews Neuroscience* 18, 419-434.

Kita, D., Yonekawa, Y., Weller, M., and Ohgaki, H. (2007). PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta neuropathologica* 113, 295-302.

- Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C.G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J.A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., *et al.* (2012). Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483, 484-488.
- Kokovay, E., Goderie, S., Wang, Y., Lotz, S., Lin, G., Sun, Y., Roysam, B., Shen, Q., and Temple, S. (2010). Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell stem cell* 7, 163-173.
- Kopanic, J.L., Al-mugotir, M.H., Kieken, F., Zach, S., Trease, A.J., and Sorgen, P.L. (2014). Characterization of the connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners. *Biophysical journal* 106, 2184-2195.
- Koschmann, C., Calinescu, A.A., Nunez, F.J., Mackay, A., Fazal-Salom, J., Thomas, D., Mendez, F., Kamran, N., Dzaman, M., Mulpuri, L., *et al.* (2016). ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Science translational medicine* 8, 328ra328.
- Koul, D. (2008). PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer biology & therapy* 7, 1321-1325.
- Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., *et al.* (2009). Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 740-745.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourny, D.R., Gokaslan, Z.L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F.F., McCutcheon, I.E., Hassenbusch, S.J., Holland, E., *et al.* (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery* 95, 190-198.
- Lee, G., Cowan, N., and Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science (New York, NY)* 239, 285-288.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., *et al.* (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell* 9, 391-403.
- Leelatian, N., and Ihrle, R.A. (2016). Head of the Class: OLIG2 and Glioblastoma Phenotype. *Cancer cell* 29, 613-615.
- Lei, Q.Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.Y., Bai, F., Pei, X.H., Zhao, S., Xiong, Y., and Guan, K.L. (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and cellular biology* 28, 2426-2436.
- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C.A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., Sergeant, N., Andreadis, A., and Caillet-Boudin, M.L. (2006). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochimica et biophysica acta* 1762, 460-467.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 651-662.
- Li Chew, C., Lunardi, A., Gulluni, F., Ruan, D.T., Chen, M., Salmena, L., Nishino, M., Papa, A., Ng, C., Fung, J., *et al.* (2015). In Vivo Role of INPP4B in Tumor and Metastasis Suppression through Regulation of PI3K-AKT Signaling at Endosomes. *Cancer discovery* 5, 740-751.

- Li, H., Duan, Z.W., Xie, P., Liu, Y.R., Wang, W.C., Dou, S.X., and Wang, P.Y. (2012). Effects of paclitaxel on EGFR endocytic trafficking revealed using quantum dot tracking in single cells. *PLoS one* 7, e45465.
- Li, L., Chakraborty, S., Yang, C.R., Hatanpaa, K.J., Cipher, D.J., Puliappadamba, V.T., Rehman, A., Jiwani, A.J., Mickey, B., Madden, C., *et al.* (2014). An EGFR wild type-EGFRvIII-HB-EGF feed-forward loop regulates the activation of EGFRvIII. *Oncogene* 33, 4253-4264.
- Lo, H.W. (2010). Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discovery medicine* 10, 44-51.
- Lopes, M.B., Frankfurter, A., Zientek, G.M., and Herman, M.M. (1992). The presence of neuron-associated microtubule proteins in the human U-251 MG cell line. A comparative immunoblot and immunohistochemical study. *Molecular and chemical neuropathology* 17, 273-287.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10369-10373.
- Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Junker, M., Oefner, P.J., Bogdahn, U., Wischhusen, J., *et al.* (2010). Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer research* 70, 2030-2040.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114, 97-109.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* 131, 803-820.
- Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., *et al.* (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474-478.
- Lu, K.V., Zhu, S., Cvrljevic, A., Huang, T.T., Sarkaria, S., Ahkavan, D., Dang, J., Dinca, E.B., Plaisier, S.B., Oderberg, I., *et al.* (2009). Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer research* 69, 6889-6898.
- Ma, L.L., Yu, J.T., Wang, H.F., Meng, X.F., Tan, C.C., Wang, C., and Tan, L. (2014). Association between cancer and Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 42, 565-573.
- Mackay, H.J., and Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature reviews Cancer* 7, 554-562.
- Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., and Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *The EMBO journal* 26, 4546-4554.
- Malzkorn, B., Wolter, M., Riemenschneider, M.J., and Reifenberger, G. (2011). Unraveling the glioma epigenome: from molecular mechanisms to novel biomarkers and therapeutic targets. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 21, 619-632.

- Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006247.
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., Issad, T., Gerhardt, E., Pagesy, P., Vileno, M., *et al.* (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of experimental medicine* 214, 2257-2269.
- Martin-Villalba, A., Okuducu, A.F., and von Deimling, A. (2008). The evolution of our understanding on glioma. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 18, 455-463.
- Michaelsen, S.R., Urup, T., Olsen, L.R., Broholm, H., Lassen, U., and Poulsen, H.S. (2018). Molecular profiling of short-term and long-term surviving patients identifies CD34 mRNA level as prognostic for glioblastoma survival. *Journal of neuro-oncology* 137, 533-542.
- Minna, J.D., Gazdar, A.F., Sprang, S.R., and Herz, J. (2004). Cancer. A bull's eye for targeted lung cancer therapy. *Science (New York, NY)* 304, 1458-1461.
- Miroshnikova, Y.A., Mouw, J.K., Barnes, J.M., Pickup, M.W., Lakins, J.N., Kim, Y., Lobo, K., Persson, A.I., Reis, G.F., McKnight, T.R., *et al.* (2016). Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1alpha-tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nature cell biology* 18, 1336-1345.
- Missiaen, R., Mazzone, M., and Bergers, G. (2018). The reciprocal function and regulation of tumor vessels and immune cells offers new therapeutic opportunities in cancer. *Seminars in cancer biology* 52, 107-116.
- Miyazono, M., Iwaki, T., Kitamoto, T., Shin, R.W., Fukui, M., and Tateishi, J. (1993). Widespread distribution of tau in the astrocytic elements of glial tumors. *Acta neuropathologica* 86, 236-241.
- Mizoguchi, M., Nutt, C.L., Mohapatra, G., and Louis, D.N. (2004). Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14, 372-377.
- Molenaar, R.J., Maciejewski, J.P., Wilmink, J.W., and van Noorden, C.J.F. (2018). Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene* 37, 1949-1960.
- Naguib, A., Bencze, G., Cho, H., Zheng, W., Tocilj, A., Elkayam, E., Faehnle, C.R., Jaber, N., Pratt, C.P., Chen, M., *et al.* (2015). PTEN functions by recruitment to cytoplasmic vesicles. *Molecular cell* 58, 255-268.
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H.J., Furnari, F.B., and Cavenee, W.K. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer research* 62, 6764-6769.
- Nicholas, M.K., Lukas, R.V., Jafri, N.F., Faoro, L., and Salgia, R. (2006). Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 7261-7270.
- Nogueira, L., Ruiz-Ontanon, P., Vazquez-Barquero, A., Moris, F., and Fernandez-Luna, J.L. (2011). The NFkappaB pathway: a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget* 2, 646-653.
- Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Pfeiffer, T., Khennouf, L., Madry, C., *et al.* (2019). Amyloid beta oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science (New York, NY)*.

- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., *et al.* (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell* 17, 510-522.
- Nunez, F.J., Mendez, F.M., Kadiyala, P., Alghamri, M.S., Savelieff, M.G., Garcia-Fabiani, M.B., Haase, S., Koschmann, C., Calinescu, A.A., Kamran, N., *et al.* (2019). IDH1-R132H acts as a tumor suppressor in glioma via epigenetic up-regulation of the DNA damage response. *Science translational medicine* 11.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology* 170, 1445-1453.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 764-772.
- Ostman, A. (2004). PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine & growth factor reviews* 15, 275-286.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2017). CBRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro-oncology* 19, v1-v88.
- Park, J., Aryal, M., Vykhodtseva, N., Zhang, Y.Z., and McDannold, N. (2017). Evaluation of permeability, doxorubicin delivery, and drug retention in a rat brain tumor model after ultrasound-induced blood-tumor barrier disruption. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 250, 77-85.
- Park, J.S., Kim, I.K., Han, S., Park, I., Kim, C., Bae, J., Oh, S.J., Lee, S., Kim, J.H., Woo, D.C., *et al.* (2016). Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer cell* 30, 953-967.
- 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., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, NY)* 321, 1807-1812.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.
- Pearson, K.J., Lewis, K.N., Price, N.L., Chang, J.W., Perez, E., Cascajo, M.V., Tamashiro, K.L., Poosala, S., Csiszar, A., Ungvari, Z., *et al.* (2008). Nrf2 mediates cancer protection but not longevity induced by caloric restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2325-2330.
- Piccirillo, S.G., and Vescovi, A.L. (2006). Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*, 59-81.
- Pike, B.L., Greiner, T.C., Wang, X., Weisenburger, D.D., Hsu, Y.H., Renaud, G., Wolfsberg, T.G., Kim, M., Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., *et al.* (2008). DNA methylation profiles in diffuse large B-cell lymphoma and their relationship to gene expression status. *Leukemia* 22, 1035-1043.
- Pines, G., Kostler, W.J., and Yarden, Y. (2010). Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS letters* 584, 2699-2706.

- Prigent, S.A., Nagane, M., Lin, H., Huvar, I., Boss, G.R., Feramisco, J.R., Cavenee, W.K., and Huang, H.S. (1996). Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *The Journal of biological chemistry* 271, 25639-25645.
- Puliyappadamba, V.T., Chakraborty, S., Chauncey, S.S., Li, L., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., Noorani, S., Shu, H.K., Burma, S., Boothman, D.A., *et al.* (2013). Opposing effect of EGFRWT on EGFRvIII-mediated NF-kappaB activation with RIP1 as a cell death switch. *Cell reports* 4, 764-775.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer cell* 31, 326-341.
- Ramnarain, D.B., Park, S., Lee, D.Y., Hatanpaa, K.J., Scoggin, S.O., Otu, H., Libermann, T.A., Raisanen, J.M., Ashfaq, R., Wong, E.T., *et al.* (2006). Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer research* 66, 867-874.
- Rathore, S., Akbari, H., Rozycki, M., Abdullah, K.G., Nasrallah, M.P., Binder, Z.A., Davuluri, R.V., Lustig, R.A., Dahmane, N., Bilello, M., *et al.* (2018). Radiomic MRI signature reveals three distinct subtypes of glioblastoma with different clinical and molecular characteristics, offering prognostic value beyond IDH1. *Scientific reports* 8, 5087.
- Reifenberger, J., Reifenberger, G., Ichimura, K., Schmidt, E.E., Wechsler, W., and Collins, V.P. (1996). Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *The American journal of pathology* 149, 29-35.
- Riddick, G., and Fine, H.A. (2011). Integration and analysis of genome-scale data from gliomas. *Nature reviews Neurology* 7, 439-450.
- Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., Campos, C., Tsoi, J., Clark, O., Oldrini, B., Komisopoulou, E., *et al.* (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science (New York, NY)* 340, 626-630.
- Rustenhoven, J., Jansson, D., Smyth, L.C., and Dragunow, M. (2017). Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends in pharmacological sciences* 38, 291-304.
- Ryan, R., Booth, S., and Price, S. (2012). Corticosteroid-use in primary and secondary brain tumour patients: a review. *Journal of neuro-oncology* 106, 449-459.
- Rybinski, K., Imtiyaz, H.Z., Mittica, B., Drozdowski, B., Fulmer, J., Furuuchi, K., Fernando, S., Henry, M., Chao, Q., Kline, B., *et al.* (2015). Targeting endosialin/CD248 through antibody-mediated internalization results in impaired pericyte maturation and dysfunctional tumor microvasculature. *Oncotarget* 6, 25429-25440.
- Sagare, A.P., Bell, R.D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E.A., Ramanathan, A., and Zlokovic, B.V. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nature communications* 4, 2932.
- Sakabe, M., Fan, J., Odaka, Y., Liu, N., Hassan, A., Duan, X., Stump, P., Byerly, L., Donaldson, M., Hao, J., *et al.* (2017). YAP/TAZ-CDC42 signaling regulates vascular tip cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 10918-10923.
- Schneider, H., Szabo, E., Machado, R.A., Broggini-Tenzer, A., Walter, A., Lobell, M., Heldmann, D., Sussmeier, F., Grunewald, S., and Weller, M. (2017). Novel TIE-2 inhibitor BAY-826 displays in

vivo efficacy in experimental syngeneic murine glioma models. *Journal of neurochemistry* 140, 170-182.

Scholz, A., Harter, P.N., Cremer, S., Yalcin, B.H., Gurnik, S., Yamaji, M., Di Tacchio, M., Sommer, K., Baumgarten, P., Bahr, O., *et al.* (2016). Endothelial cell-derived angiopoietin-2 is a therapeutic target in treatment-naive and bevacizumab-resistant glioblastoma. *EMBO molecular medicine* 8, 39-57.

Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., *et al.* (2014). A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 512, 324-327.

Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S.L., Oh, D., Schapiro, R., Moral, L., Yan, W., and Shao, R. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 12950-12960.

See, A.P., Han, J.E., Phallen, J., Binder, Z., Gallia, G., Pan, F., Jinasena, D., Jackson, C., Belcaid, Z., Jeong, S.J., *et al.* (2012). The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM. *Journal of neuro-oncology* 110, 359-368.

Semiond, D., Sidhu, S.S., Bissery, M.C., and Vrignaud, P. (2013). Can taxanes provide benefit in patients with CNS tumors and in pediatric patients with tumors? An update on the preclinical development of cabazitaxel. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 72, 515-528.

Sepúlveda-Sánchez JM., Vaz MÁ., Balañá C., Gil-Gil M., Reynés G., Gallego Ó., Martínez-García M., Vicente E., Quindós M., Luque R., *et al.* (2017). Phase II trial of dacomitinib, a pan-human EGFR tyrosine kinase inhibitor in recurrent glioblastoma patients with EGFR amplification. *Neuro-Oncology* 19, 1522-1531.

Shenoy, A.K., Jin, Y., Luo, H., Tang, M., Pampo, C., Shao, R., Siemann, D.W., Wu, L., Heldermon, C.D., Law, B.K., *et al.* (2016). Epithelial-to-mesenchymal transition confers pericyte properties on cancer cells. *The Journal of clinical investigation* 126, 4174-4186.

Shih, A.H., and Holland, E.C. (2006). Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia (New York, NY)* 8, 1072-1082.

Simonavicius, N., Robertson, D., Bax, D.A., Jones, C., Huijbers, I.J., and Isacke, C.M. (2008). Endosialin (CD248) is a marker of tumor-associated pericytes in high-grade glioma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21, 308-315.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., and Dirks, P.B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267-7273.

Soda Y., Marumoto T., Friedmann-Morvinski D., Soda M., Liu F., Michiue H., Pastorino S, Yang M., Hoffman RM., Kesari S., and Verma IM. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4274-4280.

Song, N., Huang, Y., Shi, H., Yuan, S., Ding, Y., Song, X., Fu, Y., and Luo, Y. (2009). Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1alpha/CXCR4 axis. *Cancer research* 69, 6057-6064.

- SongTao, Q., Lei, Y., Si, G., YanQing, D., HuiXia, H., XueLin, Z., LanXiao, W., and Fei, Y. (2012). IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer science* 103, 269-273.
- Sorensen, S.A., Fenger, K., and Olsen, J.H. (1999). Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* 86, 1342-1346.
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M.S., Fink, K., *et al.* (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama* 318, 2306-2316.
- Stupp, R., van den Bent, M.J., and Hegi, M.E. (2005). Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Current neurology and neuroscience reports* 5, 198-206.
- Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., *et al.* (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *The Journal of biological chemistry* 286, 4566-4575.
- Sun, M., Hillmann, P., Hofmann, B.T., Hart, J.R., and Vogt, P.K. (2010). Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85alpha of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15547-15552.
- Talasila, K.M., Soentgerath, A., Euskirchen, P., Rosland, G.V., Wang, J., Huszthy, P.C., Prestegarden, L., Skaftnesmo, K.O., Sakariassen, P.O., Eskilsson, E., *et al.* (2013). EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta neuropathologica* 125, 683-698.
- Tateishi, K., Wakimoto, H., Iafrate, A.J., Tanaka, S., Loebel, F., Lelic, N., Wiederschain, D., Bedel, O., Deng, G., Zhang, B., *et al.* (2015). Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD⁺ Depletion. *Cancer cell* 28, 773-784.
- Thiery, J.P. (2009). [Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 193, 1969-1978; discussion 1978-1969.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Tietz, S., and Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *The Journal of cell biology* 209, 493-506.
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W., Lu, C., Ward, P.S., *et al.* (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479-483.
- Ulasov, I.V., Nandi, S., Dey, M., Sonabend, A.M., and Lesniak, M.S. (2011). Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 17, 103-112.
- Unruh, D., Schwarze, S.R., Khoury, L., Thomas, C., Wu, M., Chen, L., Chen, R., Liu, Y., Schwartz, M.A., Amidei, C., *et al.* (2016). Mutant IDH1 and thrombosis in gliomas. *Acta neuropathologica* 132, 917-930.

- Unruh, D., Zewde, M., Buss, A., Drumm, M.R., Tran, A.N., Scholtens, D.M., and Horbinski, C. (2019). Methylation and transcription patterns are distinct in IDH mutant gliomas compared to other IDH mutant cancers. *Scientific reports* 9, 8946.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* 17, 98-110.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nesslany, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., *et al.* (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 84.
- Waitkus, M.S., Diplas, B.H., and Yan, H. (2016). Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-oncology* 18, 16-26.
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A.C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., *et al.* (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer cell* 32, 42-56.e46.
- Wang, S.C., Nakajima, Y., Yu, Y.L., Xia, W., Chen, C.T., Yang, C.C., McIntush, E.W., Li, L.Y., Hawke, D.H., Kobayashi, R., *et al.* (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nature cell biology* 8, 1359-1368.
- Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature reviews Neuroscience* 17, 5-21.
- Westphal, M., Lamszus, K., and Hilt, D. (2003). Intracavitary chemotherapy for glioblastoma: present status and future directions. *Acta neurochirurgica Supplement* 88, 61-67.
- Wu, X., Sooman, L., Lennartsson, J., Bergstrom, S., Bergqvist, M., Gullbo, J., and Ekman, S. (2013). Microtubule inhibition causes epidermal growth factor receptor inactivation in oesophageal cancer cells. *International journal of oncology* 42, 297-304.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., *et al.* (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine* 360, 765-773.
- Yang, P., Zhang, W., Wang, Y., Peng, X., Chen, B., Qiu, X., Li, G., Li, S., Wu, C., Yao, K., *et al.* (2015). IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 6, 40896-40906.
- Yang, Y.R., Follo, M.Y., Cocco, L., and Suh, P.G. (2013). The physiological roles of primary phospholipase C. *Advances in biological regulation* 53, 232-241.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 37 Suppl 4, S3-8.
- Yi, D., Xiang, W., Zhang, Q., Cen, Y., Su, Q., Zhang, F., Lu, Y., Zhao, H., and Fu, P. (2018). Human Glioblastoma-Derived Mesenchymal Stem Cell to Pericytes Transition and Angiogenic Capacity in Glioblastoma Microenvironment. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 46, 279-290.

- Yue, W.Y., and Chen, Z.P. (2005). Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 997-1002.
- Yue, X., Song, W., Zhang, W., Chen, L., Xi, Z., Xin, Z., and Jiang, X. (2008). Mitochondrially localized EGFR is subjected to autophagic regulation and implicated in cell survival. *Autophagy* 4, 641-649.
- Yung, W.K., Zhang, X., Steck, P.A., and Hung, M.C. (1990). Differential amplification of the TGF-alpha gene in human gliomas. *Cancer communications* 2, 201-205.
- Zahonero, C., and Sanchez-Gomez, P. (2014). EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 3465-3488.
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer cell* 29, 783-803.
- Zawrocki, A., and Biernat, W. (2005). Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Folia neuropathologica* 43, 123-132.
- Zhang, B., Carroll, J., Trojanowski, J.Q., Yao, Y., Iba, M., Potuzak, J.S., Hogan, A.M., Xie, S.X., Ballatore, C., Smith, A.B., 3rd, *et al.* (2012a). The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 3601-3611.
- Zhang, H., Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q.Y., and Guan, K.L. (2009). TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 284, 13355-13362.
- Zhang, J., Stevens, M.F., and Bradshaw, T.D. (2012b). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology* 5, 102-114.
- Zhang, Q., Thomas, S.M., Xi, S., Smithgall, T.E., Siegfried, J.M., Kamens, J., Gooding, W.E., and Grandis, J.R. (2004). SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer research* 64, 6166-6173.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125, 1137-1149.
- Zhou, W., Chen, C., Shi, Y., Wu, Q., Gimple, R.C., Fang, X., Huang, Z., Zhai, K., Ke, S.Q., Ping, Y.F., *et al.* (2017). Targeting Glioma Stem Cell-Derived Pericytes Disrupts the Blood-Tumor Barrier and Improves Chemotherapeutic Efficacy. *Cell stem cell* 21, 591-603.e594.
- Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., Bronson, R.T., Chen, J.W., Weissleder, R., Housman, D.E., *et al.* (2009). Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2712-2716.



ANEXOS

1. PUBLICACIONES QUE FORMAN PARTE DE LA TESIS

Autores: Ricardo Gargini*, **Berta Segura-Collar***, Pilar Sánchez-Gómez

*co-autores

Título: Novel function of the Neurodegenerative-related gene Tau in cancer.

Revista: Frontiers in Aging Neuroscience

Fecha de publicación: Agosto de 2019

Autores: Gargini R*, **Segura-Collar B***, Hernández-SanMiguel E, García-Escudero V, Romero Bravo A, Herranz B, Nuñez F, García-Perez D (...) and Sánchez-Gómez P.

*co-autores

Título: The IDH-Tau-EGFR triad defines diffuse glioma pathology by controlling mesenchymal differentiation and neo-vascular fitness

Revista: Science Translational Medicine

Fecha de publicación: En 2º Revisión

2. OTRAS PUBLICACIONES

Autores: Hernández-SanMiguel E, Gargini R, Cejalvo T, **Segura-Collar B**, Hortigüela R, Núñez-Hervada P, Sepúlveda JM, Hernández-Lain A, Pérez-Núñez A, Sanz E, Sánchez-Gómez P

Título: Ocoxin modulates cancer stem cells and M2-macrophage polarization on glioblastoma: antitumor effects and interaction with chemotherapy.

Revista: Oxidative Medicine Cellular Longevity

Fecha de publicación: Agosto de 2019

Autores: Portela M*, **Segura-Collar B***, Argudo I, Sáiz A, Gargini R, Sanchez-Gomez P, Casas-Tintó S.

*co-autores

Título: Oncogenic addiction of glioma cells to Kish/TMEM167A regulation of vesicular trafficking

Revista: Glia

Fecha de publicación: Diciembre de 2018

Autores: Segura-Collar B, Garcia-Escudero V, Romero-Bravo A, Izquierdo M, Sánchez-Gómez P, Gargini, R.

Título: BNIP3 induction, controlled by p53/PTEN, favours mitophagy and apoptosis on behalf of necrosis, being a marker of better prognosis in glioma.

Revista: Cancer Research Frontiers

Fecha de publicación: Diciembre de 2018

Autores: Bodega G, Segura B, Ciordia S, Mena MC, López-Fernández L, García MI, Trabado I, Suarez I.

Título: Ammonia Affects Astroglial Proliferation in Culture

Revista: Plos one

Fecha de publicación: Septiembre de 2015