CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

PAPEL DA INTERLEUQUINA-6 EN GLIOMAXÉNESE

Irene Golán Cancela

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA
ANO 2019

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Papel da interleuquina-6 en gliomaxénese

D./Dna. Irene Golán Cancela

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela., 23 de xaneiro de 2019

Asdo. Irene Golán Cancela

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Papel da interleuquina-6 en gliomaxénese

D. José Antonio Costoya Puente

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. Irene Golán Cancela, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 23 de xaneiro de 2019

Asdo. José Antonio Costoya Puente

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Irene Golán Cancela declaro que:

Son titular da seguinte patente, desenvolvida no contexto desta tese de doutoramento:

Autores: José A. Costoya Puente; Víctor Arce Vázquez; José L. Pardo Vázquez; José A. Zumalave Rivas; Irene Golán Cancela

Título: Sistema para o cultivo de organoides

Nº de solicitude: P201830866

País de inscrición: España, Galicia

Data de rexistro: 09/2018

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Dedicatoria

In Gedenken an dich,
mein kleiner Beitrag gegen Krebs.

Und auch für dich.
Du bist meine bedingungslose Unterstützung.

Agradecementos

O meu máis sincero agradecemento a todos, e a cada un de vós, que contribuístes dunha maneira ou doutra, consciente ou inconscientemente, para que este proxecto fose posible. Para que chegase o día no que puidese poñerlle o punto final a esta etapa.

A todos, gracias.

"Escoita, presta atención ao que digo: Ao longo dos anos pasaron moitos mestres pola miña orquestra. Algúns foron famosos; a maioría, persoas correntes. Esta canción vai dedicada a todos eles. Actuei en locais de barrio e en grandes teatros. Fun moi pobre e tamén moi cotizado. Empecei por abaixo e alcancei o cumio. E teño que dicirche que a experiencia foi grandiosa. Pero non sería posible sen eles. Sen as súas notas máxicas, sen as súas perlas musicais, non o tería conseguido. Este brinde é pola orquestra!"

Frank Sinatra. *Brinde pola orquestra*, 1983

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

E a pedra do camiño invitándome a dúas copas...

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TÁBOA DE CONTIDOS

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS ..... **vii**

RESUMO ..... **xvii**

INTRODUCIÓN **1**

1 CANCRO 2
1.1 EVOLUCIÓN DARWINIANA EN ONCOXÉNESE 3
1.2 FIRMA DO CANCRO 4
1.2.1 Proliferación crónica 4
1.2.1.1 A vía de RAS 5
1.2.2 Evasión dos sinais supresores da proliferación 5
1.2.2.1 RB 5
1.2.2.2 p53 6
1.2.3 Resistencia á morte celular programada 7
1.2.4 Inmortalidade replicativa 8
1.2.5 Anxioxénese 8
1.2.6 Invasión e metástase 8
1.2.7 Reprogramación do metabolismo celular 9
1.2.8 Evasión da destrución inmune 10

2 GLIOBLASTOMA (GB) 11
2.1 CLASIFICACIÓN DE GB 11
2.2 BASE XENÉTICA DO GB 12
2.3 TERAPIAS EMPREGADAS EN GB 13

3 MICROAMBIENTE EN GB 16
3.1 COMPOÑENTES DO MICROAMBIENTE 17
3.1.1 Matriz extracelular (ECM) 17
3.1.2 Células endoteliais e vasos sanguíneos 19
3.1.3 Neuronas 20
3.1.4 Astrocitos e outras células gliais 21

3.1.4.1 Oligodendrocitos 21
3.1.4.2 Microglía 22
3.1.5 Microambiente inflamatorio 22
3.1.5.1 GB e as células da inmunidade innata 23
3.1.5.1.1 Monocitos e Macrófagos 23
3.1.5.1.2 Mastocitos 24
3.1.5.1.3 Neutrófilos 24
3.1.5.1.4 Células NK 24
3.1.5.2 GB e as células da inmunidade adaptativa 25
3.1.5.2.1 Linfocitos T 25

4 INFLAMACIÓN 27
4.1 SISTEMA INMUNE INNATO 28
4.2 SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO 28
4.3 INFLAMACIÓN AGUDA 29
4.4 INFLAMACIÓN CRÓNICA 29
4.5 INFLAMACIÓN E CANCRO 29
4.5.1 Tipos de inflamación no cancro 30
4.5.2 Papel da inflamación no cancro 32
4.5.2.1 Etapa inicial 32
4.5.2.2 Promoción do tumor 32
4.5.2.2.1 NF-κB 33
4.5.2.2.2 STAT3 35
4.5.2.3 Invasión e metástase 36
4.5.2.3.1 Invasión do tecido local no tumor primario 38
4.5.2.3.2 Intravasación en vasos sanguíneos e linfáticos 38
4.5.2.3.3 Supervivencia na circulación e extravasación 39
4.5.2.3.4 Adaptación e proliferación no novo microambiente 40
4.6 INACTIVACIÓN TUMORAL 41
4.6.1 Inactivación da masa tumoral ou anxioxénica 42
4.6.2 Inactivación das células tumorais 42
4.6.3 Inactivación tumoral mediada polo sistema inmune 42
4.7 ANALOXÍA ENTRE A CURA DE FERIDAS E O CANCRO 43
4.7.1 Cura de feridas 44
4.8 INFLAMACIÓN CRÓNICA E GLIOMA 48

5 SENESCENCIA 48
5.1 SENESCENCIA DURANTE O DESENVOLVEMENTO EMBRIONARIO E NA FISIOLOXÍA NORMAL DE CÉLULAS DO ORGANISMO ADULTO 49
5.1.1 Remodelación tisular 50
5.2 SENESCENCIA COMO RESPOSTA AO ESTRÉS 51

5.2.1 Causa e tipos de senescencia 52
5.2.1.1 Senescencia replicativa 52
5.2.1.2 Senescencia prematura 52
5.2.2 Vías de sinalización: regulación do ciclo celular 53
5.2.2.1 Vía p16/RB 53
5.2.2.2 Vía p53/p21 54
5.2.2.3 Escapada da senescencia 54
5.2.3 Resposta ao dano no ADN: DDR 55
5.3 FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO Á SENESCENCIA: SASP 58
5.3.1 Mecanismos moleculares de control do SASP 60
5.3.1.1 Regulación a través da DDR 60
5.3.1.2 Regulación mediada pola vía p38MAPK 61
5.3.1.3 Control mediado pola organización da cromatina e outros efectores epixenéticos 62
5.3.1.4 IL1α como regulador positivo 65
5.3.1.5 Regulación negativa con miR-146a/b 66
5.3.2 SASP e reprogramación 66

6 DESDIFERENCIACIÓN 69
6.1 TUMOROXÉNESE VS. EMBRIOXÉNESE 69
6.2 POTENCIALIDADE CELULAR 71
6.3 PLURIPOTENCIALIDADE INDUCIDA 73
6.3.1 Factores de reprogramación 77
6.3.1.1 O triplete NANOG - OCT3/4 - SOX2 77
6.3.1.1.1 NANOG 78
6.3.1.1.2 OCT3/4 78
6.3.1.1.3 SOX2 79
6.3.1.2 Os outros factores esenciais: KLF4 e MYC 79
6.3.1.2.1 KLF4 79
6.3.1.2.2 MYC 80
6.3.2 Proceso de pluripotencialidade 81
6.4 DESDIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS TUMORAIS 82
6.4.1 O GB como exemplo de desdiferenciación 82
6.5 ORGANOIDES CEREBRAIS 84

7 CITOQUINAS 88
7.1 INTERLEUQUINA-6 89
7.1.1 Estrutura 92
7.1.2 Receptor de IL6 93
7.1.2.1 IL6R (subunidade α) 93
7.1.2.2 gp130 (subunidade β) 96

7.1.3 Transdución intracelular activada por IL6 98
7.1.3.1 Vía de JAK/STAT 98
7.1.3.1.1 JAK 99
7.1.3.1.2 STAT 99
7.1.3.1.3 Balance entre a activación STAT e MAPK 100
7.1.3.1.4 Regulación negativa: SOCS e SHP2 101
7.1.3.2 Activación da cascada MAPK 101
7.1.3.3 Activación da cascada PI3K/AKT 102
7.2 SINALIZACIÓN DE IL6 EN CANCRO: O SEU PAPEL EN GB 102

OBXECTIVOS 111

MATERIAL E MÉTODOS 113

1 RATOS MODIFICADOS XENETICAMENTE 113
1.1 CONDICIÓNS DE ESTABULACIÓN 113
1.1.1 Ratos *Il6* 113
1.1.2 Ratos condicionais *Rb1* 114
1.1.3 Ratos *Il6* $Rb^{loxP/loxP}$ 114
1.1.4 Ratos *Sox2-TK* 114
1.2 XENOTIPADO 115

2 CULTIVOS CELULARES 116
2.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS 116
2.1.1 *Il6* $Rb^{loxP/loxP}$ 117
2.1.2 *Sox2-TK* 117
2.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS (MEFS) 118

3 TRANSFECCIÓN E INFECCIÓN RETROVIRAL 119

4 PROLIFERACIÓN CELULAR 122
4.1 CURVAS DE PROLIFERACIÓN CON CRISTAL VIOLETA 122
4.1.1 *Sox2-TK* 123
4.2 INCORPORACIÓN DE EDU 123

5 SENESCENCIA E APOPTOSE 124
5.1 SENESCENCIA 124
5.2 APOPTOSE 125

6 WESTERN BLOT 125
6.1 EXTRACCIÓN E CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 125
6.2 ELECTROFORESE E TRANSFERENCIA 126

7 DETERMINACIÓN DA PRODUCIÓN DE ROS 128

8 CARACTERIZACIÓN MITOCONDRIAL 128

9 TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE CÉLULAS TUMORAIS EN RATOS E IMAXE *in vivo* DA BIOLUMINISCENCIA 129

10 FORMACIÓN DE ORGANOIDES CEREBRAIS 130

11 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA 134
11.1 INMUNOHISTOQUÍMICA 134
11.1.1 Hematoxilina-Eosina 134
11.2 INMUNOFLUORESCENCIA 135
11.2.1 Microscopía confocal 136

12 CITOMETRÍA DE FLUXO 138

13 ANÁLISE ESTADÍSTICO DOS RESULTADOS 138

RESULTADOS E DISCUSIÓN 139

1 DESDIFERENCIACIÓN 139

1.1 EFECTO DO ONCOXENE *H-Ras*^{V12} SOBRE A EXPRESIÓN DE *Sox2*: H-RAS^{V12} INDUCE A EXPRESIÓN DESTE FACTOR *STEMNESS* 139
1.2 ALTERACIÓNS XENÉTICAS INDUCEN DESDIFERENCIACIÓN CELULAR E A CAPACIDADE DE FORMAR ORGANOIDES CEREBRAIS .. 143

2 IL6 E MICROAMBIENTE 146
2.1 A PRESENZA DE IL6 FAVORECE O CRECEMENTO TUMORAL *IN VIVO* 146
2.2 A POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS CARA O FENOTIPO M2 É INDEPENDENTE DE IL6 EN GLIOMAS 153

3 IL6 E O SEU EFECTO CÉLULA-AUTÓNOMO 156
3.1 CARACTERIZACIÓN DA AUSENCIA DE IL6 EN ASTROCITOS MURINOS *Rb*$^{-/-}$ E/OU *H-Ras*^{V12} 156
3.1.1 A ausencia de IL6 non ten efecto sobre a proliferación celular *in vitro* 156
3.1.2 A ausencia de IL6 non modifica o patrón de adquisición do fenotipo transformado 161
3.1.3 A ausencia de IL6 non ten efecto sobre os mecanismos de senescencia e apoptose en astrocitos 163
3.1.4 En condicións normais IL6 exerce un efecto protector fronte ao estrés oxidativo que non se produce durante a tumoroxénese 165

3.1.5 IL6 non afecta á distribución nin ao número de mitocondrias por célula 169
3.1.6 IL6 participa no DDR 172
3.1.7 IL6 reduce a capacidade de desdiferenciación de astrocitos mentres que WIP1 é clave para activar o programa 179
3.2 CARACTERIZACIÓN DA AUSENCIA DE IL6 EN MEFS *Rb*$^{-/-}$ E/OU *H-Ras*^{V12}: DIMINÚE A PROLIFERACIÓN CELULAR PERO NON AFECTA AOS MECANISMO DE SENESCENCIA E APOPTOSE 188

4 VISIÓN XERAL 193
4.1 TRANSFORMACIÓN CELULAR MEDIADA POR ONCOXENES: DENDE O ESTRÉS CELULAR ATA A DESDIFERENCIACIÓN 193
4.1.1 A implicación de IL6 198
4.1.2 Cal é a consecuencia de eliminar IL6 da ecuación 200
4.2 POSIBLE ABORDAXE TERAPÉUTICA 201

CONCLUSIÓNS **205**

BIBLIOGRAFÍA **207**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

a

ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADN-PK	proteínas quinasas dependentes de ADN
ADP	adenosine diphosphate
AKT	AK (name for a mouse that developed spontaneus thymic lymphomas) T (thymoma)
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
APC	antigen presenting cells
ARE	antioxidant response element
ARF	ADP ribosylation factor
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensaxeiro
ARR	access-repair-restore
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein kinase
ATP	adenosine triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATRIP	ATR-interacting protein

b

Bad	Bcl2-associated death promoter protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
bHLHZ	basic helix-loop-helix leucine zipper
BMP	bone morphogenetic protein
BRCA	breast cancer gene
BRD4	bromodomain-containing protein 4
BSF2	B-cell differentiation factor 2

c

C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein beta
CAF	cancer-associated fibroblast
CBM	cytokine-binding module
CD	cluster of differentation
Cdc25A	cell division cycle 25 homolog A
CDK	cyclin-dependent kinases
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CHK	checkpoint kinase
CIMUS	Centro de Investigación en Medicina Molecular e Enfermidades Crónicas
CLC	cardiotrophin-like cytokine
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CO_2	carbon dioxide
CRP	C-reactive protein
CSC	cancer stem cell
CT1	cardiotrophin 1
CTNND2	catenin delta 2
Cu(I)	cobre (I)
CUL3	cullin 3
CXCR7	chemokine receptor 7

d

DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA damage response
DDRNAs	DNA damage response RNAs
DEN	diethylnitrosamine
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DHE	dihidroethidium
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DMEM	Dulbecco’s modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOT1L	DOT1-like histone H3K79 methyltransferase
DSBs	double-strand DNA breaks

e

E2F	E2 transcription factor
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EPC	endothelial progenitor cell
ER	estrogen receptor
EREs	estrogen response elements
ERK	extracelular signal-regulated kinase
ES cell	embryonic stem cell

f

FACS	fluorescence-activated cell sorter
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FERM	F (4.1 protein) E (ezrin) R (radixin) M (moesin)
FGF	fibroblast growth factor
FKHR	fork head domain protein
FOXO	forkhead box O

g

Gab1	Grb2-associated-binding protein 1
GAPs	GTPase-activating proteins
GB	glioblastoma
GCV	ganciclovir
GDP	guanosine diphosphate
GEFs	guanine nucleotide exchange factors
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
gp130	glycoprotein 130
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
GTP	guanosine triphosphate

h

HA	hyaluronic acid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HFSC	hair follicular stem cell
HGF	hepatocyte growth factor
HIF1	hypoxia-inducible factor 1
HMG	high-mobility group
hnRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HPC	hematopoietic progenitor cell
HR	homologous recombination

i

i4F	inducible four factors
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDH	isocitrate dehydrogenase
IDIS	Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela
IFESC	interfollicular epidermal stem cell
IFL	inner fibre layer
IFNγ	interferon gamma
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein
IgG	immunoglobulin G
IKK	IκB kinase
IL6	interleukin-6
IL6R	interleukin-6 receptor
iNOS	inducible nitric oxide synthase
iPS	induced pluripotent stem cell
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
ITGAE	integrin alpha E
IVIS	*in vivo* imaging system
IκB	inhibitor of κB

j

JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase

	k
KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1
KLF4	kruppel-like factor 4
	l
LIF	leukemia inhibitory factor
LZTR1	leucine-zipper-like transcriptional regulator 1
	m
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MAPKAPK2	MAP kinase-activated protein kinase 2
Mcl1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCP-2	monocyte chemoattractant protein 2
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM2	mouse (murine) double minute 2
MDSC	myeloid-derived suppresor cell
MEF	mouse embryonic fibroblast
MET	mesenchymal-epithelial transition
MHC	major histocompatibility complex
MHT	magnetic hyperthermia therapy
miARN	micro-ácido ribonucleico
MiDAS	mitochondrial dysfunction-associated senescence
MIP-3a	macrophage inflammatory protein-3 alpha
MKK	MAPK kinases
MLL1	mixed lineage leukemia protein 1
MMHCC	Mouse Models of Human Cancers Consortium
MMP	matrix metalloproteinase
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
MYC	myelocytomatosis
	n
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBS1	nibrin
ncRNA	non-coding RNA
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
neoCOR	neoplastic cerebral organoid
NES	nuclear export signal

NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ	non-homologous end joining
NIK	nuclear factor κB-inducing kinase
NK cell	natural killer cell
NLS	nuclear localization sequence
NOS	nitric oxide synthase
NOTCH	neurogenic locus notch homolog protein
NRF2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSC	neural stem cell
NuRD	nucleosome remodeling deacetylase

o

O_2	osíxeno
OCT3/4	octamer-binding transcription factor 3/4
OIS	oncogene-induced senescence
OMS	Organización Mundial da Saúde
OPC	oligodendrocyte progenitor cells
oRG	outer radial glia
OSKM	OCT3/4, SOX2, MYC, KLF4
OSM	oncostatin M
OSVZ	outer subventricular zone

p

p/v	peso/volume
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PDGF	platelet-derived growth factor
PEI	polyethylenimine
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP_3	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKCδ	protein kinase C delta
POU	Pit-Oct-Unc
PP2C	protein phosphatase 2C
PTEN	phosphatase and tensin homolog

r

RAS	rat sarcoma
RB	retinoblastoma protein
REGA	Rexistro de Explotacións Agrarias de Galicia
RELA	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RNF4	RING finger protein 4
RNI	reactive nitrogen intermediates
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RPA	replication protein A
RTK	receptor tyrosine kinase

s

SAA	serum amyloid A
SAHF	senescence-associated heterochromatin foci
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SA-βGal	senescence-associated beta-galactosidase
SCID	severe combined immunodeficiency
SCNT	somatic cell nuclear transfer
SD	standard deviation
SDF1	stromal cell-derived factor 1
SEM	standard error of the mean
SFEBq	serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation
sgp130	soluble glycoprotein 130
SH2	Src homology 2
shARN	short hairpin ARN
SHP2	SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2
sIL6R	soluble interleukin 6 receptor
SIRT1	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 1
SMAD	SMA (small)+MAD (mothers against decapentaplegic)
SMS	senescence-messaging secretome
SNC	sistema nervioso central
SOCS	suppressor of cytokine signaling proteins
SOS	son of sevenless

SOX2	sex determining region Y-box 2
SPF	specific-pathogen-free
SRR2	Sox2 regulatory region 2
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUMO	small ubiquitin-like modifier protein
	t
TAK1	transforming growth factor beta-activated kinase 1
TAM	tumor-associated macrophage
TAN	tumor associated neutrophil
TCF	T-cell factor
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGFβ	transforming growth factor beta
Th cell	T helper cell
TIC	tumor-initiating cells
TLR	Toll-like receptor
TMZ	temozolomida
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNFα	tumor necrosis factor alpha
TP53	tumor protein 53
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRAIL	TNF-related apoptosis-induced ligand
TTF	tumor treating fields
TUJ1	neuron-specific class III β-tubulin
TYK2	tyrosine kinase 2
	u
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UV	ultraviolet
	v
v/v	volume/volume
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
	w
WIF1	Wnt inhibitory factor 1
WIP1	wild-type p53-induced phosphatase 1
WNT	wingless/integrated

z

Zfp281	zinc finger protein 281

Números

53BP1	p53-binding protein 1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

O glioblastoma (GB) está descrito como un dos tumores do sistema nervioso central máis frecuente e agresivo, cunha esperanza de vida media, dende o diagnóstico, moi desalentadora. Por iso, toda investigación dirixida a entender as bases moleculares da enfermidade e a procura dun tratamento efectivo resulta fundamental para mellorar a calidade de vida do paciente.

En GB, igual que noutros cancros, os pacientes mostran niveis elevados de interleuquina-6 (IL6) circulante. Está descrito que esta citoquina favorece o crecemento e a progresión maligna, e son varias as células que a segregan no entorno tumoral, entre elas, as células inmunes infiltradas, as células do estroma e as propias células cancerosas. IL6 exerce a súa función a través do seu receptor específico, IL6R, e a activación de determinadas vías de sinalización, principalmente, a vía JAK/STAT.

O obxectivo principal da presente tese é coñecer a implicación de IL6 no desenvolvemento e avance de gliomas. Para cumprir con este obxectivo, estableceuse un modelo de glioma *in vitro* baseado en astrocitos de ratos neonatais que, a través da expresión do *oncoxene H-Ras*^{V12}, recapitulaban a hiperactivación das vías de sinalización dependentes de factores de crecemento. Este evento oncoxénico combinouse, ou non, cun segundo suceso, baseado no desaxuste do ciclo celular a través da inactivación xénica do supresor tumoral *Rb*. Todo isto, nun contexto no que as células expresaban ou non o xene de *Il6*, permitindo comparar os efectos da súa ausencia fronte á súa presenza nos distintos ensaios. Por outra parte, para coñecer a repercusión que esta interleuquina ten no micoambiente tumoral, utilizouse un modelo de transplante ortotópico de células tumorais

murinas en ratos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$, cun seguimento da enfermidade a través de técnicas de imaxe óptica non invasivas.

Os resultados obtidos neste estudo demostran que a ausencia de IL6 non afecta á taxa de proliferación celular, non modifica a capacidade de transformación inducida polo oncoxene e tampouco altera a porcentaxe de senescencia e apoptose. Pero unha análise máis profunda da bioquímica dos astrocitos permitiu descubrir que IL6 colabora na estimulación da resposta ao dano no ADN (DDR) a través da activación dalgúns dos seus compoñentes, como p53 e CHK1. Por outra parte, neste traballo tamén se mostra que a fosfatasa WIP 1, por medio de NF-KB, actúa como mediadora da reprogramación inducida polo oncoxene, mentres que IL6 exerce de moderadora do proceso vía STAT3. Respecto ao papel da interleuquina no microambiente tumoral, os datos obtidos evidencian unha participación activa na gliomaxénese, de maneira que co seu bloqueo contribúese á redución da progresión tumoral.

Os resultados no seu conxunto permiten concluír que, nun modelo de glioma, IL6 desempeña un importante papel a nivel do microambiente, potenciando a progresión tumoral. Así mesmo, exerce un efecto célula-autónomo sobre as células cancerosas, cooperando na activación da DDR e moderando, por medio de STAT3, a reprogramación celular inducida por *H-Ras*^{V12} e mediada por WIP1 a través de NF-κB.

.

INTRODUCIÓN

A Organización Mundial da Saúde (OMS) sinala ao cancro como a principal causa de morbilidade e mortalidade a nivel mundial, situándoo como a segunda causa de morte con 8,8 millóns de defuncións no 2015. Os datos aportados non son alentadores pois estiman un aumento do 70% de novos casos nos próximos vinte anos.

A través da Axencia Internacional para a Investigación do Cancro (IARC), a OMS levou a cabo o proxecto GLOBOCAN, un programa destinado a estimar a incidencia, mortalidade e predominio dos principais tipos de cancro, a nivel nacional, en 184 países do mundo no ano 2012. De feito, estes son os últimos datos dispoñibles sobre esta enfermidade ata o momento e entre eles caben destacar cifras como: o número de novos casos, situado en 14,1 millóns; 8,2 millóns de mortes; ou 32,6 millóns de persoas que padecían a enfermidade no 2012.

Coñecer os datos actualizados sobre a incidencia e mortalidade do cancro é necesario para planificar e avaliar o impacto dos programas de control da enfermidade a nivel nacional e rexional, e tamén para reducir os custos que supón a enfermidade para a sociedade, que foron de 1,16 billóns de dólares no ano 2010 e que sigue aumentando.

A OMS tamén leva a cabo un *Plan de acción mundial para a prevención e control das Enfermidades Non Transmisibles (2013-2020)*, entre as cales se atopa o cancro xunto coas enfermidades cardiovasculares, enfermidades respiratorias crónicas e a diabetes. O obxectivo deste plan é conseguir unha redución do risco de morte prematura dun 25% para o ano 2025. Unha forma para alcanzalo é a través do sistema de saúde, cunha mellora da prevención, unha detección temperá, o tratamento do paciente e o manexo sostido das persoas con alto risco.

1 CANCRO

Unha célula normal crece e divídese en dúas células fillas a través do ciclo celular, un proceso no que os termos 'multiplicación' e 'división' significan o mesmo. Esta sucesión ordenada de eventos está dirixida polos complexos ciclina/CDKs e monitorizada polos *checkpoints*, que detectan e reparan o dano no ADN con gran precisión e forzan á célula danada a entrar en apoptose ou senescencia. Debido a esta regulación, a taxa de mutacións espontáneas é moi baixa en cada xeración. Pero o sistema non é perfecto. Defectos na detección e reparación permiten tomar un destino alternativo: proseguir no ciclo co ADN danado. O resultado é a acumulación de alteracións que van xerando inestabilidade xenómica e, ao final, unha transformación oncoxénica (Malumbres & Barbacid, 2009).

O estudo do cancro comezou sendo moi reducionista, centrado só na célula tumoral e no seu xenoma, pero a pesar diso, aportou múltiples coñecementos no campo da oncoloxía. Estableceuse que se trata dunha enfermidade que implica cambios dinámicos no xenoma, que se resumen, basicamente, en mutacións dominantes en oncoxenes que provocan ganancia de función, e en mutacións recesivas en xenes supresores de tumores que xeran unha perda de función. Hoxe en día sabemos que para entender a bioloxía dos tumores sólidos non podemos centrarnos só nas células neoplásicas, senón que os temos que analizar como tecidos complexos onde tamén teñen cabida diversos tipos de células normais, a matriz extracelular e os seus compoñentes. O denominado microambiente tumoral. Integrantes que deixaron de ser espectadores pasivos para converterse en colaboradores activos da progresión tumoral. Xurde así o concepto de microambiente tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

> "Normal tissues comprise two interdependent compartments, the parenchyma (generally epithelium) and the stroma, a complex mixture of fixed tissue cells (fibroblasts, histiocytes, mast cells), inflammatory cells (myeloid cells, lymphocytes, macrophages), blood vessels of multiple types, matrix proteins (e.g., collagens I and III,

> fibronectin) and proteoglycans (e.g., versican). Stroma provides support for the parenchyma and its vascular component is necessary for providing oxygen and nutrients and for clearing waste products such as carbon dioxide and other metabolites. Tumors, regardless of their site of origin, have the same needs as normal tissues and are organized into these same two compartments, i.e., parenchyma (malignant cells) and stroma. The composition of tumor stroma mimics that of normal tissues. It is generally thought to be non-malignant, though there is evidence that, at the very least, tumor stromal fibroblasts and endothelial cells can share some of the functional properties of malignant cells such as increased proliferation and migration" (Dvorak, 2015)

1.1 EVOLUCIÓN DARWINIANA EN ONCOXÉNESE

Charles Darwin presentou a súa teoría da evolución mediante a selección natural na súa obra "A orixe das especies" publicada en 1859. A súa teoría baséase na idea de que todos os individuos dunha poboación están sometidos a unha loita pola supervivencia. Nun entorno continuamente cambiante, son os individuos mellor adaptados os que teñen maior probabilidade de sobrevivir e, polo tanto, de reproducirse e transmitir a súa información xenética á xeración seguinte.

Este concepto, fundamental na Bioloxía moderna e que normalmente se explica a nivel da evolución das especies, tamén se pode aplicar a un nivel moito máis básico: a nivel celular. Unha célula normal adquire algún tipo de cambio no seu xenoma que a converte en neoplásica e que lle confire vantaxe selectiva en crecemento respecto ás células veciñas. De forma inmediata, ou tras un período de latencia, esta célula comeza a expandirse, e forman unha poboación que se caracteriza por presentar inestabilidade xenómica e un número elevado de mutantes, dos cales, a maioría son eliminados por mostrar desvantaxe metabólica ou por ser destruídos polo sistema inmune. Non obstante, de forma ocasional, xorden algún que mostra, de novo, unha vantaxe selectiva fronte á célula tumoral inicial e ás células normais veciñas, converténdose no precursor dunha nova subpoboación eventualmente predominante no entorno local do tecido (Greaves &

Maley, 2012; Hanahan & Weinberg, 2000; Nowell, 1976). As mutacións son a base da evolución por selección natural e favoreceron o desenvolvemento da gran diversidade de formas de vida que poboan a Terra.

1.2 FIRMA DO CANCRO

A inestabilidade xenómica, xunto co microambiente inflamatorio (que se analizará con maior profundidade nos seguintes capítulos), son dúas calidades do cancro que, nun proceso multi-etapas, capacitan ás células neoplásicas para adquirir características funcionais que lle permiten sobrevivir, proliferar e diseminarse (Figura 1). Gañar estes atributos supón vulnerar os mecanismos de defensa contra o cancro intrínsecos á célula (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

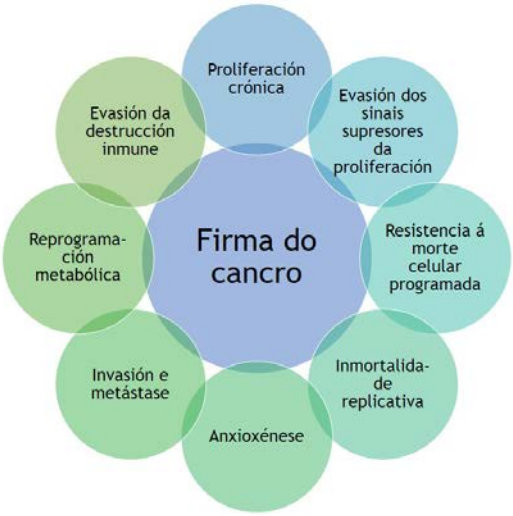


Figura 1| A firma do cancro. Oito alteracións fisiolóxicas esenciais que sofren as células neoplásicas e que, de forma conxunta, determinan o crecemento tumoral.

1.2.1 Proliferación crónica

A proliferación é un proceso regulado nunha célula normal, asegurándose a homeostase no número de células e, polo tanto, a arquitectura e funcionalidade do tecido. As células tumorais evaden este

control a través de mutacións que activan de forma constitutiva compoñentes das vías de sinalización mitoxénicas ou inhibindo os mecanismos que atenúan esta sinalización, conseguindo ser completamente autónomas na súa expansión, independentes de calquera tipo de sinal exóxena (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.1.1 A vía de RAS

RAS é unha proteína pequena, duns 21 kDa, que pertence a unha ampla familia de pequenas GTPasas con actividade catalítica intrínseca. Esta actividade depende do ciclo GDP/GTP e do balance existente entre GEFs, que catalizan o intercambio de GDP por GTP, activando RAS; e GAPs, responsables de estimular a hidrólise intrínseca de GTP a GDP, e polo tanto, da inactivación de RAS.

O 30% de todos os cancros humanos mostran mutación en *RAS*. A maioría das mutacións son debidas a simples cambios de bases que manteñen á proteína activa de forma constitutiva e, como consecuencia, tamén a maioría das vías de sinalización asociadas ao cancro. Este oncoxene ten a capacidade de estimular a proliferación celular, inhibir a acción anti-proliferativa, activar a replicación e evadir a apoptose. Tamén regula a supervivencia, anxioxénese e diferenciación, e ten un papel na insensibilidade á resposta inmune e nos procesos de invasión e migración de células tumorais (Khan *et al*., 2018; Olson & Marais, 2000; Rajalingam *et al*., 2007).

1.2.2 Evasión dos sinais supresores da proliferación

Os mecanismos que suprimen a proliferación dependen fundamentalmente dos xenes que codifican proteínas supresoras tumorais. Moitos deles están inactivos en varios cancros. Os prototipos de supresores tumorais son RB e p53.

1.2.2.1 RB

RB1 é o regulador universal do ciclo celular. É unha proteína de 110 kDa que conforma, xunto con p107 e p130, a familia das proteínas *pocket*. Os tres mostran similitudes funcionais pero difiren nas proteínas coas que interaccionan. RB1 ten un papel importante na proliferación a través do control da replicación do ADN e a división celular. Nun

estado hipofosforilado, RB1 asóciase e inhibe o factor de transcrición E2F prevendo a transcrición de xenes relacionados coa síntese de ADN na fase S do ciclo celular. A súa hiperfosforilación, mediada polo complexo ciclina/CDK, provoca a súa disociación de E2F e pérdese a represión que exerce sobre este factor de transcrición. Tamén se identificou un rol de RB1 en diferenciación e apoptose.

A perda de función deste supresor tumoral supón unha alteración na vía RB1/E2F, quedando este último libre para transcribir os seus xenes diana de forma continuada. Prodúcese un descontrol do ciclo celular, aumenta a proliferación e, en último caso, favorécese o crecemento tumoral. Toda unha vantaxe para as células malignas que alcanzan a través da mutación directa do xene *RB1* ou ben, alterando a expresión de reguladores, como a ciclina D, CDK4/6 ou p16 (Dick & Rubin, 2013; Macdonald *et al*., 2004).

1.2.2.2 p53

O xene *TP53*, que codifica o factor de transcrición p53, é o xene supresor tumoral máis frecuentemente mutado en cancros humanos. Actúa como gardián da estabilidade xenómica porque restrinxe a inestabilidade cromosomal a través da súa capacidade de protexer á célula dunha mitose aberrante.

En condicións normais, os niveis de p53 son baixos pola actuación da E3-ubiquitín-ligase MDM2, responsable de ubiquitinizar e degradar p53. Ante unha situación de estrés, como dano no ADN ou estrés replicativo, inhíbese a actividade de MDM2 e estabilízase a proteína p53, que ten a capacidade de unirse ao ADN e activar un complexo programa transcricional anti-proliferativo. Entre estas respostas está a expresión de p21, inhibidor de CDKs. A inhibición de CDKs ten como consecuencia a non fosforilación de RB, un paso que si resulta necesario para a progresión do ciclo celular. Deste xeito, p53 consigue bloquear o ciclo para levarse a cabo a reparación do ADN.

Outras respostas resultado da actuación de p53, ademais da detención do ciclo celular son: apoptose e senescencia, regulación metabólica, reparación e supervivencia ou morte, e eliminación de células anormais. Tamén controla a autofaxia e reprime a pluripotencialidade e plasticidade celular.

A supresión da súa actividade, ben por mutacións no xene *TP53* ou ben a través da activación de vías que reprimen p53, é un factor que contribúe a transformación maligna. Por unha parte, a alteración dos niveis de p53 tradúcese nunha diminución da expresión de p21 e, como consecuencia, a fosforilación de RB e a progresión a través do ciclo celular. Por outra parte, e como se explicará máis detidamente no capítulo de desdiferenciación, a transformación maligna alcánzase porque se evade a diferenciación terminal, e a perda de p53 é probablemente unha das rutas que suprime esta barreira anti-tumoral innata (Jain & Barton, 2018; Macdonald *et al*., 2004).

1.2.3 Resistencia á morte celular programada

A apoptose é un mecanismo de control celular que se activa como resposta a varios tipos de estrés fisiolóxicos. Actúa como barreira natural contra o cancro. A maquinaria apoptótica está supervisada por oncoxenes e xenes supresores tumorais, e consta de compoñentes reguladores, que detectan os sinais extracelulares e intracelulares que inducen a morte, e efectores, como as caspasas, responsables de executar a apoptose en si. A inhibición da morte celular, por supresión da expresión de xenes indutores da apoptose ou por activación daqueles que favorecen a supervivencia, contribúe ao desenvolvemento tumoral (Fouad & Aanei, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011; Macdonald *et al*., 2004).

Outros tipos de morte celular programada son a autofaxia e a necrose. A autofaxia tamén se activa por estrés, como inanición ou hipoxia, e a súa activación pode ter un dobre sentido: mentres que en células normais prevén a tumoroxénese, a través da eliminación selectiva de organelas danadas e oncoproteínas; en células tumorais, esta degradación contribúe ao aporte de catabolitos reciclables e da enerxía necesaria para manter a crecente taxa de proliferación. Deste xeito asegúrase a súa supervivencia en condicións de estrés (Aredia *et al*., 2012; Fouad & Aanei, 2017; Xue *et al*., 2016). O caso da necrose é especial porque é un fenómeno, sometido tamén a un control xenético, polo que unha célula se incha e explota, liberando todo o seu contido ao entorno, e entre estes compoñentes hai factores pro-inflamatorios capaces de recrutar células inflamatorias do sistema inmune. Induce,

polo tanto, un microambiente inflamatorio que, como se explicará máis adiante, promove a progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.4 Inmortalidade replicativa

A replicación ao longo da vida da célula acaba por erosionar os telómeros porque a ADN polimerasa non replica os extremos dos cromosomas. Ante esta situación, a célula entra en senescencia ou apoptose. En células tumorais, á diferenza de células normais, observouse actividade da telomerasa, enzima responsable de engadir segmentos repetitivos aos telómeros evitando o seu desgaste. Unha estratexia máis para saltar as barreiras de protección (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.5 Anxioxénese

Os procesos de anxioxénese, formación de vasos sanguíneos, e linfoanxioxénese, formación de vasos linfáticos, son necesarios para aportar o suplemento adecuado de O_2 e nutrientes á masa tumoral, así como para eliminar os residuos metabólicos e CO_2. Tanto o crecemento tumoral como a metástase dependen destes dous procesos. A neovascularización consta de catro etapas: 1) dano local da membrana basal dos tecidos, 2) migración das células endoteliais, 3) proliferación e estabilización das células endoteliais, e 4) proliferación continuada das células do endotelio vascular baixo o efecto de factores anxioxénicos (Nishida *et al*., 2006).

1.2.6 Invasión e metástase

A cascada de invasión-metástase é un tema que se aborda con maior profundidade máis adiante pero, comentar de forma abreviada, que é un proceso que consta de múltiples etapas que se van dando de forma secuencial: 1) invasión local, 2) intravasación de células tumorais diseminadas en vasos sanguíneos e linfáticos, onde interaccionan con plaquetas, linfocitos e outros compoñentes sanguíneos, 3) transporte das células tumorais polo sistema hematolóxico e linfático ata tecidos e órganos distantes, 4) extravasación e entrada no parénquima do tecido/órgano secundario, 5) micrometástase, e 6) colonización do tecido invadido e formación dunha metástase macroscópica. O

microambiente de destino debe ser receptivo á chegada das células tumorais diseminadas e, actualmente, son varias as evidencias que indican a existencia dun nicho pre-metastático preparado polo tumor primario antes de desencadearse a cascada matastática (Hanahan & Weinberg, 2011; Peinado *et al*., 2017; Weinberg, 2007).

1.2.7 Reprogramación do metabolismo celular

A reprogramación metabólica en células tumorais actúa como vía para alcanzar outras características favorecedoras, como a replicación ilimitada e a evasión da apoptose. Este cambio no metabolismo é a resposta a un proceso moi complexo, activado para alcanzar un estado metabólico ideal para a proliferación e sustento das células tumorais.

En 1924 Otto Warburg decatouse de que, mentres unha célula somática normal dependen dunha síntese eficiente de ATP para manter as súas funcións, as células tumorais activan a glicólise aerobia e producen grandes cantidades de lactato. A célula normal exerce unha gran regulación sobre a súa carga enerxética e síntese de ATP para previr a proliferación descontrolada: altos niveis de ATP exercen un efecto negativo sobre a vía glicolítica e diminúe a conversión de glucosa a piruvato e lactato; a escaseza de ATP aumenta os niveis de AMP, que activa a vía AMPK para inhibir os procesos anabólicos, como a síntese de proteínas, e favorecer os procesos catabólicos, como a oxidación de ácidos graxos, e repoñer o ATP. Moitas células tumorais evaden este control a través de mutacións en AMPK ou en vías que afectan a súa activación.

Outra fonte importante de enerxía é a glutamina. A través da glutaminolise, incrementada en moitos tipos de cancro, a glutamina provee de nitróxeno ás células tumorais para a síntese de aminoácidos. Por outra parte, estas células non oxidan completamente a glutamina para obter ATP, senón que a derivan en citrato para producir lípidos, NADPH e malato (que converten en piruvato coa produción de NADPH).

A reprogramación mitocondrial resulta nun aumento da expresión do oncoxene MYC e, como factor de transcrición que é, aumenta tamén a expresión dos seus xenes diana, entre eles a glutaminasa e transportadores de glutamina. Todo dirixido para incrementar a

glutaminolise. Tamén aumenta a expresión da lactato dehidroxenasa, que permite a conversión do piruvato, derivado da glucosa, en lactato (Li *et al*., 2015).

1.2.8 Evasión da destrución inmune

Este tema coméntase máis detidamente no capítulo de inflamación.

Son varios os mecanismos empregados polo tumor para evadir a inflamación anti-tumoral (Hanahan & Coussens, 2012):

- Os leucocitos infiltrados no microambiente tumoral teñen, basicamente, unha actividade inmunosupresora que exercen a través do bloqueo de linfocitos T $CD8^+$ e células NK. Este conxunto celular está formado por células T reguladoras, células mieloides supresoras, macrófagos asociados a tumor (TAMs), neutrófilos e mastocitos. Todas elas contribúen en dotar ás células tumorais cos mecanismos necesarios para evadir a destrución por linfocitos T $CD8^+$.

- Os fibroblastos asociados ao tumor (CAFs), ademais de emitir sinais que favorecen a infiltración das células mencionadas anteriormente, tamén inhiben as células T citotóxicas e as NKs, dificultando o desenvolvemento dunha resposta inmune anti-tumoral.

- Os vasos sanguíneos tumorais mostran unha estrutura anómala, con unións débiles entre as células endoteliais e unha asociación/cobertura deficiente de pericitos, que facilita o tránsito de células a través das súas paredes, pero é incapaz de manter unha afluencia masiva tal que permita a destrución de células tumorais. Por outra parte, esta vasculatura recibe sinais que inhiben a formación de vénulas de endotelio alto (onde normalmente se produce a extravasación de linfocitos) limitando o tránsito de linfocitos T citotóxicos.

2 GLIOBLASTOMA (GB)

A Organización Mundial da Saúde (OMS) inclúe o GB dentro do grao IV (o máis alto) na clasificación de tumores cerebrais. Entre os tumores do sistema nerviso central (SNC), é o máis frecuente e agresivo, cunha esperanza de vida media, dende o diagnóstico ata a morte, de 15 meses. Por sorte, a súa incidencia, a nivel mundial, non é moi elevada, 3,1 de cada 100.000 individuos, se o comparamos coa de outros cancros como o de mama ou de próstata, 171,20 e 201,40 por cada 100.000, respectivamente (Wirsching & Galanis, 2016).

2.1 CLASIFICACIÓN DE GB

En base á presentación clínica existen dous tipos: o primario e o secundario, e ambos xorden de células precursoras que poden ser diferentes. O GB primario xurde *de novo* e mostra disfunción nas vías de p53 e RB, así como na sinalización RTK/RAS/PI3K. Aparece en pacientes maiores e o prognóstico é malo, probablemente polo predominio do xenotipo *IDH1*-salvaxe. *IDH1* é o xene que codifica o enzima isocitrato dehidroxenasa, responsable do control celular do dano oxidativo a través da formación de NADPH (Parsons *et al*., 2008). O GB secundario evoluciona a partir de gliomas de grao II directamente ou a través do grao III. Estes tumores son máis frecuentes en individuos mozos e predomina o xenotipo *IDH1*-mutante, que confire un mellor prognóstico (Dunn *et al*., 2012).

A OMS realizou, no 2016, unha nova clasificación dos tumores cerebrais, que se diferencia da anterior, do 2007, en que non só ten en conta parámetros fenotípicos (histoloxía) para definir a entidade dos tumores, senón que inclúe tamén parámetros xenotípicos. Con esta combinación intentan facilitar os estudos experimentais, clínicos e epidemiolóxicos, así como aumentar a precisión do diagnóstico, mellorar o manexo dos pacientes e conseguir maior exactitude en canto ao prognóstico como á posible resposta ao tratamento. Nesta clasificación podemos atopar subtipos de gliomas difusos baseados na mutación nos xenes *IDH1* e *IDH2*, xunto coa perda da heterocigosidade no cromosoma 1p/19q, e outros parámetros xenéticos (Cadro 1; Louis *et al*., 2016).

2.2 BASE XENÉTICA DO GB

O conxunto dos estudos de secuenciación do xenoma e transcriptoma e estudos epixenéticos das células do GB concluíron que, dentro do mesmo glioma, existen células tumorais que se diferencian tanto a nivel xenético como epixenético. Isto revela un dos maiores desafíos ao que se ten que afrontar as estratexias terapéuticas: a heteroxeneidade xenética dos GB.

A secuenciación do xenoma permitiu identificar as principais vías de sinalización afectadas nos GB: a vía RTK/RAS/PI3K, que afecta á proliferación e supervivencia; a vía de p53, que actúa sobre a sensecencia e/ou apoptose; e a vía de RB, que regula a progresión da fase G1 a S do ciclo celular. As alteracións máis frecuentes en cada unha delas pódense ver na Figura 2 (McLendon *et al*., 2008).

Ademais destas mutacións, atopáronse outras en xenes que nun principio non foron relacionados co GB. O máis frecuente é *IDH1*, común nos gliomas de grao II e III e, como consecuencia, no GB secundario, que evoluciona a partir dos anteriores. É menos habitual no glioma de grao I e no GB primario (Dunn *et al*., 2012). Outros tamén destacables son: *LZTR1*, cuxa inhibición desencadea a auto-renovación e crecemento de neuroesferas; *CTNND2*, que unha vez desactivado é responsable da transformación mesenquimal do GB, un fenotipo altamente agresivo; e o xene fusionado *EGFR-SEPT14*, que confire a capacidade de proliferar, independentemente da presenza de mitóxenos, e activa de forma constitutiva a vía de STAT3 (Frattini *et al*., 2013).

Unha análise da expresión de ARNm do xenoma completo describe un transcriptoma altamente estruturado que reflexa a histoloxía do tumor, as alteracións moleculares e os resultados clínicos. En base a este estudo establécense tres subtipos con diferentes alteracións moleculares: proneural, mesenquimal e clásico (nalgúns casos menciónase un cuarto tipo, neural, que non parece mostrar alteracións xenéticas únicas que o diferencia dos outros tres) (Dunn *et al*., 2012; Quail & Joyce, 2017).

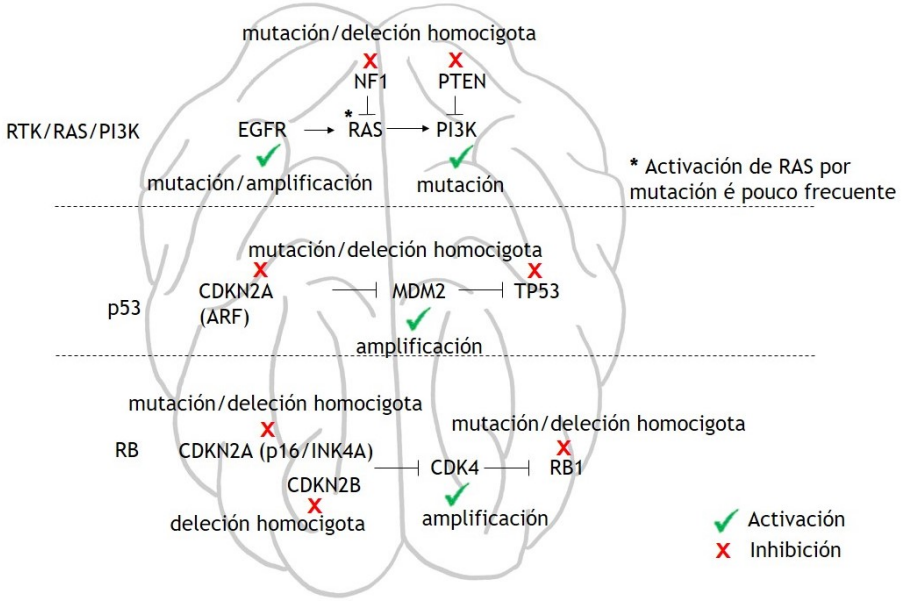


Figura 2| Principais vías afectadas en GB. Diversas mutacións, amplificacións ou delecións desencadean a activación ou inhibición de determinados xenes implicados nas vías RTK/RAS/PI3K, p53 e/ou RB e, como consecuencia, altérase toda a sinalización.

2.3 TERAPIAS EMPREGADAS EN GB

O GB é un tumor altamente resistente á terapia. Os tratamentos convencionais clasifícanse en tres categorías: cirurxía, radioterapia e quimioterapia.

A resección cirúrxica é complexa polo carácter invasivo do GB e pola súa aparición en zonas significativas do cerebro, como as áreas que controlan a fala, as funcións motoras ou os sentidos. A resección completa da masa tumoral primaria non é a cura, porque as células tumorais infiltradas permanecen no tecido cerebral do redor, favorecendo a progresión tardía da enfermidade ou a recorrencia, pero si serve para mellorar a calidade de vida do paciente e prolonga a súa supervivencia. Os beneficios aumentan se a resección se combina coa radio- e quimioterapia. Diversos estudos comprobaron que a aplicación de radioterapia e o axente quimioterapéutico temozolomida (TMZ) despois da cirurxía incrementou a supervivencia polo menos dous anos

no 27,2% dos pacientes, respecto ao 10,9% que só recibiron radioterapia. Nos casos nos que os pacientes non poden someterse a cirurxía ou a quimioterapia, o tratamento con radio mellora igualmente a súa calidade de vida e supervivencia. Intentáronse introducir novas técnicas que mellorasen o control local e limitasen a toxicidade da radio- e quimioterapia, por exemplo, a radioinmunoterapia ou a radiocirurxía con esteriotaxia, entre outros, pero as vantaxes en supervivencia non resultaron ser significativas (Davis, 2016; Rick *et al*., 2018).

Unha nova terapia, coñecida como campos de tratamento de tumores (TTF), está cobrando forza e baséase na aplicación de campos eléctricos sobre o tumor. As células sometidas a TTF mostran alteracións en mitose (Kirson *et al*., 2004), efecto que establece sinerxía co dano no ADN xerado por quimioterápicos, mellorando a eficiencia da quimioterapia. A FDA aprobou o uso de TTF, primeiro en pacientes con GB recorrente e, posteriormente, en diagnósticos recentes (Rick *et al*., 2018). O uso de nanopartículas en GB tamén mostra un gran potencial porque, non só permiten unha maior permeabilidade a través da barreira hematoencefálica e unha mellor dirección cara tipos celulares ou procesos específicos do microambiente tumoral, senón que tamén aumentan a vida media do composto activo dos fármacos e favorecen a súa liberación controlada, continua e local dentro do tecido cerebral (Ozdemir-Kaynak *et al*., 2018). Un exemplo do uso de nanopartículas en GB son as nanopartículas magnéticas, que tras a súa deposición no tumor por inxección intratumoral e a aplicación dun campo magnético alterno externo, emiten calor cun efecto terapéutico (observouse que temperaturas entre 40-44 ˚C teñen un efecto negativo sobre o crecemento tumoral). Este tratamento coñécese como terapia de hipertermia magnética (MHT) e no 2012, en Europa, foi aprobada como terapia adxuvante da radioterapia para GB recorrentes (Mahmoudi *et al*., 2018).

Cadro 1 **Grao de tumores astrocíticos**

	I	II			III			IV		
2007	Astrocitoma pilocítico	Astrocitoma difuso			Astrocitoma anaplásico			Glioblastoma		
	• Baixo potencial proliferativo • Posibilidade de cura despois do resecamento cirúrxico	• Neoplasmas de natureza infiltrativa • Baixo nivel proliferativo pero a miúdo recorrente • Tenden a progresar cara malignidades de maior grao			• Histoloxía maligna • Tratamento: radiación e/ou quimioterapia			• Lesión con malignidade citolóxica • Mitóticamente activa • Neoplasma propenso á necrose asociada á rápida evolución da enfermidade • Resultado fatal		
2016	Suxeriuse suprimir a clasificación dos astrocitomas pilomixoideos ata que novos estudos aclaren o seu comportamento	IDH-salvaxe	IDH-mutante	NOS	IDH-salvaxe	IDH-mutante	NOS	GB, IDH-salvaxe	GB, IDH-mutante	GB, NOS
								Sinónimo	GB 1º	GB 2º
								% de casos	~90	~10
								Lesión precursora	*de novo*	Glioma baixo grao
								Idade dos pacientes	>55	mozos
	Media xeral de supervivencia (meses)							Cirurxía + radioterapia	9,9	24
								Cirurxía + radio + quimio	15	31
								Necrose	Extensa	Escasa
								Promotor *TERT*	72	26
								TP53	27	81
								ATRX	Raro	71
								Amplificación *EGFR*	35	Raro
								PTEN	24	Raro

Diagnóstico reservado

* NOS: lesións con pouca información e non se lles pode asignar un código máis específico

Louis *et al*., 2007, 2016

3 MICROAMBIENTE EN GB

O GB ten unha elevada habilidade para manipular e explotar ao seu favor o tecido cerebral san. É capaz de estimular a anxioxénese e usar a vasculatura existente para o seu proveito; suprime as funcións do sistema inmune para que non obstaculicen o seu desenvolvemento, para iso manipula á microglía e macrófagos conseguindo que deixen de loitar contra todo aquilo que é alleo ao cerebro; obriga aos astrocitos a formar parte do soporte tumoral; e, por último, tamén modifica os elementos da matriz extracelular adecuándoos para o seu proceso de invasión**.**

Esta capacidade de facerse co control do cerebro débese aos múltiples tipos de comunicación que establece entre as súas propias células tumorais, e entre estas e as células normais circundantes. Este diálogo realízase a través da segregación de factores solubles, tales como TGFβ, IL6, Notch, PDGF, EGF, VEGF e SDF1 entre outros, ligandos que actúan a través dos seus receptores específicos localizados en células diana; ou a través de factores non segregados: elementos inorgánicos, elementos xenéticos (ARNs e ADN), proteínas (factores de transcrición) ou organelas celulares que as células do GB son capaces de depositar nas células do redor. Esta rede de comunicación realízase a través de distintas estruturas (Broekman *et al*., 2018):

- Unións *gap*: Forman poros de 24 nm de diámetro entre células adxacentes que están en contacto físico. Permite o intercambio de pequenas moléculas: Ca^{+2}, ATP, metabolitos, miARN.

- Vesículas extracelulares: A través da fusión coa membrana plasmática favorecen o intercambio de proteínas non segregables, tales como factores de transcrición, ARN, ADN, lípidos e metabolitos. Pódense diferenciar en: exosomas (50 – 10 µm), microvesículas (100 – 200 µm) e oncosomas (1 – 10 µm).

- 'Túneles': que forman un continuo núcleo-citoplasma coas células veciñas facilitando o transporte de distintas moléculas e organelas. Existen os nanotúbulos (50 – 200 nm de ancho, 5 µm de

largo) que se estenden dende as células e forman no seu extremo, ou ben vesículas, ou ben unións *gap* con outra célula; e os microtúbulos (1 - 2 µm de ancho, máis de 500 µm de largo) que se estende dende unha células e comunícanse con outra a través das unións *gap*.

O conxunto destes sistemas é o modo que atopa o tumor para recrutar células saudables, modificar o seu fenotipo e promover o seu crecemento, sustento e invasión. Permítelle xerar un microambiente capaz de adaptarse a calquera tipo de cambios e aumentar así as súas opcións de supervivencia ante os ataques terapéuticos.

3.1 COMPOÑENTES DO MICROAMBIENTE

O tumor sólido deixou de ser unha simple masa de células cancerosas para converterse nun tecido moito máis complexo, onde se acollen distintos tipos celulares que interaccionan unhas con outras dun xeito heterotípico. Ademais de contar coas células tumorais, responsables de iniciar e dirixir a progresión do tumor, tamén aparecen en escena distintos tipos de células normais, que son recrutadas para formar o estroma asociado ao tumor e actúan como participantes activos na tumoroxénese (Figura 3).

3.1.1 Matriz extracelular (ECM)

A matriz extracelular é unha estrutura complexa que comprende o 20% do volume do tecido. A interacción que se establece entre o glioma, o cerebro e a ECM, xunto coa microvasculatura, adxudícalle esa natureza infiltrativa tan agresiva que caracteriza ao GB debido a que facilita a propagación do tumor no parénquima. Tamén regula a dispoñibilidade e actividade de determinados factores de crecemento, tales como quimioquinas e TGFβ, que se almacenan na matriz ou están unidos a compoñentes desta.

As células do glioma pódense infiltrar a través de fibras nerviosas mielinizadas, da membrana basal dos vasos sanguíneos, por debaixo do epéndima e en zonas perineurais. Tamén se poden diseminar polo líquido cefalorraquídeo ou as meninxes, pero unha metástase “real” extraneural é unha situación moi excepcional. Son poucos os casos descritos e parece que os órganos específicos para este tipo de metástase

son os pulmóns, órganos brandos e os ósos (Mawrin & Seidenbecher, 2014; Pereira *et al*., 2018). É probable que a baixa taxa de metástase en GB sexa debido a que o período, dende o diagnóstico da enfermidade ata a morte do paciente, é moi curto e non da tempo a que se produza todo o proceso que unha diseminación, a esa escala, implica.

A matriz extracelular divídese en dous grupos: a ECM parenquimal, formada, principalmente, por unha malla tridimensional de ácido hialurónico sobre a que se asentan proteoglicanos e glicoproteínas de orixe glial e neuronal; e as membranas basais, localizadas ao redor dos vasos sanguíneos e sobre os límites da glía, e compostas por unha mestura de coláxenos especializados, glicoporteínas e moléculas de adhesión.

Os principais compoñentes son (Mawrin & Seidenbecher, 2014; Pereira *et al*., 2018):

- Ácido hialurónico (HA): É o glicosaminoglicano principal da ECM cerebral, responsable da estrutura e ensamblaxe do tecido. A súa concentración aumenta na maioría dos gliomas e favorece a proliferación, motilidade e invasión das células tumorais.

  - Receptor de ácido hailurónico: As células do glioma expresan grandes cantidades destes receptores para establecer contactos co HA e invadir o tecido cerebral.

  - Hialuronidasas: Son enzimas que degradan o ácido hialurónico e que, de maneira indirecta, promoven o establecemento do tumor porque os fragmentos de HA poderían contribuír á anxioxénese.

- Proteoglicanos: Moléculas que regulan o medio extracelular e a interacción que se establece entre as células, o microambiente e a ECM.

- Glicoproteínas: A ECM cerebral é moi rica en diferentes glicoproteínas que interveñen no proceso de desenvolvemento e na plasticidade inducida pola actividade das células neuronais.

- Integrinas: Son os principais receptores dos compoñentes proteicos da ECM. Median a adhesión das células coa matriz e, en menor medida, a adhesión célula-célula. Debido a esta función, en GB participa na proliferación, motilidade e migración celular.

- As proteasas, xunto coas glicosidasas (que catalizan a hidrólise de carbohidratos como glicoproteínas e glicosaminoglicanos), modulan a matriz extracelular e a adhesión desta coa célula tumoral, inflúen no citoesqueleto destas últimas e liberan factores de crecemento e quimiotácticos que activan as células do glioma.

As proteasas non só son responsables da ruptura dos compoñentes proteicos da ECM, senón que tamén poden activar factores de crecemento auto- e paracrinos, factores quimiotácticos e estruturas intracelulares relacionadas co crecemento, supervivencia e invasión das células tumorais. Ademais das células do glioma, outras como as endoteliais, células nai e microglía tamén producen grandes cantidades deste enzima.

A malla que forma a matriz extracelular sufre unha reorganización durante a maduración do cerebro. Durante a fase xuvenil, a ECM, formada principalmente polos proteoglicanos neurocan, brevican (proteoglicanos específicos do SNC) e tenascina-C, é flexible e favorece a plasticidade estrutural do desenvolvemento. En cambio, na etapa adulta, a ECM é máis ríxida, menos permisiva e diminúe a cantidade destes proteoglicano. Observouse que, durante a gliomaxénese, este proceso revértese e o cerebro perde algunhas das características propias da maduración: atópase aumentada a expresión de brevican, neurocan e tenascina-C (Mawrin & Seidenbecher, 2014). Esta característica máis xuvenil, xunto coa rixidez que lle confire o aumento de HA, confírelle ao glioma un ambiente adecuado para prosperar e invadir o tecido adxacente.

3.1.2 Células endoteliais e vasos sanguíneos

O crecemento tumoral debe ir acompañado do proceso de anxioxénese, dado que a vasculatura favorecen a liberación de O_2 e nutrientes, a modulación da resposta inmune, a diseminación de células

tumorais e proporciona unha barreira que compartimenta o tumor. Para conseguir este obxectivo, o GB libera factores pro-anxioxénicos e factores que, na matriz extracelular, inducen unha proliferación agresiva das células endoteliais. Ademais, tamén se observou que as células iniciadoras de tumor (TICs), localizadas normalmente cerca de células endoteliais, no que se coñece como nicho perivascular, non só promoven a anxioxénese a través da segregación de VEGF, senón tamén a través da súa capacidade de transdiferenciarse a células endoteliais (Broekman *et al*., 2018; Ricci-Vitiani *et al*., 2010; Soda *et al*., 2011). Esta conexión entre as células, crítica no contexto de GB, tamén se atopa en condicións normais: as células nai neurais (derivadas do ectodermo) están equipadas cunha plasticidade tal, que lles permite diferenciarse a células dunha estirpe completamente diferente, como son as células endoteliais (derivadas do mesodermo; Wurmser *et al*., 2004).

Os novos vasos sanguíneos que se forman no tumor son diferentes aos vasos normais que podemos atopar nunha rexión non afectada. Mostran unha estrutura sinuosa e desorganizada, son altamente permeables e presentan anormalidades en canto á parede endotelial, á cobertura dos pericitos e á membrana basal. Todo isto contribúe á perda da barreira hematoencefálica (Soda *et al*., 2011).

3.1.3 Neuronas

O cadro clínico dun paciente de GB pode incluír: convulsións epilépticas, disfuncións cognitivas importantes, deterioro da memoria e cambios de personalidade. Todos estes síntomas manifestan o efecto do tumor sobre a rede neuronal. Un efecto que se debe tanto á presión mecánica que exerce a masa, como ao conxunto de distintas moléculas liberadas (glutamato, factores neurodexenerativos) que se combinan cos complexos mecanismos de sinalización celular.

Por outra parte, os neurotransmisores e factores liberados pola actividade neuronal, poden actuar como mitóxenos para as células tumorais, favorecendo o crecemento do glioma, e participar no proceso de invasión (Broekman *et al*., 2018).

3.1.4 Astrocitos e outras células gliais

Case a metade das células que forman o cerebro de mamíferos son astrocitos. Estas células xogan un papel importante na fisioloxía do SNC: separan a sustancia gris en distintos dominios, sustentando, así, a rede neuronal; aumentan a capacidade de mielinización da sustancia branca; e participan na formación, desenvolvemento e mantemento dos circuítos neuronais. Os astrocitos, a través das súas elongacións, tamén favorecen a comunicación con outras células neurais, a reciclaxe de neurotransmisores, e recoñecen a demanda metabólica das células. Ademais, forman parte da barreira hematoencefálica, e son capaces, tanto de axustar a concentración de Ca^{+2} en resposta aos niveis de actividade glutamatérxica en sinapses, como de liberar gliotransmisores que actúan sobre o músculo liso vascular para regular o fluxo sanguíneo cerebral.

En GB (e noutras patoloxías do SNC) estas células transfórmanse en astrocitos reactivos, caracterizados por hipertrofia, aumento de filamentos intermedios (nestina, vimentina e GFAP) e activación da proliferación. Tamén liberan citoquinas, quimioquinas, óxido nítrico e outras moléculas que aumentan a resposta neuroinflamatoria e favorecen a malignidade do tumor (Guan *et al*., 2018).

A formación de astrocitos reactivos pode regularse a través da vía NF-κB, e observouse que, na comunicación que se establece entre as células do GB e os astrocitos reactivos, ten un papel importante p53: as células tumorais dificultan a expresión deste supresor tumoral nos astrocitos, promovendo a súa proliferación, e, a súa vez, un p53 pouco efectivo xera un ambiente propicio para a prosperidade do tumor (Guan *et al*., 2018). Por outra parte, a activación de oncoxenes, por exemplo *RAS*, dirixe a transformación de astrocitos en células neoplásicas, o que favorece a adquisición, por parte do tumor, de novas células, supoñendo un impulso para o seu crecemento (Broekman *et al*., 2018).

3.1.4.1 Oligodendrocitos

Pouco se coñece da relación que manteñen os oligodendrocitos e o GB, e os datos existentes son contraditorios. Un estudo atribúelle ás células proxenitoras de oligodendrocitos (OPCs) un papel favorecedor para o glioma, a través da segregación de factores de crecemento e

citoquinas, que inducen o fenotipo *stemness* en células tumorais, e a concesión de quimio- e radioresistencia (Hide *et al*., 2018). Por outra parte, tamén se lles adxudica un rol represor: inhiben o crecemento tumoral, por vía paracrina, a través da sinalización de WIF1 (Asslaber *et al*., 2017).

3.1.4.2 Microglía

Deriva de proxenitores inmaturos do saco vitelino, durante o desenvolvemento embrionario temperá, e mantéñense no cerebro por auto-renovación. Representa o 10–15% das células do cerebro, e xoga un papel importante na defensa fronte a patóxenos e estímulos nocivos.

En condicións normais, as únicas células con función inmune, no parénquima do SNC, é a microglía. Incluso estando en estado de repouso, monitorizan activamente o seu entorno a través da extensión e retracción dos seus procesos celulares, mentres que mantén estático o corpo celular. Cando detecta un patrón molecular asociado a un patóxeno ou a algún tipo de dano, actívase e adquire unha morfoloxía ameboide. Aumenta a expresión de moléculas da clase II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), incrementando, así, a súa capacidade para presentar antíxenos aos linfocitos T; segrega citoquinas proinflamatorias, como TNFα, IL6 e IL1β; e aumenta a expresión da óxido nítrico sintasa (NOS), para producir óxido nítrico e destruír os patóxenos (Galvão & Zong, 2013).

No GB, as células da microglía representan o 30% da masa, e promoven a proliferación e invasión a través da segregación de citoquinas e factores da inmunidade adaptativa (Guan *et al*., 2018).

Entre as células endóxenas do cerebro: astrocitos, oligodendrocitos e a microglía, e as células do GB establécese unha relación, mediada por citoquinas, que abarca dende sinais estimuladoras ata outras inhibidoras para o desenvolvemento tumoral.

3.1.5 Microambiente inflamatorio

O SNC monitoriza e coordina as funcións dos órganos internos. Necesita, polo tanto, estar moi protexido fronte a ameazas externas e internas. A nivel anatómico, está protexido polo líquido cefalorraquídeo

e as meninxes, que rodean o cerebro e a medula espiñal. A protección fronte á entrada de patóxenos, células inmunes circulantes e factores sanguíneos venlle conferida pola barreira hematoencefálica, formada por unións moi estreitas entre as células do endotelio cerebral, a súa lámina basal e os pés dos astrocitos. Todas estas estruturas fan do cerebro un órgano toleroxénico, incapaz de inducir e manter unha resposta inmune. É un órgano inmuno-privilexiado. Esta protección fronte ás células inmunes ten unha razón de ser: estas células producen citoquinas que poden ter efectos neurodexenerativos; ademais, o cranio supón unha barreira física ao inchazón que normalmente acompaña ás reaccións inflamatorias. Estes aspectos requiren que a interacción entre os dous sistemas, o nervioso central e o inmune, se dea baixo condicións moi reguladas. Un problema que a natureza resolveu a través do sistema linfático menínxeo, onde drena o líquido cefalorraquídeo e o líquido intersticial que circula polo parénquima cerebral ata os nódulos linfáticos cervicais profundos. É nestes nódulos onde se produce a activación dos linfocitos T tras o contacto co antíxeno (Louveau *et al*., 2015; Quail & Joyce, 2017). A cara negativa deste privilexio é que os estadios temperás do glioma transcorren nun ambiente inmunosuprimido, o que se suma á capacidade do propio tumor de evadir a vixilancia inmune.

A presenza de antíxenos do GB, foráneos no microambiente dun cerebro saudable, é detectado pola microglía, que se activa e segrega factores pro-inflamatorios, como a citoquina IL1β, que modulan a barreira hematoencefálica e permiten a entrada ao SNC de células inmunes derivadas da medula ósea, tanto da inmunidade innata como adaptativa (Galvão & Zong, 2013).

3.1.5.1 GB e as células da inmunidade innata

3.1.5.1.1 Monocitos e Macrófagos

Os macrófagos asociados ao tumor poden derivar, a partir da microglía na fase temperá da progresión tumoral, ou dunha mestura de microglía, monocitos e macrófagos infiltrados xa nunha etapa máis tardía. O recrutamento é posible grazas a un gradiente de citoquinas e

quimioquinas liberadas polas células tumorais. Deste xeito establécese unha comunicación bidireccional, porque a microglía e os macrófagos segregan, a súa vez, tamén factores que aumentan a infiltración de monocitos. Implántase un bucle de retroalimentación positiva que favorece a entrada continua de células mieloides.

A combinación de factores liberados polo GB, así como o momento da segregación, determinan o estado de activación e a función dos TAMs. Unha visión clásica define dous tipos de macrófagos: M1 ou supresores tumorais e M2 ou favorecedores da progresión. Pero todo resulta moito máis complexo que este simple sistema binario.

Estas células contribúe á progresión tumoral porque, por unha parte, inducen a anxioxénese a través da segregación de factores pro-anxioxénicos como EGF e VEGF, e, por outra, remodelan a ECM. Observouse que as células do glioma segregaban unha metaloproteinasa na súa forma inactiva, pro-MMP2, pero tamén inducen a expresión de MMP14 por parte da microglía. MMP14 rompe a molécula pro-MMP2 transformándoa na súa forma activa, MMP2, capaz de degradar a matriz extracelular (Broekman *et al*., 2018).

3.1.5.1.2 Mastocitos

Participan na resposta innata e adaptativa. Son recrutados a través de SDF1 e activados por estímulos derivados do tumor. Esta activación implica a produción de factores (IL6, IL8, VEGF, TNF) que favorecen o crecemento tumoral e a anxioxénese (Broekman *et al*., 2018).

3.1.5.1.3 Neutrófilos

Son unha fonte importante de citoquinas que contribúen á infiltración de máis neutrófilos e tamén de monocitos, o que contribúe, de forma indirecta, á progresión tumoral, pois aumenta o número de TAMs nas inmediacións do tumor (Broekman *et al*., 2018).

3.1.5.1.4 Células NK

As células NK representan só un 2,11% das células inmunes infiltradas no glioma; a poboación menos abundante (Kmiecik *et al*., 2013). Son linfocitos granulares que segregan citoquinas e quimioquinas que participan na resposta inmune. Por outra parte, teñen

a capacidade de recoñecer e "asasinar" células diana, como aquelas que están infectadas ou transformadas, sen unha activación previa e a través de dúas vías independentes: a vía de perforina/granzima ou a asociada aos complexos ligando-receptores de morte, tales como FasL e TRAIL (Backes *et al*., 2018; Chávez-Galán *et al*., 2009; Wajant, 2002; Wang & El-Deiry, 2003).

Existen inmunoterapias fronte a GB centradas no uso de células NKs. Estas mostraron unha maior citotoxicidade fronte ao tumor que as terapias baseadas noutro tipo de células inmunes, e, ademais, emerxen como unha alternativa menos tóxica que a radio- e quimioterapia (Lee *et al*., 2015; Zhu *et al*., 2018).

3.1.5.2 GB e as células da inmunidade adaptativa

As células do sistema inmune innato interaccionan directamente coas células do GB, e presentan un papel importante na activación da resposta inmune adaptativa. Cando falamos deste tipo de inmunidade, estamos facendo referencia aos linfocitos T e B, que nun contexto como o que aquí se presenta, poden exercer efectos anti-tumorais a través de dous mecanismos: unha gran expansión a partir de pequenas poboacións de células precursoras antíxeno-específicas, e a súa diferenciación, que as capacita cunha actividade inmunolóxica efectora.

3.1.5.2.1 Linfocitos T

Os antíxenos tumorais viaxan dende a localización do GB ata a superficie do cerebro a través do fluído intersticial. Dende aquí, pasan ao líquido cefalorraquídeo directamente ou asociados á microglía, que actúa como célula presentadora de antíxenos (APC). Parte do líquido cefalorraquídeo drena a través do sistema linfático menínxeo ata os nódulos linfáticos cervicais profundos. Nestes ganglios ten lugar a interacción destas APCs cos linfocitos T, que se activan en contacto co antíxeno tumoral e quedan marcados co tropismo cerebral. As células T entran no torrente sanguíneo e viaxan ata o cerebro, onde poden acceder gracias aos efectos da inflamación. O crecemento invasivo do glioma, e os factores liberados polas súas células, inducen un ambiente inflamatorio que contribúe aos cambios que sufre a vasculatura

cerebral, permitindo o recrutamento de linfocitos T e outras células inmunes.

Unha vez alcanzado o tumor, as células T desencadean un efecto estimulador ou inhibidor sobre o mesmo, dependendo do conxunto dos mecanismos reguladores da inmunidade (Broekman *et al*., 2018).

TGFβ é un factor inmunosupresor moi abundante no microambiente do glioma. É responsable da expresión de *ITGAE* en linfocitos T citotóxicos, xene que codifica a proteína αE integrina, importante para a retención destas células no cerebro; pero tamén de diminuír a capacidade das células T de expresar moléculas efectoras (granzima B e IFNγ), reducindo así a súa eficiencia contra o GB. Non conforme con producir este e outros factores, as células tumorais tamén inducen a expresión de TGFβ e IL10 nos pericitos, que interactúan cos linfocitos T e conseguen que reduzan a expresión de moléculas co-estimuladoras. En conxunto, todos estes factores tamén favorecen a reclusión de APCs toleroxénicas e linfocitos T reguladores, cuxa principal función é eliminar a inmunidade. Todos estes mecanismos supoñen a transformación dos linfocitos T a un estado disfuncional (Broekman *et al*., 2018).

Son cinco os mecanismos descritos polos que as células T poden alcanzar dito estado disfuncional en GB: a través da senescencia, como consecuencia da erosión dos telómeros (inducido, a súa vez, por unha proliferación crónica ou por dano no ADN, como consecuencia dun aumento de especies reactivas de osíxeno); da tolerancia, como é o caso das células T reguladoras; da anerxia, que consiste na inactivación permanente destes linfocitos tras o seu encontro co antíxeno; do esgotamento, polo que se acade un estado hiporeactivo por unha exposición repetida a un antíxeno en condicións subóptimas; e a través da ignorancia, que consiste en que linfocitos T competentes son incapaces de conseguir unha resposta inmune productiva (Woroniecka *et al*., 2018).

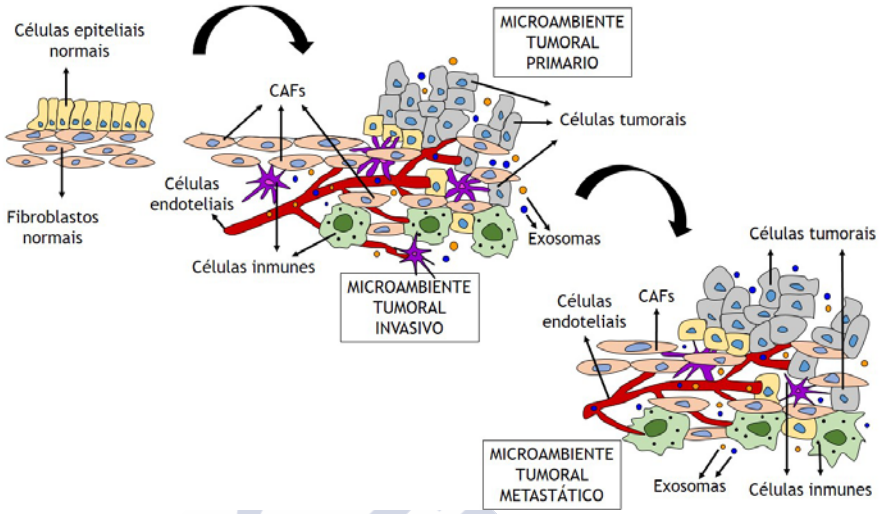


Figura 3| Microambiente do tumor primario e diseminación de células cancerosas ao órgano/tecido secundario. A masa tumoral non está formada só por células cancerosas, senón que conta coa participación de distintos tipos de células normais recrutadas, que axudan a promover o crecemento e a progresión tumoral, así como o proceso de metástase.

4 INFLAMACIÓN

A palabra inflamación provén do latín *inflammatio*, que significa incendio/entre chamas, e cambiou de significado cando se introduciu na literatura médica para describir a inchazón e quecemento dun órgano interno.

Trátase dunha resposta inmune natural ante unha infección ou dano tisular. En función da especificidade no recoñecemento de antíxenos e o tempo de activación, o sistema inmune divídese en dous tipos: innato e adaptativo. Ambos están intimamente relacionados para ofrecer unha protección máis óptima.

4.1 SISTEMA INMUNE INNATO

O sistema inmune innato é a primeira liña de defensa contra unha infección. Desencadea unha resposta non específica, que é máxima inmediatamente despois da exposición, e non se ve intrinsecamente afectada por un contacto previo co axente infeccioso (sen memoria inmunolóxica).

4.2 SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

O sistema inmune adaptativo está formado polos linfocitos B, os linfocitos T colaboradores $CD4^+$ e os linfocitos T citotóxicos $CD8^+$. Todos eles caracterízanse pola súa especificidade ao antíxeno e a súa capacidade de xerar memoria inmunolóxica tras a súa exposición.

Existe un amplo repertorio de linfocitos, en función dos receptores antíxeno-específicos que expresan, que proporcionan un amplo rango de respostas a patóxenos.

- Os linfocitos B exercen a súa función a través da segregación de anticorpos con elevada especificidade.

- Os linfocitos T exercen a súa función a través da produción de citoquinas. Existen varios subtipos, entre eles, os linfocitos $CD4^+$ ou colaboradores, que cooperan cos linfocitos B; e os linfocitos $CD8^+$ ou citotóxicos, responsables da destrución daquelas células que expresan o antíxeno específico.

A cinética da inmunidade adaptativa é máis lenta que a da innata, porque é necesaria unha expansión clonal dos linfocitos para conseguir un número suficiente de células T e/ou B antíxeno-específicas. Tras a exposición inicial, parte dos linfocitos diferéncianse en células memoria, de vida media longa, que permiten unha maior reactividade nun contacto posterior co mesmo antíxeno (de Visser & Coussens, 2006).

4.3 INFLAMACIÓN AGUDA

A inflamación aguda é un proceso que consta de varios pasos. Iníciase coa estimulación da resposta inmune innata e a activación, posterior, dunha cascada de eventos inmunolóxicos que resultan na liberación de mediadores pro-inflamatorios, tales como citoquinas e proteasas. Deseguido prodúcese a activación do sistema inmune adaptativo, máis específico, e a eliminación do patóxeno ou célula aberrante. Finalizado o proceso inflamatorio, restablécese a integridade do tecido e a homeostase.

4.4 INFLAMACIÓN CRÓNICA

Se a causa que desencadeou a resposta inflamatoria non se resolve, a inflamación aguda evoluciona ata unha inflamación crónica con efectos deleterios para o organismo: dano tisular, enfermidades autoinmunes e, incluso, crecemento tumoral.

Unha serie de condicións axudan ao desenvolvemento da inflamación crónica. Unha delas é o desequilibrio de citoquinas a favor dunha inmunidade pro-humoral, caracterizada pola presenza de linfocitos Th2 que segregan citoquinas anti-inflamatorias, activadoras de linfocitos B. A inmunidade pro-celular, representada por linfocitos Th1 que segregan citoquinas pro-inflamatorias, estimuladoras de macrófagos e linfocitos T $CD8^+$, queda relegada a un segundo plano. Outro requisito é o aumento do número de células T reguladoras, que xogan un papel anti-inflamatorio e inmunosupresor importante para suprimir a resposta inmune unha vez que se eliminou o invasor.

A exposición continua do tecido ás células inmunes activadas e aos seus efectores solubles fai que se vexa sometido a un exceso de remodelación, perda da arquitectura debido á destrución e, en determinadas ocasións, a un estado neoplásico (de Visser & Coussens, 2006; Galvão & Zong, 2013).

4.5 INFLAMACIÓN E CANCRO

A influencia do sistema inmune na tumoroxénese depende da interacción que se establece entre as células xeneticamente alteradas, as células da inmunidade innata e adaptativa, os seus mediadores solubles e os compoñentes estruturais presentes no microambiente neoplásico.

Mentres que a inflamación aguda pode recoñecer os antíxenos específicos do tumor e activar a función efectora para erradicar as células tumorais, a inflamación crónica pode ter un efecto oposto: un efecto pro-tumoral. Pode actuar directamente sobre as células neoplásicas xerando dano no ADN, a través da produción de especies reactivas de osíxeno (ROS) e especies reactivas de nitróxeno (RNS), ou interferindo nas vías de sinalización paracrinas; ou indirectamente activando a anxioxénese, a remodelación do tecido e a supresión da resposta inmune adaptativa anti-tumoral.

A inclinación da balanza, cara a resposta inmune aguda anti-tumoral ou a resposta inmune crónica pro-tumoral, vai depender do contexto no que se desenvolve o tumor (de Visser & Coussens, 2006).

O primeiro indicio de que existía unha asociación entre cancro e inflamación tivo lugar no século XIX, cando Rudolf Virchow observou a presenza de leucocitos en tumores. Actualmente está aceptado que o microambiente inflamatorio é un compoñente importante dos tumores.

4.5.1 Tipos de inflamación no cancro

Cando se fala de inflamación en relación coa tumoroxénese diferéncianse catro tipos (Grivennikov *et al*., 2010):

- Inflamación crónica asociada a unha infección ou unha enfermidade autoinmune que pode desembocar no desenvolvemento dun tumor. É posible a través da indución de mutacións oncoxénicas, inestabilidade xenómica, promoción temperá do tumor e aumento da anxioxénese.

Son varios os estudos epidemiolóxicos que asocian a inflamación crónica coa predisposición ao cancro, entre eles, a enfermidade inflamatoria intestinal pode desencadear cancro colorrectal; a pancreatite esporádica ou hereditaria, o cancro pancreático; e a prostatite, o cancro de próstata. Noutros casos, son axentes infecciosos os que activan unha inflamación crónica que remata en tumor. Por exemplo, *Helicobacter pylori* pode orixinar cancro gástrico; o virus da hepatite C ou B, carcinomas hepáticos; e o virus do papiloma humano, cancro cervical. Estes patóxenos poden inducir a oncoxénese

directamente, a través da alteración xenética das células infectadas, ben activando proto-oncoxenes ou integrando e inducindo a expresión de oncoxenes virais; ou de forma indirecta, inducindo a inflamación crónica coa produción continua de ROS, factores de crecemento, citoquinas pro-inflamatorias e proteasas extracelulares que regulan a remodelación tisular, proliferación e anxioxénese (de Visser & Coussens, 2006).

Agora ben, como é habitual, existen excepcións á regra: no caso da artrite reumatoide (inflamación persistente das articulacións) ou psoriase (inflamación crónica da pel) non se observou que os pacientes presentasen un aumento significativo do risco de padecer cancro. O motivo podería ser a exposición dos órganos cerrados, como o tracto gastrointestinal ou fígado, a carcinóxenos alimentarios e ambientais que nunca chegan ás articulacións ou á pel (Grivennikov *et al*., 2010). Isto lévanos ao seguinte tipo de inflamación.

- Inflamación crónica de baixo grao asociada á exposición a irritantes ambientais ou á obesidade. Neste caso o desenvolvemento tumoral ten lugar a través das mesmas vías que mencionamos no punto anterior: indución de mutacións oncoxénicas, inestabilidade xenómica, promoción temperá do tumor e aumento da anxioxénese.

- Inflamación asociada á tumoroxénese. A maioría dos cancros sólidos desencadean unha resposta inflamatoria intrínseca que vai da man co seu desenvolvemento, xerando un microambiente favorable para o seu crecemento en cada un dos seus estadios. Favorece a inestabilidade xenómica, aumenta a neovascularización, é responsable da inmunosupresión local e favorece o proceso de metástase.

- Resposta inflamatoria inducida pola terapia contra o cancro. A radio- e a quimioterapia causan morte masiva tanto de células malignas como do tecido do redor. Este feito desencadea unha reacción inflamatoria análoga á que sucede na cicatrización de feridas.

Durante a terapia, e debido á necrose das células, prodúcense residuos que estimulan a produción de citoquinas en células inflamatorias. Estas citoquinas activan xenes que favorecen a

supervivencia das células tumorais residuais e confírelles resistencia para as seguintes sesións terapéuticas. Este efecto pro-tumoral vese contrarrestado polo feito de que a inflamación aumenta a presentación de antíxenos tumorais e, con elo, estimula a resposta inmune anti-tumoral que mellora os resultados terapéuticos. Dúas caras dunha mesma moeda.

4.5.2 Papel da inflamación no cancro

Sexa cal sexa o tipo de inflamación que actúa xunto ao tumor, está claro que participa en todas as etapas da tumoroxénese, asegurándose de que o desenvolvemento, crecemento e expansión teñan lugar.

4.5.2.1 Etapa inicial

Na etapa inicial, a inflamación xera un microambiente altamente mutáxeno. As células inflamatorias activas producen grandes cantidades de ROS e intermediarios reactivos de nitróxeno (RNI), así como citoquinas que actúan sobre as células premalignas aumentando tamén os seus niveis de ROS e RNI. É ben coñecido o efecto daniño destas moléculas sobre o ADN e a inestabilidade xenómica. O aumento da taxa de mutación incrementa a probabilidade de que se vexan afectados xenes involucrados na reparación do ADN e supresores tumorais e isto, xunto co efecto inactivador de ROS sobre enzimas de reparación, fai que a mutaxénese inducida pola inflamación sexa moi elevada (Grivennikov *et al*., 2010).

4.5.2.2 Promoción do tumor

Durante a etapa de promoción do tumor, as citoquinas producidas polas células inmunes infiltradas no tumor activan os factores de transcrición NF-κB e STAT3 nas células tumorais, que regulan a produción de mediadores inflamatorios capaces de recrutar máis células inflamatorias. As citoquinas tamén activan estes factores de transcrición nas células inflamatorias e nas células do estroma, aumentando os niveis destes mediadores e orixinando un microambiente inflamatorio asociado ao tumor que favorece o seu desenvolvemento: promove a proliferación e supervivencia celular; o mecanismo de transición epitelio-mesénquima; anxioxénese e

linfoanxioxénese; migración, invasión e metástase das células tumorais; inhibición da inmunidade adaptativa; e altera a resposta a hormonas e axentes quimioterápicos (Mantovani *et al*., 2008).

NF-κB e STAT3 actúan como nexo de unión entre a inflamación e o cancro. As dúas proteínas atópanse activadas de forma persistente en moitos cancros (en contra do que sucede en condicións normais, onde a súa regulación está fortemente controlada) e comparten a expresión de xenes involucrados na proliferación, anti-apoptose, anxioxénese e metástase. Todos eles favorecen o desenvolvemento e o crecemento tumoral.

A interacción entre ambas prodúcese a distintos niveis. Por unha parte, NF-κB transcribe xenes que codifican factores inflamatorios que son activadores de STAT3, como por exemplo IL6; e por outra, en tumores, STAT3 contacta directamente con NF-κB atrapándoo no núcleo e contribuíndo a súa activación constitutiva (Yu *et al*., 2009).

4.5.2.2.1 NF-κB

A sinalización de NF-κB é a principal responsable da carcinoxénese inducida por inflamación e da inmunidade anti-tumoral.

A familia de NF-κB está formada por NF-κB1 p50, NF-κB2 p52, RELA (p65), RELB e c-REL. Estas proteínas atópanse normalmente no citosol na súa forma inactiva, formando complexos con membros da familia de inhibidor de κB (IκB). Esta familia inclúe a IκBα e varias proteínas relacionadas, como p105 e p100.

A activación de NF-κB ten lugar a través de dúas vías: canónica e non-canónica, que se diferencian tanto nos integrantes da sinalización como na función biolóxica (Sun, 2017).

- Vía canónica: A estimulación dos receptores de citoquinas, de antíxenos ou da familia de receptores do factor de necrose tumoral (TNFR) activa a quinasa TAK1. Esta quinasa activa IKK (quinasa IκB trimérica) que, a súa vez, fosforila IκBα ou p105. Estas proteínas fosforiladas son ubiquitinizadas e degradadas polo proteosoma e liberan os membros da familia de NF-κB: os dímeros NF-κB1 p50-RELA e

NF-κB1 p50-c-REL, que se trasladan ao núcleo para exercer de factores de transcrición. Nalgúns tipos celulares, p105 non é degradado, senón procesado para formar NF-κB1 p50, que contribúe ao traslado ao núcleo de NF-κB1 p50, RELA e c-REL.

Trátase dunha activación rápida e transitoria.

- Vía non-canónica: Neste caso a vía só é estimulada a través de TNFR que activa a quinasa NIK. Esta quinasa fosforila e activa a IKKα, que actúa sobre p100 marcándoo para ser procesado e converterse en NF-κB2 p52. Esta molécula permite o traslado ao núcleo dos membros da familia NF-κB asociados a p100, fundamentalmente RELB.

Neste caso a activación é máis lenta, pero persistente.

Estudos recentes demostraron a importancia da vía non-canónica de NF-κB na regulación da función inmune, e os seus desaxustes contribúen á patoxénese das enfermidades inflamatorias (Sun, 2017).

NF-κB ten, basicamente, un papel pro-inflamatorio. Nos promotores da maioría dos xenes que codifican citoquinas e quimioquinas atopáronse lugares de unión específicos para este factor de transcrición. Ademais, a súa activación é necesaria para que, nunha resposta inmune ou inflamatoria, se induza a produción e segregación destes factores solubles. Pero tamén se pode asociar con efectos anti-inflamatorios, papel que se lle atribúe, sobre todo, polo seu efecto sobre a expresión de proteínas anti-apoptóticas.

En canto a súa función en oncoxénese, basicamente exerce efectos pro-tumorais: promove a expresión de xenes relacionados coa proliferación e estimula a transcrición da ciclina D1 e doutras ciclinas da fase G1 do ciclo celular; regula a expresión de proteínas anti-apoptóticas, de maneira que prevén a eliminación de células xeneticamente alteradas; controla a expresión de moléculas de adhesión; intervén no mecanismo de transición epitelio-mesénquima (EMT) a través da indución dos factores de transcrición TWIST e SNAIL; e dirixe os procesos de diferenciación e especialización celular. A nivel de microambiente, promove a expresión de citoquinas e

quimioquinas que establecen un microambiente inflamatorio co recrutamento de células inflamatorias e células do sistema inmune. Tamén se atoparon efectos negativos sobre o tumor en cancro de pel e carcinoma hepatocelular, onde parece que intervén sobre a senescencia e controla a proliferación e invasión celular (Ben-Neriah & Karin, 2011; Karin *et al*., 2002).

4.5.2.2.2 STAT3

A vía de sinalización de STAT3 foi descuberta nun contexto normal de sinalización de citoquinas. Unha descrición máis detallada da proteína, así como da súa vía de sinalización, realízase no apartado de citoquinas.

Actualmente tamén se lle outorga un papel importante na regulación do microambiente inflamatorio pro-tumoral, a través do control da expresión de citoquinas, quimioquinas e outros mediadores responsables. Dado que os receptores destes factores solubles tamén activan a mesma vía de STAT3, establécese un bucle de retroalimentación positivo entre as células tumorais e as células non transformadas do entorno.

A activación constitutiva de STAT3 atópase tanto en células cancerosas como en células inmunes do microambiente tumoral. En ambos casos, inhibe a expresión de mediadores necesarios para a resposta inmune anti-tumoral e promove a produción de factores inmunosupresores, que, a súa vez, son tamén factores de crecemento e anxioxénicos que estimulan a proliferación de células tumorais e a súa supervivencia, e tamén promoven a progresión tumoral a través da anxioxénese e metástase.

O aumento da actividade de STAT3 en células proxenitoras hematopoéticas (HPCs) promove a formación de células mieloides e células dendríticas inmaturas, así como células dendríticas plasmocíticas (pDCs), as cales favorecen a acumulación de células T reguladoras no micoambiente tumoral. Por outra parte, a actividade de STAT3 tamén inhibe a expresión de MHC-tipo 2 en células dendríticas, evitando, deste xeito, a súa maduración e comprometendo a súa capacidade para estimular os efectos anti-tumorais das células T efectoras $CD8^+$ e células NK (Yu *et al*., 2007).

4.5.2.3 Invasión e metástase

A metástase é o proceso máis crítico da tumoroxénese (Figura 3). É altamente ineficiente pero, unha vez que se produce, é o responsable da maior parte da mortalidade causada polo cancro. Pódense diferenciar catro etapas secuenciais e, en cada unha delas, as células tumorais poden ser recoñecidas e eliminadas polo sistema inmune: os antíxenos tumorais son presentados polo MHC-tipo 1, recoñecidos polos linfocitos T citotóxicos, que se activan e eliminan as células malignas. Para evitar este destino, o tumor desenvolveu distintos mecanismos que lle permiten evadir o sistema inmune e que as propias células inmunes, e os seus mediadores, colaboren con el para favorecer o seu crecemento e metástase (Táboa 1).

Unha situación ben diferente é a que ten lugar nos tecidos ou órganos secundarios, onde, inicialmente, as células metastáticas que chegan non contan co privilexio de atopar un microambiente inmunosuprimido ben establecido, nin cos mecanismos de defensa dos que goza o tumor primario. Neste punto, as células tumorais vólvense máis vulnerables e facilmente poden ser detectadas e eliminadas pola resposta inmune.

A este respecto xurde o concepto de inmunidade concomitante, que consiste en que o crecemento progresivo do tumor primario suprime o crecemento dun novo tumor secundario a través de mecanismos que implican o sistema inmune. E dicir, o tumor primario ten, por si mesmo, un efecto inhibidor sobre o proceso de metástase (Janssen *et al*., 2017).

TUMOR PRIMARIO	
Pro-metastático	
Célula T reguladora	Realiza a inmunosupresión a través da inhibición das respostas de células T citotóxicas e células NK
Macrófago	Anxioxénese • Inmuno-supresión • Promove a migración de células tumorais e a súa intravasación
Anti-metastático	
Célula T $CD8^+$	Recoñece e elimina as células tumorais antes da diseminación
Célula NK	Recoñece e eliminan as células tumorais antes da diseminación
Macrófago	Elimina directamente as células tumorais e presenta os antíxenos ás células T
CIRCULACIÓN	
Pro-metastático	
Célula T reguladora	Diminúe ou suprime células T e NKs circulantes asegurando a supervivencia das células metastáticas circulantes
Macrófago	Muda as células tumorais metastáticas para evitar o seu recoñecemento polo sistema inmune
Anti-metastático	
Célula T $CD8^+$	Recoñece e elimina as células tumorais diseminadas
Célula NK	Recoñece e elimina as células tumorais diseminadas
Macrófago	Estimula o sistema inmune coa produción de IL12, IL6, CXCL9. Expresa iNOS para eliminar as células tumorais directamente a través da produción de óxido nítrico
NICHO METASTÁTICO	
Pro-metastático	
Célula NK	Células NK maduras teñen menor capacidade "asasina". Nichos con células NK maduras ou exhaustas son propensos ó crecemento metastático
Macrófago	Preparación do sitio metastático a través da indución dun ambiente local inmuno-supresor
Anti-metastático	
Célula T $CD8^+$	Recoñece e elimina as células tumorais tras entrar no nicho metastático
Célula NK	Células NK inmaturas preveñen a formación do nicho metastático
Macrófago	Leva a cabo a estimulación inmune local

Táboa 1| Papel do sistema inmune na metástase. Os efectos pro- e anti-metastáticos das distintas células inmunes nos diferentes estadios do proceso de metástase, dende o tumor primario ata o tecido/órgano secundario, pasando pola circulación.

4.5.2.3.1 Invasión do tecido local no tumor primario

Nun tumor sólido podemos atopar dúas rexións con microambientes ben diferenciados: un borde e un centro asociado a hipoxia. No borde do tumor é onde ten lugar o contacto das células tumorais coas células inmunes recrutadas e as células do estroma. Entre estas células podemos atopar: TAMs, que promoven a invasión a través da produción de factores pro-migratorios, da produción de coláxeno que acelera a motilidade das células tumorais e a remodelación da matriz extracelular; CAFs, que tamén liberan factores pro-invasivos; e células proxenitoras mieloides, que teñen un papel inmunosupresor porque preveñen a diferenciación das células dendríticas presentadoras de antíxeno, o que favorece a evasión inmune do tumor.

O centro da masa tumoral caracterízase por un nivel deficiente de O_2. Isto xera unha forte presión selectiva sobre as células tumorais, as cales responden coa expresión do factor HIF1 que promove a transcrición de xenes que controlan o metabolismo da glucosa, anxioxénese, supervivencia e invasión. A hipoxia induce a expresión de varios reguladores da EMT e coordina a interacción entre eles, permitíndolle ás células migrar dende o centro cara o borde do tumor.

O mecanismo máis importante para iniciar a metástase é a activación do programa normal latente: EMT. A través deste programa ten lugar un importante cambio fenotípico nas células tumorais, que perden os marcadores propiamente epiteliais e adquiren características mesenquimais, tales como, calidade de célula nai, maior motilidade e menor adhesión intracelular. Con estas novas capacidades, as células tumorais poden infiltrarse no tecido adxacente, cruzar a barreira endotelial e entrar na circulación sanguínea. Os macrófagos, as plaquetas e as células nai mesenquimais contribúen á EMT (Quail & Joyce, 2013; Wu & Zhou, 2009).

4.5.2.3.2 Intravasación en vasos sanguíneos e linfáticos

Neste proceso xogan un papel importante os macrófagos, que se localizan en áreas perivasculares e axudan ás células tumorais a entrar nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. É importante que se estableza a interacción entre as células tumorais e os macrófagos coa barreira endotelial. Por outra parte, a inflamación tamén contribúe con

mediadores que aumentan a permeabilidade vascular (Grivennikov *et al*., 2010; Quail & Joyce, 2013).

4.5.2.3.3 Supervivencia na circulación e extravasación

Como xa se mencionou anteriormente, a metástase é un proceso moi pouco eficiente. Só o 0,01% das células que chegan a alcanzar a circulación son capaces de formar unha metástase detectable.

É importante para as células tumorais evadir o sistema inmune en xeral, pero resulta crítico que o fagan tamén nesta etapa. As células malignas diseminadas deben poñer en marcha mecanismos que as fan invisibles ante os linfocitos T e as protexan do ataque das células NK. Para iso, diminúen a expresión de moléculas do MHC-tipo 1 para non ser recoñecidas polas células T $CD8^+$; diminúen a expresión de proteínas de adhesión para impedir a súa unión a células inmunes circulantes, protexéndose así do efecto citotóxico das células NK (que si recoñecen a expresión diminuída de MHC-tipo 1 pero necesitan o contacto físico para levar a cabo a lise); e usan o sistema de coagulación para resgardarse do ataque inmune (Janssen *et al*., 2017).

En relación a este último aspecto, as plaquetas desempeñan unha función moi importante nese microambiente circulatorio tan hostil. Establecen unha interacción directa coas células tumorais formando agregados protectores e depósitos de fibrina ao redor destas, impedindo, así, o seu recoñecemento por parte das células inmunes e interferindo coa citotoxicidade mediada polas células NK.

O tumor ten a capacidade de adaptar mecanismos fisiolóxicos normais para o seu propio proveito. Isto é o que sucede coa resposta á cura de feridas, como se explica detidamente máis adiante, e a función plaquetaria. Cando se leva a cabo a cicatrización dunha ferida, as plaquetas actívanse en resposta á trombina e únense, agregadas, ao endotelio formando un coágulo de fibrina. Este proceso é similar ao que ocorre durante a metástase: nos órganos secundarios prodúcese unha retracción do endotelio mediada polas células tumorais circulantes e por leucocitos asociados ao tumor -esta retracción é un compoñente importante do nicho pre-metastático, pois determina en que punto as células tumorais deben saír da circulación-, e as integrinas expresadas polas plaquetas interaccionan co coláxeno presente nesa localización

favorecendo a activación plaquetaria. Estes trombocitos promoven a extravasación das células tumorais a través dunha activación, dependente de ATP, dos receptores $P2Y_2$ endoteliais, que abren a barreira vascular favorecendo a diseminación metastática (Quail & Joyce, 2013).

4.5.2.3.4 Adaptación e proliferación no novo microambiente

A diseminación metastática non é un proceso aleatorio, senón que mostra unha clara preferencia por determinados órganos. Este concepto coñécese como órgano-tropismo ou hipótese da "semente-solo", establecida por primeira vez en 1889 por Paget[1]. Este tecido diana necesita ser modulado para adoptar un microambiente permisivo á supervivencia e asentamento das células tumorais.

Os tumores primarios establecen unha comunicación co órgano/tecido secundario para acondicionar o lugar para a futura metástase (isto é, antes da chegada das células tumorais). Esta comunicación ten lugar a través de exosomas que conteñen os factores necesarios para a "construción" do nicho pre-metastático. Cabe mencionar que estes exosomas non só son liberados polas células tumorais, senón que tamén contribúen ao proceso as células NK, os CAFs e as células dendríticas. Os factores liberados son responsables de dirixir o órgano-tropismo, modulan a evasión inmune e dirixen o

[1] A hipótese "semente-solo" (Paget, 1889) establece que o patrón de preferencia da metástase por determinados órganos é o resultado da interacción favorable entre as células tumorais metastáticas (que actúan a modo de semente) e o seu microambiente (que interpreta o papel de solo).

> "When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions;
> but they can only live and grow if they fall on congenial soil"

Paget examinou 735 mostras *postmortem* de cancros de mama e sacou certas conclusións do análise:

- O tumor de útero aparece con elevada frecuencia en mulleres que sofren cancro de mama
- As mulleres con tendencia a padecer cancro de mama mostran tamén maior tendencia a un crecemento tumoral doutro tipo noutra rexión do seu corpo
- No que respecta a metástase, atopou evidencias de "predisposición": determinados órganos son máis propensos a albergar un crecemento secundario que outros
- O fígado e os ósos son órgano que con frecuencia sofren os crecementos secundarios das metástases (Langley & Fidler, 2011; Paget, 1889).

proceso de transición mesénquima-epitelio (MET), a través do cal as células malignas, unha vez asentadas no seu novo fogar, reverten o seu estado mesenquimal e adquiren, de novo, características epiteliais.

O nicho pre-metastático, a diferenza do nicho metastático, que se inicia coa chegada e asentamento das células malignas diseminadas, conforma un microambiente anormal que favorece o crecemento tumoral sen a presenza de células cancerosas. Mostra unha matriz extracelular remodelada e un entorno inflamatorio inmunosuprimido e pro-tumoroxénico cun sistema de coagulación alterado. A evolución do nicho pre-metastático consta dunha secuencia de eventos temporais, que se inicia coa fuga vascular e vai seguida pola alteración da poboación de células locais residentes, como son os fibroblastos; o recrutamento de células non residentes, como as derivadas da medula: células mieloides supresoras, NKs e un grupo de proxenitoras hematopoéticas $VEGFR1^{+}$; e finaliza coa posterior chegada das células tumorais diseminadas (Janssen *et al*., 2017; Peinado *et al*., 2017; Quail & Joyce, 2013).

Existen evidencias experimentais de que as células tumorais circulantes poden volver a colonizar o tumor de orixe. Esta nova poboación resulta máis agresiva que a maioría das células presentes no tumor primario, debido a todos os procesos de selección aos que foron sometidas durante o transcurso da metástase. A existencia deste fenómeno podería explicar a recorrencia tras a excisión tumoral (Langley & Fidler, 2011).

4.6 INACTIVACIÓN TUMORAL

Que as células diseminadas alcancen o órgano ou tecido secundario non significa que a expansión se vaia producir. Estas células poden ser suprimidas polo microambiente co que se van atopar. Hai certos casos nos que as células metastáticas sobreviven aos mecanismo de defensa do novo entorno, manténdose en forma de micrometástase inactiva e asintomática que pode permanecer no organismo durante anos sen ser detectada. Este mecanismo de inactivación está mediado, en parte, polo microambiente e pode actuar a distintos niveis: masa tumoral, celular e inmunidade (Langley & Fidler, 2011; Quail & Joyce, 2013).

4.6.1 Inactivación da masa tumoral ou anxioxénica

A masa tumoral non pode crecer máis alá dun determinado tamaño debido á insuficiente vascularización, o que determina un suplemento limitado de O_2 e nutrientes. Nestas condicións prodúcese un equilibrio entre a taxa de proliferación e a de apoptose.

A activación anxioxénica determina que se produza o salto dunha micro-metástase a unha macro-metástase, onde a proliferación se impón ante a apoptose. Esta activación está mediada, por unha parte, por células proxenitoras hematopoéticas e proxenitoras endoteliais (EPC), que a través dos seus receptores VEGF implantan a vasculatura, e por outra, por células precursoras dendríticas, capaces de diferenciarse a un estado similar ao dunha células endotelial.

4.6.2 Inactivación das células tumorais

Os sinais que proceden do microambiente determinan a conducta da célula tumoral. En determinadas ocasións, sinais como: desaxustes mitoxénicos, estrés, escasa vasculatura, interaccións de integrinas a través da fibronectina da matriz extracelular, e activación da sinalización EGFR levan ás células tumorais a entrar na fase G0 do ciclo celular e, polo tanto, a adquirir unha condición de inactividade. Tamén contribúe a este fenómeno a re-polarización dos macrófagos dun estado anti-tumoral a un estado pro-tumoral.

4.6.3 Inactivación tumoral mediada polo sistema inmune

Como xa se mencionou anteriormente, as células tumorais poden ser recoñecidas e eliminadas polo sistema inmune. Esta arremetida moldea de forma indirecta o tumor porque se seleccionan aquelas células que son menos inmunoxénicas. Este proceso coñécese co termo de inmunoedición e ten o seu símil na selección natural darwiniana: as células tumorais vulnerables ao ataque inmune son eliminadas e resisten aquelas que teñen a capacidade de evadir a vixilancia. Establécese, entón, un estado de equilibrio dinámico que facilmente se rompe pola inestabilidade xenética das células tumorais. A forte presión inmune que sofren fai que sexan susceptibles de adquirir mutación que lle permiten escapar ao control, propagarse e formar un novo tumor capaz de pasar inadvertido ao sistema inmune.

No traballo de Shankaran do ano 2001 definen a inmunoedición como a acción protectora e modeladora da resposta inmune sobre o tumor, e ten lugar durante todo o seu desenvolvemento. Observaron que os tumores que se desenvolven en presenza dun sistema inmune intacto son menos inmunoxénicos que aqueles que evolucionan nun hóspede inmunodeficiente. O sistema inmune é o responsable deste feito, pois favorece o crecemento de masas malignas con maior capacidade de sortear a detección inmune. Isto demostra que os tumores "imprímense" polo entorno inmunolóxico no que se forman (Shankaran *et al*., 2001).

As células supresoras da inmunidade, como son as células T reguladoras e as células mieloides supresoras, son recrutadas para contribuír a este proceso a través da produción de citoquinas anti-inflamatorias e a abolición da capacidade anti-tumoral doutros tipos celulares, xerando un estado inmunosupresor no tecido/órgano secundario.

En calquera dos tres tipos de inactivación pode darse o "despertar" da micrometástase, que se volve receptiva aos sinais que recibe do microambiente e comeza a súa expansión ata converterse nunha macrometástase asociada a un mal prognóstico para o paciente.

4.7 ANALOXÍA ENTRE A CURA DE FERIDAS E O CANCRO

Cabe destacar que a inflamación asociada ao cancro activa a resposta de reparación de dano tisular.

En 1986, Dvorak definiu os tumores como feridas que non cicatrizan. Sinala que os tumores empregan a resposta que se desencadea para a curación de feridas para xerar o seu propio estroma e facilitar, así, a súa progresión:

> "I argue that successful tumors –that is, tumors that grow progressively in the host – are obligate parasites. They have developed the capacity to preempt and subvert the wound-healing response of the host as a means to acquire the stroma they need to grow and expand (...) tumors appear to the host in the guise of wounds or, more correctly, of an unending series of wounds that continually initiate healing but never heal completely" (Dvorak, 1986)

A fisioloxía da curación de feridas é similar aos procesos que favorecen a progresión tumoral. As vías de sinalización e os mecanismos moleculares importantes na cicatrización de feridas están implicados tamén no cancro. A inflamación é un exemplo: é esencial na curación de feridas e tamén actúa como condutor do cancro (Sundaram *et al*., 2018).

4.7.1 Cura de feridas

O epitelio forma a barreira protectora que protexe o organismo do seu entorno e mantén a súa homeostase interna. Debido a que resulta fundamental manter a integridade do epitelio, o desenvolvemento dos organismos multicelulares máis complexos inverteu moito no desenrolo de mecanismos sofisticados para curar rapidamente os danos neste tecido. Canto maior é a complexidade do organismo, maior é o número de compoñentes involucrados no proceso, pero menor a súa capacidade rexenerativa.

Na cura normal dunha ferida podemos diferenciar, a groso modo, tres etapas diferentes (Sundaram *et al*., 2018):

- Primeira etapa: Hemostase. Desencadéase inmediatamente despois de sufrir un dano e o seu propósito é evitar a hemorraxia o antes posible. Os mecanismos polos que se leva a cabo son a constrición dos vasos sanguíneos para diminuír o fluxo de sangue local e a coagulación sanguínea (Dvorak, 2015).

O factor tisular tromboplastina xunto co factor VIIa, e en presencia de Ca^{+2}, promoven a conversión do factor X en factor Xa que, a súa vez, activa a protrombina para formar trombina e converte o factor XIII en factor XIIIa (estabilizador do coágulo). A trombina é o enzima responsable da degradar o fibrinóxeno extravasado en monómeros de fibrina, que polimerizan espontaneamente formando unha especie de xel que, xunto con outros compoñentes extravasados como a fibronectina, forma unha matriz provisional sobre a cal se asentan as células epiteliais e o tecido conxuntivo. As plaquetas extravasadas actívanse pola interacción con compoñentes da matriz extracelular e

liberan factores que incrementan a cascada de coagulación (Byun & Gardner, 2013).

- Segunda etapa: Fase inflamatoria. Os factores liberados polas plaquetas actúan tamén a modo de quimioatraentes de diversos tipos celulares: neutrófilos, mastocitos, monocitos e fibroblastos, que quedan recrutados no lugar da ferida. Prodúcese a activación de linfocitos T e das células NK, e libéranse citoquinas e quimioquinas que recrutan máis células do sistema inmune para mellorar o combate fronte á infección (Byun & Gardner, 2013; Sundaram *et al*., 2018).

- Terceira etapa: Re-epitelización. É a fase máis crítica. Nela, os queratinocitos sofren hiperproliferación e migración cara a zona da ferida para reparala. A migración vai guiada por mecanismos intracelulares, como o reordenamento do citoesqueleto, e por procesos extracelulares, tales como a interacción célula-célula, célula-matriz, remodelación da membrana basal e alteración da matriz mediada por proteinasas (Sundaram *et al*., 2018).

Moitos destes eventos teñen o seu paralelismo na progresión do cancro: as células tumorais aumentan a súa taxa de proliferación e migración, e a matriz extracelular é alterada para manter o seu crecemento e capacidade invasiva (Cadro 2; Byun & Gardner, 2013).

Cadro 2	**Semellanzas e diferenzas entre a cura de ferida e o cancro**	
	CURA DE FERIDA	CANCRO (tumores sólidos)
Depósito de fibrina	Deposición de fibrina por acción externa	Formación dun xel de fibrina por segregación de VEGF, que aumenta a permeabilidade dos vasos favorecendo a infiltración de células plasmáticas
	Distinto mecanismo pero en ambos casos prodúcese un derrame de plasma no espazo extravascular que desencadea a cascada de coagulación con todos os seus efectos	
Función plaquetaria	Participa na hemostase e xera unha matriz provisional que inicia o proceso de cicatrización da ferida. Importante na etapa final: produce PDGF que actúa como mitóxeno e quimioatraente para fibroblastos	Fóra dos vasos sanguíneos non hai plaquetas pero as células tumorais, por si mesmas, realizan algunhas das súas funcións: expresan unha actividade procoagulante e segregan factores que actúan como mitóxeno e quimioatraentes para fibroblastos
Duración	A fibrina e fibronectina son compoñentes transitorios en feridas que curan de forma normal. A permeabilidade vascular normal restáurase en poucos días tras o dano prevendo a filtración continua de fibrinóxeno e fibronectina	A fibrina e fibronectina son compoñentes permanentes no estroma tumoral, o que pode deberse á produción constitutiva de VEGF: unha maior permeabilidade favorece unha fuga continua do contido vascular e, polo tanto, a coagulación constante de fibrinóxeno e fibronectina extravasada
Inflamación	A matriz provisional de fibrina facilita a infiltración rápida de células inflamatorias á ferida	A permeabilidade vascular prolongada favorece unha maior concentración de fibrina local, que actúa a modo de envoltura e dificulta o acceso de células inflamatorias ao tumor
Hipoxia	Ambos son tecidos hipóxicos. A matriz de fibrina separa o dano/células tumorais dos vasos sanguíneos adxacentes	

continuación **Cadro 2**

		CURA DE FERIDA	CANCRO
Vías de sinalización de factores de crecemento	EGF	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • Migración	Aumento: • Proliferación • EMT • Invasión do estroma • Células nai do cancro
	FGF	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • Migración	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • EMT • Células nai do cancro • Quimioresistencia
	TGF-ß	Diminución: • Proliferación Aumento: • Migración	Diminución: • Proliferación Aumento: • Anxioxénese • EMT • Invasión do estroma • Quimioresistencia
	HGF	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • Migración	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • Invasión do estroma • Células nai do cancro • Quimioresistencia
	VEGF	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • Migración	Aumento: • Proliferación • Anxioxénese • Invasión do estroma • Células nai do cancro
Distintos tipos celulares	Macrófagos	Anxioxénese Inmunidade Inflamación • M1: Feridas crónicas • M2: Curación de feridas	Anxioxénese Microambiente Inflamación • M1: Supresor tumoral • M2/TAMs: Tumoroxénico
	Neutrófilos	Anxioxénese Inmunidade Inflamación	=TANs Anxioxénese Microambiente Inflamación
	Células nai	Re-epitelización • IFESC • HFSC	EMT Células nai do cancro Quimioresistencia • IFESC • HFSC

* IFESC: célula nai epidérmica interfolicular; HFSC: célula nai do folículo piloso

Dvorak, 1986; Sundaram *et al*., 2018

4.8 INFLAMACIÓN CRÓNICA E GLIOMA

A existencia destes antecedentes leva a pensar que o mesmo pode ocorrer a nivel de cerebro, é dicir, que as enfermidades autoinmunes que afectan ao SNC poden derivar en gliomaxénese. Atopáronse varios casos de pacientes con esclerose múltiple que desenvolveron tamén algún tipo de glioma: astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblatomas. Aínda non está claro se realmente existe unha relación causal entre as dúas enfermidades ou se, simplemente, se trata dunha casualidades, dado que os pacientes con esclerose múltiple son sometidos con maior frecuencia a escáneres de neuroimaxe e, polo tanto, é normal que a detección de gliomas sexa maior que na poboación xeral. Pero a correlación está no punto de mira e barállanse varias explicacións que defenden a conexión (Plantone *et al*., 2015). Tamén parece existir unha relación entre os individuos que padecen alerxias ou asma e un menor risco de desenvolver gliomas. Estes pacientes mostran niveis baixos de células T reguladoras, responsables da inflamación crónica e, polo tanto, pro-tumoral (Bondy *et al*., 2008; Galvão & Zong, 2013). É necesaria unha investigación máis exhaustiva nestes campos e noutros similares para poder concluír que no cerebro, igual que noutros órganos, existe unha asociación real entre inflamación e oncoxénese.

5 SENESCENCIA

A senescencia é un mecanismo normal do desenvolvemento embrionario que o organismo adulto acolleu para convertelo nunha resposta ao estrés (Cadro 3). Esta resposta implica a detención permanente e irreversible do ciclo celular e, como consecuencia, a incapacidade de proliferar en presenza de factores de crecemento e mitóxenos. A pesar disto, e a diferenza do que acontece na apoptose, as células continúan sendo metabólica e transcricionalmente activas.

5.1 SENESCENCIA DURANTE O DESENVOLVEMENTO EMBRIONARIO E NA FISIOLOXÍA NORMAL DE CÉLULAS DO ORGANISMO ADULTO

A senescencia é un mecanismo deseñado, probablemente, para coordinar procesos de remodelación tisular durante o desenvolvemento embrionario e durante a rexeneración do tecido tras sufrir un dano na etapa adulta (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

É ben coñecido o papel da apoptose durante o desenvolvemento embrionario. É un mecanismo necesario, xunto coa proliferación celular e a diferenciación, para a formación correcta de determinados órganos e estruturas (Brill *et al*., 1999). A pesar diso, a inhibición do programa de apoptose durante o desenvolvemento xera defectos bastante modestos, o que indica que existen mecanismos compensatorios. Entre eles está a senescencia. A participación da senescencia durante o desenvolvemento embrionario está conservada en todos os animais vertebrados e viuse que defectos neste programa, a pesar da relación compensatoria coa apoptose, si produce defectos morfolóxicos que afectan ao organismo adulto. O análise de embrións de rato permitiu identificar a súa función na morfoxénese e na eliminación de estruturas transitorias: os túbulos mesonefríticos son positivos para senescencia durante a involución do mesonefros (ril embrionario transitorio); o saco endolinfático do oído interno, responsable de regular a presión e a composición da endolinfa do oído interno; o nervio apical ectodérmico, unha estrutura transitoria do ectodermo especializado que marca o límite dorso-ventral da xema das extremidades; a membrana interdixital regresiva; e o peche do tubo neural.

Cabe destacar que, a senescencia que se produce de forma natural durante o programa de desenvolvemento mostra características diferentes á senescencia que se induce como resposta a un dano. Non mostra, por exemplo, marcadores de dano no ADN. Ademais, análises xenéticos destas estruturas destacan que os sinais que inducen este tipo de senescencia programada converxen no inhibidor do ciclo celular, p21 (Figura 4).

En individuos adultos atopamos certos tipos celulares que activan o mecanismo de senescencia como parte da súa fisioloxía. Os exemplos máis destacados son os megacariocitos e os sincitiotrofoblastos da placenta, nos que a senescencia forma parte do seu programa natural de maduración.

5.1.1 Remodelación tisular

A senescencia forma parte da remodelación tisular, un proceso que transcorre en tres fases secuenciais:

- Primeira fase: A senescencia induce unha parada estable da proliferación.

- Segunda fase: As células senescentes adoptan o fenotipo secretor asociado á senescencia (SASP – tema que se aborda máis adiante) responsable do recrutamento de células do sistema inmune, principalmente células T colaboradoras e macrófagos, que levan a cabo a eliminación das células senescentes.

- Terceira fase: Rexeneración. Prodúcese a mobilización das células proxenitoras próximas que re-poboan o tecido.

Este papel benévolo da senescencia transitoria, en canto á eliminación de células danadas, vese ensombrecido polo seu efecto deleterio cando se prolonga no tempo, cando a taxa de eliminación de células senescentes é inferior a da súa produción e comezan a acumularse. Certas patoloxías, un dano persistente e o avellentamento inducen este amontoamento a través dunha resposta rexenerativa deficiente e un peor recrutamento de macrófagos. O resultado: disfunción tisular, caracterizada por un número elevado de células senescentes, inflamación crónica e fibrose.

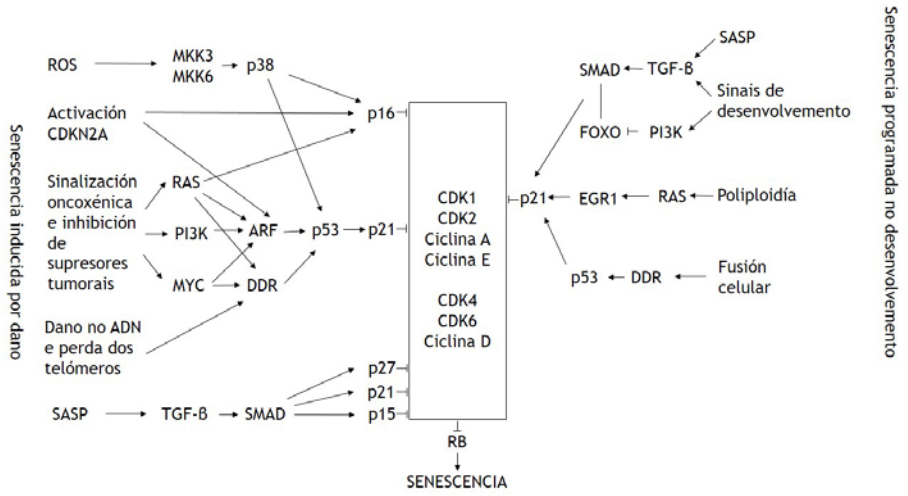


Figura 4| Vías de sinalización que conducen á senescencia. As vías que activan a senescencia durante o desenvolvemento difiren das que se estimulan como consecuencia dun dano, pero o resultado final é o mesmo: afectación da progresión do ciclo celular e senescencia.

5.2 SENESCENCIA COMO RESPOSTA AO ESTRÉS

Todos os organismos con tecidos renovables presentan un risco enorme de sufrir enfermidades relacionadas coa hiperproliferación, entre elas o cancro, a máis mortal.

Para mitigar este risco, a natureza xerou mecanismos de supresión tumoral que, aínda sen ser 100% eficientes, si conseguen: 1) limitar a adquisición de mutacións, a través da prevención do dano no ADN e a optimización dos sistemas de reparación, e 2) dificultar a transmisión do dano á seguinte xeración celular (dificultar a transformación maligna) inducindo a apoptose ou senescencia na célula danada. A través destas estratexias conséguese previr o cancro. Polo menos durante a etapa xuvenil do organismo. Destacamos isto porque, estes mecanismos supresores tamén producen alteración da estrutura, composición e homeostase tisular propiciando, co paso do tempo, a adquisición de fenotipos e patoloxías relacionadas coa idade. Entre elas atopamos, dun xeito irónico, o cancro (Davalos *et al*., 2010).

5.2.1 Causa e tipos de senescencia

Todas as células somáticas con capacidade de dividirse son potenciais a sufrir senescencia, que se activa unha vez que se alcanza certo límite de estrés. En xeral, hai dous tipos de senescencia: a senescencia replicativa e a senescencia prematura, e é dentro desta última onde podemos atopar gran variedade de indutores (Davalos *et al*., 2010; Hernandez-Segura *et al*., 2018; Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Pawlowska *et al*., 2018):

5.2.1.1 Senescencia replicativa

Orixinalmente foi considerada como resposta ao esgotamento da replicación ao final da vida celular. As divisións celulares repetidas van erosionando os telómeros debido a que a ADN polimerasa é incapaz de iniciar a replicación dos extremos dos cromosomas (Hug & Lingner, 2006). Esta redución do tamaño é detectado como unha lesión e activa a resposta ao dano no ADN (DDR), a mesma resposta que se desencadea por axentes externos como as radiacións ionizantes ou as drogas quimioterapéuticas.

5.2.1.2 Senescencia prematura

É inducida por varios tipos de estrés que non están asociados coa erosión dos telómeros.

- Dano grave ou irreparable do ADN pode inducir senescencia ou apoptose dependendo da súa magnitude. As radiacións, ionizantes ou UV, e múltiples drogas empregadas en quimioterapia son axentes capaces de provocar este tipo de senescencia.

- Senescencia inducida por oncoxenes (OIS). En células normais, a expresión de determinados oncoxenes, como *RAS* (Serrano *et al*., 1997) ou a inactivación de supresores tumorais, como PTEN, obtén como resposta a entrada en senescencia. Isto supón un freo na fase temperá da tumoroxénese. Neste caso tamén se induce unha forte DDR debido ao dano que sufre o ADN por unha replicación aberrante.

- Estrés oxidativo causado polo incremento dos niveis de ROS. ROS son moléculas pequenas, altamente reactivas e de vida media curta, que se non son eliminadas adecuadamente por axentes antioxidantes poden oxidar macromoléculas e danar organelas. A oxidación de ADN causa mutacións que favorecen a aparición de varias patoloxías, e a oxidación de proteínas forma agregados causantes de certas enfermidades neurodexenerativas (Rufini *et al*., 2013). Como a mitocondria é a principal fonte de ROS, o seu aumento pode ser debido ao deterioro destas organelas (que tamén pode inducir senescencia asociada a disfunción mitocondrial, MiDAS), ou pode xurdir como un efecto secundario doutros factores, tales como as drogas quimioterapéuticas ou os xa mencionados anteriormente: perda da función dos telómeros, dano no ADN ou activación oncoxénica.

- Senescencia inducida por quimioterapia. Moitas das drogas empregadas producen senescencia a través de dano no ADN ou inhibición de CDKs.

- Senescencia inducida epixeneticamente por inhibidores de metilasas de ADN ou histonas deacetilasas.

- Senescencia paracrina xerada polo SASP de células senescentes primarias.

5.2.2 Vías de sinalización: regulación do ciclo celular

Como resposta á senescencia, inducida por calquera dos tipos de estrés comentados anteriormente, actívanse as dúas vías de sinalización principais na supresión tumoral: p16/RB e p53/p21 (Rayess *et al*., 2012).

5.2.2.1 Vía p16/RB

No transcurso do ciclo celular existen catro puntos de control que a célula debe superar para poder dividirse en dúas: 1) transición de fase G1-S, 2) fase S, 3) transición de fase G2-M, 4) punto de control do fuso mitótico.

A transición de fase G1-S está controlada pola vía p16/RB. A proteína p16 atópase unida CDK4/6 e inhibe a súa actividade quinasa previndo a fosforilación de RB. RB, no seu estado hipofosforilado, mantense unido a E2F1 no citoplasma impedindo a transcrición dos seus xenes diana, que son cruciais para a transición G1-S.

No caso da senescencia inducida por unha hiper-proliferación sostida por E2F, a detención do ciclo celular ten lugar a través de complexos represores que se establecen no núcleo entre proteínas da familia de RB (RB, p107 e p130) e E2F1.

A vía p16/RB colabora coa cascada de sinalización mitoxénica para a produción de ROS. Estas moléculas activan a proteína quinasa C delta (PKCδ) que incrementan aínda máis o nivel de ROS e, como consecuencia, a detención irreversible do ciclo celular.

5.2.2.2 Vía p53/p21

A senescencia mediada pola vía p53 permite a detención do ciclo celular tamén na transición de fase G1-S. Como resposta a un dano actívanse as quinasas ATM/ATR, seguido dunha cascada de sinalización que desemboca coa activación de p53. Esta proteína induce a senescencia a través da expresión de p21. Desta función extráese a súa definición como supresor tumoral: detén a proliferación de células danadas que poderían xerar cancro. De feito, en moitos cancros aparece p53 inactivo e prodúcese unha acumulación de dano no ADN debido á hiper-proliferación celular. Nestes casos, a entrada en senescencia está mediada por ROS a través da expresión de p16.

Na vía de p53 xoga un papel importante p14ARF do locus Ink4a/p16. Esta proteína é a responsable de secuestrar a ubiquitin-ligase MDM2 no nucléolo e impedir, deste xeito, que marque p53 para a degradación. p53 está dispoñible para activar a transcrición de p21, que inhibe a actividade de CDK4 e CDK2 dependente de ciclina E, resultando na detención do ciclo en fase G1-S. A expresión de p14ARF está controlada por E2F, o que mostra unha conexión entre as dúas vías.

5.2.2.3 Escapada da senescencia

O feito de non atopar marcadores comúns a todos os tipos de senescencia fai pensar que este mecanismo se vai adquirindo de forma

progresiva coa acumulación de estrés. Con isto en mente, resulta sinxelo considerar que no transcurso ata alcanzar o estado final de senescencia poden ter lugar eventos que reverten o curso da célula (Lasry & Ben-Neriah, 2015).

Hayflick e Moorhead, tras observar que os fibroblastos non se dividían máis alá dun número limitado de pases, describiron por primeira vez o que hoxe se coñece como senescencia replicativa. Dende ese momento, este proceso definiuse como un estado de arresto proliferativo irreversible. Actualmente sabemos que esta detención do ciclo celular é sostida, principalmente, por p53, e que a súa inactivación, en determinadas circunstancias, permite que fibroblastos en senescencia replicativa poidan volver ao seu estado orixinal de crecemento. Estas "determinadas circunstancias" fan referencia aos niveis de expresión de p16, proteína que xurde como unha segunda barreira potente fronte ao crecemento ilimitado. As células que expresan niveis baixos de p16, combinado coa inactivación de p53 ou coa expresión do oncoxene *RAS*, recuperan a capacidade de proliferar, non sucedendo o mesmo cando os niveis de p16 son elevados. Neste caso, o máximo que se consegue cando se coordina coa inactivación de p53 e RB, ou coa suma da inactivación de RB e expresión de *RAS*, é a entrada na fase S e síntese de ADN, pero non a división celular final (Beauséjour *et al*., 2003).

5.2.3 Resposta ao dano no ADN: DDR

Para que se manteña a estabilidade xenética é indispensable unha maquinaria de replicación eficiente que restrinxa os erros durante este proceso, e uns mecanismos que permitan á célula recuperarse dos inevitables erros que ocorren no transcurso da replicación. Aquí é onde entra en xogo os mecanismos de reparación do dano, que constan de dous compoñentes principais: un compoñente que detecta e responde ao dano, impedindo a proliferación de células xeneticamente inestables; e un compoñente que directamente repara o ADN e que evita a aparición de mutacións iniciadoras da tumoroxénese. As células tumorais regulan de forma negativa estes procesos, de maneira que podemos atopar xenes implicados no DDR frecuentemente mutados en todos os tipos de cancros (Jeggo *et al*., 2016).

O principal obstáculo que ten que superar a célula para iniciar o proceso de reparación é a estrutura da súa propia cromatina. O xenoma de eucariotas forma unha estrutura compacta a tres niveis. O primeiro nivel consta do nucleosoma, que é a cromatina organizada e compactada sobre o octámero de histonas (complexo formado por dúas copias de cada unha das catro histonas: H2A, H2B, H3 e H4). O seguinte nivel é a 'fibra de 30 nm' formada por nucleosomas empaquetados uns sobre outros de forma regular coa participación da histona H1. E o último nivel, o de máxima condensación, alcánzase na metafase coa formación dos cromosomas.

O modelo "acceso-reparación-restauración" (ARR) sostén a descondensación transitoria da cromatina para facilitar a detección e reparación do dano e a súa reorganización e compactación posterior para volver ao seu estado orixinal. Un mecanismo moi regulado, con consumo de ATP e que necesita a acción de complexos de remodelación. Xunto con este proceso de cambio de conformación da cromatina interveñen eventos de fosforilación, ubiquitinización e PARilación mediada por PARP1 que, de forma conxunta, deteñen o ciclo celular e facilitan a intervención do mecanismo DDR (Stadler & Richly, 2017).

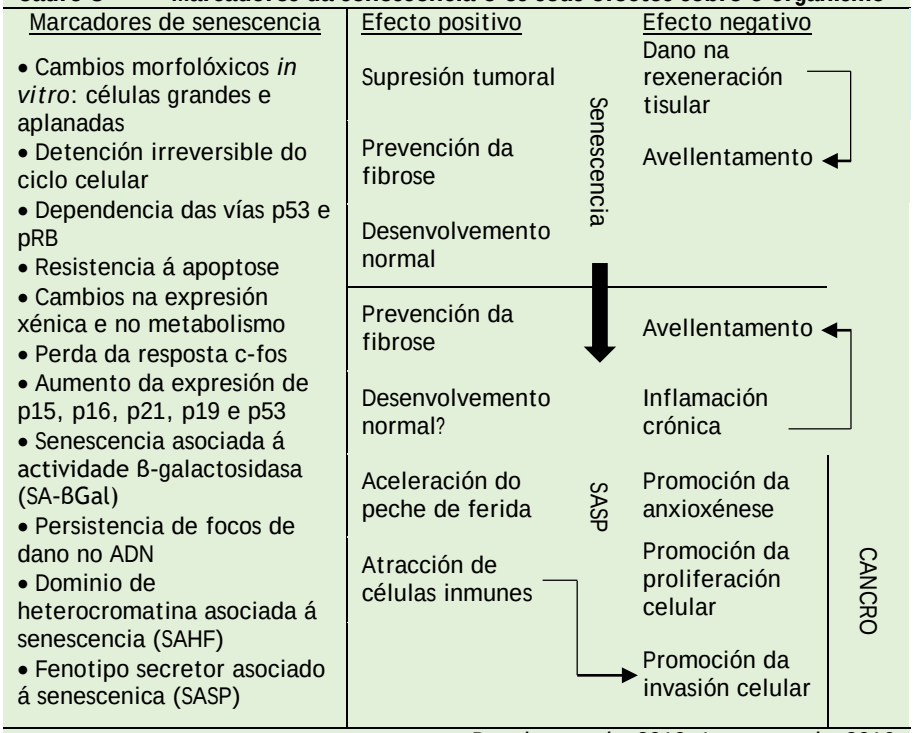
O ADN pode ser sometido a distintos tipos de dano, cada un dos cales activa un mecanismo de reparación ou outro. Un dos danos máis prexudiciais é o que afecta á dobre cadea do ADN (DSBs) e que pode inducir senescencia se non se repara. A resposta a este dano desencadéase co recoñecemento do DSB polo complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) e a activación posterior de dúas proteínas quinasas específicas: ATM e ATR. Estas proteínas fosforilan outras involucradas na activación dos puntos de control do ciclo celular (CHK2 e p53), na reparación do ADN (BRCA1, 53BP1) e histonas (H2AX). Estes substratos fosforilados (xunto coas histonas H2A e H3 ubiquitinizadas) actúan, a súa vez, como plataformas de unión de proteínas efectoras e regulan o ensamblaxe de complexos proteicos á cromatina.

Outro mecanismo de reparación de DSBs detectado en eucariotas involucra ARN non codificante (ncRNAs). Estas moléculas son procesadas polas RNasas DICER e DROSHA e o produto resultante

son pequenas moléculas de ARN de dobre cadea (DDRNAs) coa secuencia do lugar do dano. Estes DDRNAs actúan de modo dependente do complexo MRN e controlan e manteñen a formación do foco DDR, activan os puntos de control e a senescencia celular (en cultivos de células humanas e de rato, e en larvas de *zebrafish*; Francia *et al*., 2012; Stadler & Richly, 2017).

É necesario aclarar dous puntos importantes: 1) a DDR é activada por unha ampla variedade de estímulos de dano no ADN, e non todos eles activan tamén o programa de senescencia (DDR sen senescencia) e 2) a indución da senescencia non é sempre consecuencia da DDR senón que existen outros mecanismos responsables (senescencia sen DDR) (Hernandez-Segura *et al*., 2018; Seoane *et al*., 2008; Seoane *et al*., 2017).

Cadro 3 Marcadores da senescencia e os seus efectos sobre o organismo



Davalos *et al*., 2010; Lecot *et al*., 2016

5.3 FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO Á SENESCENCIA: SASP

As células senescentes son fonte de inflamación crónica. As células sometidas a un estrés xenotóxico activan o programa de senescencia e a segregación de factores asociados coa inflamación e malignidade. Esta segregación, de máis de 40 factores implicados en diversas vías de sinalización intracelulares, é o que se coñece como fenotipo secretor asociado á senescencia (SASP; Coppé *et al*., 2008) ou secretoma mensaxeiro da senescencia (SMS; Kuilman & Peeper, 2009).

O estudo do conxunto de proteínas segregadas por distintos tipos celulares, en estado de pre-senescencia e senescencia, foi levado a cabo por primeira vez por Coppé e os seus colaboradores. Analizaron as diferenzas cualitativas e cuantitativas e concluíron que existe un programa secretor principal conservado que todas as células senescentes activan, pero, ao mesmo tempo, tamén se trata dun fenotipo variable con diferenzas entre os tipos celulares, tecidos e doadores. Atopáronse ante unha característica da senescencia tremendamente complexa. Tamén advertiron que a expresión de *RAS* e p53 xogaban un papel máis alá da súa función célula-autónoma de promover e deter, respectivamente, a proliferación. A través do SASP, que se amplifica e acelera coa expresión de *RAS* e/ou a perda da función de p53, desencadéase unha complexa actividade oncoxénica célula-non autónoma (Coppé *et al*., 2008).

Este fenotipo secretor só se desencadea tras sufrir a célula un dano o suficientemente grave para activar a senescencia. Pero non se desencadea inmediatamente tras o dano, senón que se trata dunha resposta lenta que, unha vez establecida, persiste durante un intervalo longo de tempo. Entre os factores que o forman hai citoquinas e quimioquinas inflamatorias e modeladoras da inmunidade (IL6, IL8, IL7, MCP-2 e MIP-3a), factores de crecemento (GRO, HGF, IGFBPs), proteasas (MMP-1, -2, -3), proteínas non solubles da matriz extracelular (coláxeno, fibronectina, laminina), moléculas da superficie celular e factores de supervivencia. Tamén son membros do SASP outras macromoléculas como lípidos, carbohidratos e ácidos nucleicos que se segregan encerradas en vesículas extracelulares. De calquera maneira, a composición exacta, as dianas destes factores e o resultado final das

vías activadas varían dependendo do contexto celular e do tipo de estrés (Coppé *et al*., 2008; Malaquin *et al*., 2015; Schosserer *et al*., 2017).

Igual que sucede coa senescencia, o SASP tamén mostra esa dualidade de beneficio/prexuízo[2] (Cadro 3). É beneficioso en canto a que, algúns factores reforzan a detención da proliferación vía autocrina e cooperan coas vías supresoras tumorais p53 e RB, diminuíndo o risco de transformación oncoxénica; e outros factores estimulan a reparación e rexeneración tisular e indícanlle ao sistema inmune que elimine as células senescentes. Resulta prexudicial cando a actividade secretora das células se fai crónica porque, a través da función paracrina, contribúe a romper a estrutura e función do tecido normal, favorecendo a dexeneración tisular asociada coa idade ou a adquisición dun fenotipo maligno, como EMT e a invasión a través da membrana basal. Nestes dous aspectos xoga un papel importante as citoquinas IL6 e IL8, que ademais, e igual que outros factores, promoven a inflamación. A través do SASP, as células senescentes que persisten no tecido xeran un microambiente pro-inflamatorio que é, a súa vez, pro-tumoroxénico. A pesar de todo, a selección natural demóstranos que o peso do ben é maior que o do dano porque en caso contrario, dado o coste enerxético que supón manter a elevada actividade secretora, a presión selectiva tería eliminado o SASP da resposta senescente e deixado só o fenotipo de detención do ciclo celular (Coppé *et al*., 2008; Freund *et al*., 2010).

[2] Pleiotropía antagonista: Teoría evolutiva que proporciona unha explicación ao dilema de que a senescencia, ou outro proceso biolóxico, pode ser beneficiosa ou daniña para o organismo dependendo da súa idade.

Nun ambiente natural existen moitos riscos extrínsecos que aumentan a mortalidade dos organismos, o que implica que os individuos maiores tenden a ser raros nas poboacións naturais. Por este motivo, hai pouca presión selectiva para que os mecanismos de supresión tumoral sexan efectivos ata a vellez. A selección natural contribúe a que estes mecanismos sexan efectivos só para asegurar unha reprodución exitosa, aínda que sexan prexudiciais en idades avanzadas.

Actualmente, grazas á mellora da calidade de vida e aos avances médicos, a esperanza de vida dos seres humanos aumentou considerablemente. Este feito fai que se alcance unha idade avanzada na que é posible detectar os efectos nocivos dos mecanismos de supresión tumoral, neste caso da senescencia. O que en idades temperás protexe fronte ao cancro por deter a proliferación daquelas células con risco de transformarse en neoplásica, en idades avanzadas relaciónase con patoloxías asociadas ao avellentamento, como a ateroesclerose, osteoartite e determinados cancros (Coppé *et al*., 2008).

5.3.1 Mecanismos moleculares de control do SASP

A maioría dos compoñentes do SASP están sometidos a unha regulación transcricional. Un control a nivel de cantidade de ARNm que depende dos factores de transcrición NF-κB e C/EBPβ, cuxa actividade aumenta durante a senescencia porque son varias as vías que os activan (Davalos *et al*., 2010; Freund *et al*., 2010).

5.3.1.1 Regulación a través da DDR

É esencial para desencadear o fenotipo secretor pero non suficiente.

Unha célula que sofre un dano activa inmediatamente a súa DDR. En determinadas circunstancias, con esta resposta decide se se repara a lesión ou se se activa o programa de senescencia ou apoptose. Esta función descrita, é a función célula-autónoma da DDR. Por outra parte, esta vía de sinalización tamén é capaz de transmitir o sinal de alarma ás células veciñas, sobre todo as que mostran unha elevada taxa de replicación e actividade transcricional. Estas acaban activando tamén a cascada DDR, coas súas consecuencias, sen sufrir directamente o dano. Esta comunicación realízase por contacto directo célula-célula a través das *gap junction*, ou por vía paracrina mediante os factores solubles segregados ao medio extracelular (Malaquin *et al*., 2015). Noutras ocasións, a activación da DDR non vai seguida da reparación ou senescencia, o que tamén resulta beneficioso para a célula porque se atopa ante unha situación que facilita a variabilidade xenética.

Cando o dano é severo ou irreparable desencadéase o programa de senescencia e mantense una activación permanente da resposta ao dano. As proteínas da cascada DDR, como H2AX, ATM, NBS1 e CHK2, establecen e manteñen a expresión de varias proteínas do SASP, sobre todo das citoquinas inflamatorias IL6 e IL8. Unha das vías pola que se leva a cabo é a de NF-κB, a través da interacción de ATM e a proteína NEMO (subunidade reguladora do complexo IKK). Tras a activación da resposta ao dano, o complexo ATM/NEMO é exportado ao citoplasma onde se une e activa IKKα/β. Iníciase así a vía de sinalización de NF-κB a través da fosforilación das proteínas IκB inhibidoras. PARP-1, outro sensor importante do dano, e implicado tanto en patoloxías inflamatorias relacionadas coa idade como en lesións neoplásicas, tamén aumenta a sinalización de NF-κB a través da

súa interacción con NEMO para favorecer a formación do complexo ATM/NEMO (Malaquin *et al*., 2015; McCool & Miyamoto, 2012; Salminen *et al*., 2012; Stilmann *et al*., 2009).

Para explicar a indución da senescencia en células non danadas que reciben o sinal de alerta, pódese empregar a vía de sinalización desencadeada por TGFβ/SMAD. Esta vía aumenta os niveis intracelulares de ROS e NOS, causantes do dano no ADN e a subseguinte activación dunha DDR persistente. Neste caso tamén se induce SASP por medio de NF-κB (Malaquin *et al*., 2015).

5.3.1.2 Regulación mediada pola vía p38MAPK

Mentres que a activación das primeiras quinasas da cascada de resposta ao dano no ADN ten lugar aos poucos minutos tras o dano, e a resposta transcricional mediada por p53 ao cabo de horas, o desenvolvemento do SASP tarda días en producirse. Factores asociados, como IL6, alcanzan o nivel de máxima segregación 4-10 días despois de iniciarse a DDR (Malaquin *et al*., 2015). Por este motivo é necesaria a existencia dun evento máis lento que coopere coa resposta ao dano, pero que sexa independente dos factores da DDR de resposta rápida, para inducir o SASP. Aparece así en xogo p38MAPK, un membro da familia de proteína quinasas activadas por mitóxeno que responde a unha gran variedade de sinais extracelulares e intracelulares.

Aínda que a detención do ciclo celular e o fenotipo secretor se inducen de forma coordinada tras a activación da senescencia, as vías que regulan estas características son diferentes. Por exemplo, p53, que é necesaria para a detención do ciclo celular, cumpre, en parte, como supresor tumoral ao limitar o desenvolvemento dun microambiente tisular pro-inflamatorio a través da restrición do SASP e, como xa mencionamos anteriormente, é a perda da súa función a que favorece a amplificación e aceleración do SASP. O mesmo sucede con $p16^{Ink4a}$, que é suficiente para inducir a detención da proliferación pero non así o fenotipo secretor (Coppé *et al*., 2008; Freund *et al*., 2011). Non obstante, as dúas vías de detención poden ser activadas por p38MAPK, proteína que, a súa vez, tamén é capaz de regular o SASP a través de NF-κB. O factor de transcrición C/EBP tamén é regulado, de forma indirecta, por p38.

Tras sufrir a célula unha lesión, p53 reprime inmediatamente a vía de p38MAPK e poder dispoñer, así, dun tempo para a reparación do dano antes de comprometerse a desenvolver o fenotipo secretor. Cando p53 se atopa inhibida e a célula sofre un estrés xenotóxico, p38MAPK actívase dun xeito máis rápido e a maior nivel que en condicións normais, o que se corresponde coa amplificación do SASP observada por Coppé e colaboradores. Se nestas circunstancias tamén se inhibe p38MAPK, a amplificación do SASP diminúe (Coppé *et al*., 2008; Freund *et al*., 2011).

A proteína p38MAPK actívase como resposta a unha gran variedade de estrés. A súa activación é lenta, igual que a cinética coa que se desenvolve o SASP, pero independente da DDR. Como podemos observar, as dúas vías, DDR (a través da quinasa ATM) e p38MAPK, activan o fenotipo secretor a través do factor de transcrición NF-κB. As dúas vías modifican post-traducionalmente sitios específicos de NF-κB con distinto grao de eficiencia. A quinasa p38MAPK, e as súas dianas, presentan maior afinidade por algúns deses sitios, que poden ser fosforilados cos niveis de p38 que se alcanzan tras sufrir a célula unha irradiación ou expresión oncoxénica. A afinidade é menor por aqueles sitios que normalmente son fosforilados pola quinasa ATM e as súas dianas, polo tanto, estes últimos lugares só son fosforilados por p38 cando os seus niveis son moi altos. Isto significa que p38MAPK só é capaz de activar NF-κB, por si mesmo, cando os seus niveis son moi elevados. Os niveis que alcanza tras unha irradiación ou activación oncoxénica non son suficientes e necesita da colaboración da DDR.

Os compoñentes do SASP que necesitan da actuación de p38MAPK para a súa expresión son, sobre todo, citoquinas e quimioquinas pro-inflamatorias, que, a súa vez, tamén son pro-cancerígenas. A inhibición desta quinasa consegue mitigar as consecuencias biolóxicas importantes do SASP (Davalos *et al*., 2010; Freund *et al*., 2010; Freund *et al*., 2011).

5.3.1.3 Control mediado pola organización da cromatina e outros efectores epixenéticos

As células senescentes mostran un fenotipo nuclear relacionado coa formación de dominios de heterocromatina facultativa (SAHF).

Estas estruturas reprimen a expresión de xenes relacionados coa proliferación e protexen ás células senescentes da apoptose, pois atenúa a DDR. A formación de SAHF require tanto de cambios na cromatina como cambios moleculares. Entre estes últimos destaca a activación da vía p16/RB, o que mostra unha forte correlación coa detención do ciclo celular.

Tras a indución da senescencia prodúcese unha reorganización da cromatina: a heterocromatina disóciase da periferia nuclear porque existe unha perda de lámina nuclear B1, e posteriormente, desenrólase para agruparse no espazo formando os SAHF. Os efectos do cambio estrutural da cromatina pódense observar no tecido avellentado que sofre, por unha parte, perda de heterocromatina e, por outra, inestabilidade xenómica debida á expresión de elementos retrotraspoñibles (Nacarelli *et al*., 2017).

Existen outros efectores epixenétcos que colaboran cos SAHF durante a senescencia (Nacarelli *et al*., 2017):

- Proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG), proteínas non-histonas que se unen e remodelan a arquitectura da cromatina causando a expresión alterada de determinados xenes. Destacan HMGA e HMGB.

  - As proteínas HMGA son dúas: HMGA1 e HMGA2. Acumúlanse na cromatina das células senescentes desprazando e ocupando o lugar da histona H1. Son as responsables de manter a estrutura dos SAHF e colaboran con $p16^{Ink4a}$ no arresto proliferativo.

  - As proteínas HMGB teñen unha función diferente ás anteriores durante a senescencia. Neste caso, HMGB1 sofre unha segregación que é dependente de p53 e activa NF-κB e vías de sinalización pro-inflamatorias. HMGB2 tamén ten un papel pro-inflamatorio porque proporciona unha situación propicia para a expresión de xenes relacionados co SASP. Esta proteína únese a loci de xenes SASP e prevén a súa incorporación ás rexións SAHF que están

transcricionalmente reprimidas. A inhibición de HMGB2 limita o fenotipo secretor sen afectar á detención do ciclo celular.

- Súper-potenciadores. Fórmanse xuntos aos xenes principais do SASP despois do proceso de remodelación da cromatina. Estes elementos recrutan a proteína BRD4, que promove a expresión do SASP. A inhibición da mesma afecta ao fenotipo secretor pero non altera a detención da proliferación.

- MacroH2A1 é unha variante de histona que é compoñente dos SAHF. Regula directamente a expresión de xenes do fenotipo secretor e tamén é necesaria para a sinalización DDR durante a senescencia. Neste caso establécese un bucle negativo: macroH2A1 activa a resposta ao dano que, a súa vez, promove a saída da histona do loci de xenes SASP, resultando nunha expresión moderada deste fenotipo.

- SIRT1 regula negativamente o SASP de maneira directa. Deacetila as histonas H3K9 e H4K16 presentes en promotores de xenes como IL6 e IL8 e xera a súa represión transcricional.

- Hai efectores que activan de forma indirecta este fenotipo secretor, e no caso de MLL1 faino a través da activación da sinalización pro-inflamatoria que se esconde baixo a aparición do SASP. Durante a indución da senescencia, MLL1 activa a expresión de xenes do ciclo celular relacionados coa proliferación, o que xera estrés hiper-replicativo que desencadea dano no ADN. O resultado final é a estimulación da vía NF-κB e a expresión de xenes SASP.

- A DDR tamén induce cambios epixenéticos que mobilizan e promoven a expresión dos xenes do fenotipo secretor. Neste caso, non é necesaria a rotura física da molécula de ADN, é suficiente coa remodelación da cromatina.

5.3.1.4 IL1α como regulador positivo

IL1 é unha citoquina multifuncional que regula a resposta inflamatoria e inmune a través da activación da cascada que finalmente induce a expresión de IL6 e IL8.

Recentemente, esta citoquina xurde como condutora principal da inflamación cutánea, inflamación e cancro de colon, enfermidades cardiovasculares e inflamación neural. Tamén se identifica como principal responsable do SASP. Estas responsabilidades débense ao feito de que a súa produción aumenta a formación de factores pro-inflamatorios e pro-tumoroxénicos. A súa actividade está fortemente regulada a diversos niveis: durante a expresión, a maduración pola actuación de caspasas activas, e a liberación a través dos programas de morte celular.

Existen dúas isoformas: IL1α e IL1β. A isoforma β só é activa como forma madura segregada. IL1α rara vez se segrega a niveis elevados e pode actuar como proteína precursora ou como proteína procesada. Esta última exprésase de forma constitutiva en epitelio, endotelio e células estromais, e é a única citoquina co privilexio de estar presente, á vez, no núcleo, no citoplasma e na membrana plasmática. Á molécula intracelular adxudícaselle a regulación do ciclo celular, senescencia, diferenciación e expresión xénica, mentres que á forma ancorada á membrana, que tamén é bioactiva, responsabilízaselle da segregación dos principais factores SASP: IL6 e IL8, así como dos seus efectos biolóxicos (por exemplo, a capacidade invasora das células tumorais) e, como consecuencia, de xerar un microambiente tisular que promove a progresión do cancro. Cabe mencionar que IL1 resulta ser un compoñente minoritario do SASP (Malik & Kanneganti, 2018; Orjalo *et al*., 2009).

Independentemente do estímulo que induce a senescencia, IL1α estimula a segregación de IL6 e IL8 a través da súa unión a IL1R e a activación, posterior, dos factores de transcrición NF-κB e C/EBPβ. Tamén emprega esta vía para regular a súa propia síntese de forma autocrina (Freund *et al*., 2010; Orjalo *et al*., 2009) e controlar a senescencia paracrina, unha resposta complexa pola que as células sometidas a senescencia inducida por oncoxenes transmiten o estado senescente ás veciñas por vía paracrina (Acosta *et al*., 2013).

5.3.1.5 Regulación negativa con miR-146a/b

miR-146a/b é unha familia de miARNs que regulan negativamente a segregación asociada á senescencia de IL6 e IL8.

Os miARNs son ARNs non codificantes, endóxenos e de pequeno tamaño. Atópanse en todo o xenoma e transcríbense igual que as secuencias que codifican proteínas. As modificacións post-transcricionais xeran un miARN maduro bioactivo que se combina cun complexo de silenciamento, inducido por ARN, para levar a cabo a súa función biolóxica: suprimir a tradución ou promover a degradación de ARN mensaxeiros. Son moléculas cuxo estudo resulta interesante porque, por unha parte observouse que teñen a capacidade de regular varias fisiopatoloxías e, por outra, resultan potenciais e atractivas dianas terapéuticas (Paterson & Kriegel, 2017).

Bhaumik e os seus colaboradores atoparon a relación entre miR-146a/b e o SASP. A partir do estudo con fibroblastos humanos senescentes propuxeron un modelo no que están relacionados estes dous elementos e a vía de sinalización IL1R: nunha senescencia acompañada por niveis de segregación de factores SASP baixos, a cantidade de IL1α é insuficiente para activar a sinalización IL1R. O resultado varía cando os niveis de SASP son elevados. Neste caso, desencadéase a sinalización IL1R que activa a quinasa IRAK1 que, a súa vez, activa a NF-κB. Este factor de transcrición, como xa vimos previamente, estimula a expresión das citoquinas SASP IL6 e IL8, ademais da expresión de miR-146a/b. Unha das dianas destes miARN é, precisamente, o ARNm de IRAK1, de maneira que se establece un bucle negativo que limita un SASP excesivo: miR-146a/b modera a sinalización a través de IRAK1 e, como consecuencia, reduce a produción de citoquinas asociadas á senescencia (Bhaumik *et al*., 2009).

5.3.2 SASP e reprogramación

No seguinte capítulo explicaremos máis detidamente o proceso de desdiferenciación, pero é necesario introducilo brevemente neste apartado porque o SASP xoga un papel importante na súa activación.

A reprogramación celular require da perda da identidade orixinal da célula, seguido da adquisición dunha nova, e serve para estudar a plasticidade das células somáticas (Taguchi & Yamada, 2017). Con este propósito, Takahashi e Yamanaka conseguiron obter células nai pluripotentes a partir de fibroblastos murinos embrionarios e de adultos, cultivadas baixo condicións específicas para células nai embrionarias (células ES) e a través da introdución de catro factores de transcrición: OCT3/4, SOX2, MYC e KLF4 (OSKM). Estas células, coñecidas como células nai pluripotentes inducidas (células iPS), son funcionalmente equivalentes ás células ES e coa mesma capacidade de diferenciarse en todos os tipos celulares do organismo adulto. Cando transferiron estas células iPS na rexión subcutánea de ratos *nude,* observaron a formación de teratomas compostos por tecidos derivados das tres capas xerminais; e cando as inxectaron en blastocistos, viron que contribuían ao desenvolvemento embrionario (Takahashi & Yamanaka, 2006).

O equipo de Serrano estableceu o concepto de que a senescencia contribúe á plasticidade celular *in vivo* e aos programas de reparación a través da indución dunha resposta pro-inflamatoria (Baker *et al*., 2017).

A reprogramación *in vitro* realízase baixo condicións de cultivo coidadosamente controladas, en cambio, a súa versión *in vivo* conta coa participación do microambiente tisular, xeralmente promotor da diferenciación e reticente á reprogramación. A esta complicación enfrontouse Abad e os seus colaboradores. Este equipo xerou ratos reprogramables, i4F, que conteñen unha copia única do *cassette* lentiviral policistrónico que se induce con doxiciclina e codifica os catro factores OSMK. A través desta tecnoloxía conseguiron analizar as células iPS xeradas *in vivo* e comparalas coas xeradas *in vitro* e as células ES. As conclusións xerais obtidas foron: 1) os factores OSMK inducen desdiferenciación e pluripotencialidade en gran variedade de tipos celulares *in vivo*, 2) as células iPS xeradas *in vivo* son moi similares ás células ES, e claramente separadas das *in vitro* iPS, pero mostran diferenzas na expresión xénica, 3) as *in vivo* iPS teñen a capacidade célula-autónoma de producir estruturas de tipo embrionarias coas tres capas xerminais e reminiscencias do ectodermo extraembrionario e saco vitelino, e 4) as *in vivo* iPS representan un

estado máis primitivo, ou máis plástico, que as células ES (Abad *et al*., 2013).

Os dous tipos de reprogramación son pouco eficientes. A reprogramación *in vivo* permitiu detectar que só unha pequena fracción de células se desdiferencian, mentres que a gran maioría sofren dano no ADN que conduce á activación da senescencia. Os dous programas coexisten no mesmo contexto tisular e entre ambos establécese unha correlación positiva: a senescencia xera un contexto tisular que favorece a reprogramación OSKM a través do SASP. De todos os factores segregados, IL6 xurde como o mediador principal (Mosteiro *et al*., 2016). Profundando na base molecular, observouse que $p16^{Ink4a}$ é necesaria para a activación da senescencia inducida por OSKM e a segregación de IL6 *in vivo*, pero sempre nun contexto onde p53 está presente. A ausencia de p53 deixa desprotexida á célula fronte ao efecto OSKM: aumento da proliferación, dano no ADN, senescencia, inflamación e aumento dos niveis de factores segregados. Este contexto faise dominante e desencadea unha produción de IL6 e unha reprogramación independentes de Ink4a (Mosteiro *et al*., 2018).

En condicións fisiolóxicas normais tamén se pode detectar a activación da desdiferenciación por mediación do SASP, pois é probable que sexa responsable de promover a resposta de rexeneración tisular a través da indución da plasticidade celular e *stemness*. A célula danada activa o programa de senescencia que a protexe da proliferación aberrante e, a través do SASP, activa o sistema inmune que promove a súa eliminación. Ao mesmo tempo, os factores segregados inducen plasticidade e *stemness* nas células veciñas, que acaban substituíndo ás senescentes eliminadas e promoven a rexeneración tisular. Unha exposición prolongada ao SASP desencadea a senescencia paracrina e a detención da proliferación das células do redor, que identifican este exceso de sinal rexenerativo como pro-tumoroxénico e activan os seus mecanismos de supresión tumoral como medida de protección (Ritschka *et al*., 2017).

6 DESDIFERENCIACIÓN

A desdiferenciación é un concepto que fai referencia a un mecanismo asociado coa rexeneración natural a través do cal, un tipo celular especializado perde a expresión xénica específica do seu liñaxe, que lle permitía realizar a súa función no seu tecido definido, e recupera características máis primitivas, reminiscencias do desenvolvemento de dito tecido. Nalgúns cancros, o efecto da alteración dunha célula pode ser a reversión a un fenotipo *stemness* (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014; Jopling *et al*., 2011).

6.1 TUMOROXÉNESE VS. EMBRIOXÉNESE

Resulta sorprendente poder comparar o proceso de tumoroxénese co desenvolvemento embrionario e observar que, a pesar das diferenzas que se detectan a simple vista, unha análise máis profunda desvela unha gran similitude. Xa no ano 1859, R. Virchow introduciu o termo neoplasia para nomear as novas formacións patolóxicas e propuxo que estas xurdían pola mesma lei que regula o desenvolvemento embrionario (Cofre & Abdelhay, 2017).

O proceso de embrioxénese, en mamíferos, xera un organismo complexo a través dunha estrita activación, espacial e temporal, de todas as vías de sinalización implicadas no desenvolvemento. Estas vías de sinalización, conservadas ao longo da evolución, son principalmente: WNT, NOTCH, HEDGEHOG, FGF e BMP, e son indispensables por dirixir varias actividades celulares e a morfoxénese (Ma *et al*., 2010; Shah *et al*., 2018). A súa reactivación en células adultas, como consecuencia de mutacións e/ou remodelación epixenética, é frecuente no cancro, onde participan en todas as etapas da progresión tumoral, dende a iniciación e mantemento, ata a metástase e crecemento no tecido/órgano secundario (Aiello & Stanger, 2016).

A proliferación e a diferenciación celular, a supresión da inhibición por contacto, a migración e invasión, a capacidade de evadir os efectos do sistema inmune, e o metabolismo e actividade enzimática, son características que comparten as células embrionarias e as células tumorais (Ma *et al*., 2010; Shah *et al*., 2018). Unha porcentaxe

significativa de tumores recapitulan a expresión xénica do embrión temperá, sobre todo xenes implicados en reprogramación, proliferación e desdiferenciación. Xenes que, por definición, non se expresan en células somáticas normais comprometidas coa diferenciación e a senescencia (Cofre & Abdelhay, 2017; Ma *et al*., 2010).

Varios dos pasos que conforman o proceso de metástase atopan o seu símil no desenvolvemento embrionario.

A invasión de novos tecidos polas células tumorais é unha réplica do mecanismo de implantación do blastocisto no endometrio uterino. En ambos casos é necesaria tamén a activación da anxioxénese para alcanzar a súa finalidade. De feito, o propio proceso de anxioxénese comparte o mesmo mecanismo de acción: as células endoteliais dixiren a matriz do redor e migran ata a zona para formar os novos vasos sanguíneos (Ma *et al*., 2010; Shah *et al*., 2018).

O comportamento migratorio das células é copia do proceso normal de gastrulación: activación dos programas EMT e MET. Na embrioxénese, concretamente a partir da segunda semana de xestación, o disco embrionario consta do epiblasto (solo da cavidade amniótica), hipoblasto (teito do saco vitelino) e da lámina precordal (na rexión cefálica do embrión). A totalidade das células do epiblasto son potenciais a someterse á EMT, pero a gran maioría teñen fortemente suprimido este programa para asegurar a correcta diferenciación da epiderme e o tubo neural. Só unhas poucas células do epiblasto adquiren características mesenquimais. Entre estas células migratorias, parte forman o mesodermo (dermis, músculo, cartilaxe e óso) e outra parte, tras interaccionar co microambiente e sufrir cambios no patrón transcricional mediados por regulación epixenética, adquiren características que favorecen a activación do programa inverso, MET, que lles permite substituír o hipoblasto e formar o novo e definitivo epitelio endodermal (epitelio intestinal e órganos asociados) (Cofre & Abdelhay, 2017). No caso do cancro, as vías de sinalización que dirixen a EMT durante o desenvolvemento actívanse de novo, e fan deste programa un dos máis importantes durante a progresión tumoral ata o estado metastático. As células tumorais adquiren un patrón de expresión xénico e unhas características mesenquimais: cambios nas propiedades

adhesivas, activación da proteolise e mobilidade. Todo o que lle permite diseminarse e invadir tecidos e órganos secundarios (Thiery & Sleeman, 2006).

En ambos casos, apreciamos que o fenotipo celular no é un estado fixado, senón que mostra unha gran plasticidade para adquirir complexos cambios en arquitectura e comportamento.

Despois de centrarnos nas similitudes que existen entre as células embrionarias temperás e as tumorais, fenómeno realmente sorprendente, é necesario comentar brevemente tamén as principais diferenzas.

Por unha parte, as células nai normais, xeralmente, forman células maduras que indican o fin do proceso de desenvolvemento. As coñecidas como células nai do cancro (CSCs) forman, pola contra, células proxenitoras que se manteñen en constante división e sen chegar a madurar completamente, impulsando a tumoroxénese. Por outra parte, as células tumorais caracterízanse por presentar unha inestabilidade xenética que promove a activación de oncoxenes e/ou a inactivación de xenes supresores tumorais; pola contra, en células embrionarias, a expresión espazo-temporal deste conxunto de xenes, esenciais para manter o fenotipo *stemness* e a expansión, está fortemente regulado a través de mecanismos epixenéticos (non xenéticos; Ma *et al*., 2010).

6.2 POTENCIALIDADE CELULAR

Son dúas as características que definen unha célula nai (Zhang *et al*., 2009):

- Capacidade de auto-renovación: da célula nai xorden descendentes idénticos a ela que manteñen o estado indiferenciado

- Aptitude para diferenciarse en moitos tipos celulares especializados

En base ao número de tipos celulares nos que pode diferenciarse, as células nai clasifícanse en catro tipos diferentes: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes.

Durante o desenvolvemento embrionario, a medida que se van xerando novas células coa capacidade de dividirse, tamén se produce un declive progresivo da totipotencialidade. No caso dos mamíferos, só as células resultantes das divisións máis temperás (estadio de mórula) reteñen a capacidade de xerar, cada unha delas e por si mesmas, un organismo completo. As células xerminais son únicas en canto á transmisión de información xenética e epixenética ás xeracións seguintes, e mostran moitas características especiais necesarias para soster este potencial.

O embrión, no seu quinto/sexto día do desenvolvemento, atópase na fase de blastocisto, que se caracteriza por estar formado por unha capa de células externas, o trofoectodermo, que formará a placenta, e unha masa de células interna que orixinará o feto completo. Esta masa celular diferénciase en todas as células do organismo adulto. Son pluripotentes.

Como vimos no tema anterior de senescencia, en relación co SASP, a condición de célula nai embrionaria pódese rescatar *in vitro* e preservala de forma indefinida, mantendo as células a capacidade de diferenciarse en calquera tipo celular específico do embrión ou do organismo adulto. Para conseguir conservar o estado de pluripotencialidade en cultivo, sen que se active o programa de senescencia, é necesaria unha reprogramación xenética continua das células ES (Reik & Surani, 2015).

Aproximadamente aos tres meses de vida, coincidindo co final da etapa de organoxénese, xa a maioría das células do feto están nun estadio diferenciado segundo o tipo de célula necesario para cada órgano. Aínda quedan algunhas células que manteñen a capacidade de diferenciarse en multitude de tipos celulares, pero xa dunha forma limitada, pois só derivan en células presentes nun tecido ou órgano específicos. Un modelo moi empregado é o das células nai hematopoéticas. Estas células poden xerar todos os tipos de células sanguíneas: eritrocitos, leucocitos e plaquetas, pero en ningún momento poden dar lugar a músculo, óso ou cartilaxe (Zhang *et al*., 2009).

Por último, quédanos definir o concepto de unipotencia, cuxa existencia non está moi clara. Este caso sería o dunha célula que se diferencia a un só tipo celular pero que mantén a capacidade de auto-

renovación (Zhang *et al*., 2009). Un exemplo é o da célula nai da pel, responsable de producir células fillas que se diferencian e substitúen aquelas que están mortas e frecuentemente anucleadas, ou tras un dano, e manter así a homeostase da epiderme (Kretzschmar & Watt, 2014).

O organismo adulto tamén conserva algunhas células nai, por exemplo, as células nai hematopoéticas pluripotenciais da medula ósea, das cales derivan todas as células sanguíneas, ou as células da pel (mencionadas antes) e do intestino, que están continuamente sendo substituídas por células procedentes da diferenciación das súas células nai correspondentes. A principal diferenza que existe entre as ES de embrión e as de adulto reside en que, mentres que as primeiras dan lugar a unha gran diversidade de tipos celulares - son pluripotentes -, as segundas so deriven en células dun tecido específico - multipotentes - (Reik & Surani, 2015).

6.3 PLURIPOTENCIALIDADE INDUCIDA

A especie humana, á diferenza doutras especies de vertebrados non mamíferos, mostra unha capacidade de renovación de órganos e tecidos moi limitada. Só está presente en sangue, que se rexenera a partir de células nai somáticas albergadas en nichos; e no fígado, que se renova porque as súas células diferenciadas indúcense a proliferar.

O proceso de rexeneración pode constar de dous mecanismos diferentes (Jopling *et al*., 2011):

- Desdiferenciación. Células totalmente diferenciadas reverten a un estado menos diferenciado pero sempre dentro do seu propio liñaxe. Unha vez desdiferenciadas, estas células proliferan de novo antes de volver a diferenciarse, o que permite suplir as perdidas e restablecer o tecido.

- Transdiferenciación. No contexto de retornar a un estado máis primitivo, este concepto representa un paso máis aló que o anterior. Neste caso, a célula retrocede ata un punto que lle permite cambiar de liñaxe e diferenciarse a un tipo celular diferente.

Esta plasticidade celular que albergan as células diferenciadas quedou ao descuberto cos experimentos de reprogramación celular, que, noutras palabras, é basicamente unha transdiferenciación experimental. O obxectivo é conseguir que unha célula diferenciada reverta ao estado de pluripotencialidade e, a partir de aí, volver a diferenciarse en moitos tipos celulares diferentes. Aínda que se trata dunha técnica empregada nos laboratorios, descubriuse que ten a súa cabida na natureza e, incluso, que se trata dun dos mecanismos iniciais do desenvolvemento dun individuo, pois ten lugar durante a fecundación para producir células totipotentes capaces de diferenciarse, posteriormente, a calquera tipo celular e formar un organismo. Tamén se observou que se trataba dun proceso fisiolóxico importante na curación de dano *in vivo* (Jessen *et al*., 2015; Jopling *et al*., 2011). Neste caso, e para diferencialo do experimental, denominóuselle reprogramación celular adaptativa (Jessen *et al*., 2015). En mamíferos, a recuperación dun tecido danado pódese producir por dous mecanismos diferentes:

- As células nai ou células proxenitoras proliferan e son as células fillas ás que se diferencian. Sucede co sangue, óso, músculo esquelético e pel.

- As células diferenciadas son as que se dividen. A veces esta división vai acompañada por unha desdiferenciación: as células desdiféréncianse, proliferan e o produto re-diférénciase noutros tipos celulares (reprogramación celular adaptativa). Estes últimos poden tratarse simplemente dunha clase de células reparadoras transitorias ou poden ser xa as células definitivas que van ocupar o lugar das que se perderon polo dano tisular.

Un bo exemplo de reprogramación celular adaptativa é o que sucede cos astrocitos tras un dano no cerebro. Parte dos astrocitos deixan de cumprir coas súas funcións normais: mantemento dos niveis de moléculas extracelulares e neurotransmisores, provisión de nutrientes ás neuronas, regulación da formación e función de sinapses, e contribución á barreira hematoencefálica e ao axuste do fluxo sanguíneo local, para ser sometidas á reprogramación. Adquiren un

estado de diferenciación alternativo, probablemente máis primitivo, pero con funcións que as van capacitar para reparar o dano: limitar a diseminación de células inflamatorias e a infección, presentar antíxenos, previr a dexeneración neuronal e formar unha barreira, cicatriz, que limita a perda de tecido. Estes son os astrocitos reactivos (Jessen *et al*., 2015).

En 1956, Waddington publicou o seu modelo sobre a historia dunha célula durante o desenvolvemento do embrión, en base á existencia de eventos deterministas que van nunha soa dirección e sen capacidade de reverter o proceso. Ademais, durante o desenvolvemento do organismo hai unha serie de restricións intrínsecas impostas pola expresión xénica e moldeadas pola evolución. Xurde así a metáfora da paisaxe epixenética: unha bóla interpreta o papel dunha célula embrionaria non diferenciada. Esta bóla roda costa abaixo sobre unha superficie formada por vales e montañas, que representan todos os posibles estados de expresión do xenoma. A finalidade da bóla é chegar a unha meta, un fenotipo estable do organismo. Durante o camiño, a bóla enfróntase a puntos de bifurcación, vías de diferenciación alternativas, onde tomar un camiño ou outro implica un resultado ou un destino distinto. A toma de decisión sobre que vía elixir vai depender da presenza de certos indutores, dos xenes homeóticos e do azar (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014; Sandoval *et al*., 2014).

> "Although the epigenetic landscape only provides a rough and ready picture of the developing embryo (...) there may be regions at upper levels which are almost flat plateaus from which two or three different valleys lead off downwards. These, in fact, correspond to what we know as states of competence, in which embryonic tissues are in a condition in which they can be easily brought to develop in one or other of a number of alternative directions (...) Has the valley a flat bottom and gently sloping sides? If so, there will be only rather a slight tendency for a developmental trajectory, when displaced from the valley centre, to find its way back there again, the final adult character will be easily caused to vary by minor fluctuations in the conditions under which development

> occurs. On the other hand, if the valley bottom is very narrow and the sides steep, it will be more difficult to push the trajectory away from its normal course and it will quickly return there (...) if a process of embryonic development is disturbed, it usually returns to normality some time before reaching the adult condition (...) This is well symbolised by the epigenetic landscape. If a ball, running down one of the valleys, were pushed partway up the hillside, it might well reach the valley bottom again before the slope of the valley flattens out as it reaches the adult steady state" (Waddington, 1956)

Unha proposta renovada sobre a paisaxe de Waddington foi feita por Yamanaka e o seu equipo. Demostraron que unha célula totalmente diferenciada pode regresar ao estado orixinal de pluripotencialidade a través da reprogramación. Nace así a tecnoloxía de xeración de células iPS (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi & Yamanaka, 2016).

Unha visión máis actual foi suxerida por Goldberg e os seus colaboradores, que combinan a idea orixinal de Waddington, a idea de Yamanaka e ten en conta tamén a epixenética (modificacións externas ao ADN que regulan a expresión xénica sen producirse cambios na secuencia nucleotídica subxacente; dúas modificacións importantes son a metilación do ADN e a modificación das histonas): unha máquina de xogos *pinball* cun taboleiro cuxos compoñentes electrónicos representan os factores reguladores da epixenética, responsables de dirixir os movementos da bóla - célula -. Esta, pola inclinación do taboleiro, roda cara abaixo polo seu propio impulso, onde estaría o seu fenotipo final diferenciado, pero coa axuda das paletas, que figuran a reprogramación, é re-proxectada cara dentro do taboleiro (Goldberg *et al*., 2007).

A primeira técnica definida como reprogramación celular foi realizada por John Gurdon en 1962. Levou a cabo o que se coñece como transferencia nuclear de célula somática (SCNT), consistente na transferencia do núcleo dunha célula somática a un óvulo anucleado, que se divide ata formar un embrión xeneticamente idéntico ao doador do núcleo (Gurdon, 1962). Esta técnica foi posteriormente empregada

en moitos experimentos de clonación, como no caso do primeiro mamífero clonado, a ovella Dolly, por Wilmut e Campbell (Campbell *et al*., 1996).

No 2006, o equipo de Yamanaka atopou o conxunto mínimo de factores necesarios para inducir un estado de pluripotencialidade en células totalmente diferenciadas, as células iPS. Esta técnica resulta experimentalmente máis manexable que a SCNT e pódese realizar *in vitro* en grandes poboacións celulares (Smith *et al*., 2016; Takahashi & Yamanaka, 2006). Os factores de reprogramación, como xa mencionamos anteriormente, son: OCT3/4, SOX2, KLF4 e MYC, coñecidos, en conxunto, como OSKM.

6.3.1 Factores de reprogramación

OCT3/4, SOX2 e NANOG actúan como principais factores de transcrición no mantemento da pluripotencialidade. MYC e KLF4 son factores de transcrición relacionados co cancro.

6.3.1.1 O triplete NANOG - OCT3/4 - SOX2

Estes tres factores de transcrición, NANOG, OCT3/4 e SOX2 son necesarios para o desenvolvemento dos mamíferos e regulan a transcrición de xenes responsables deste proceso. Ademais, cooperan conxuntamente no control da auto-renovación e pluripotencialidade de células ES. Para realizar esta actividade reguladora, OCT3/4 e SOX2 interaccionan directamente formando un heterodímero e únense a promotores dunha gran cantidade de xenes diana, entre eles, xenes de pluripotencialidade como *NANOG* e, incluso, eles mesmos, porque inflúen positiva e negativamente na súa propia expresión. Ao mesmo tempo tamén reprimen xenes responsables da diferenciación *in vitro* e do proceso de desenvolvemento *in vivo*.

Os tres factores exercen tamén unha función na especificación do liñaxe. Regulan a diferenciación de células ES cara liñaxes específicos. Mentres que SOX2 conduce cara o neuroectodermo, OCT3/4 e NANOG promoven a diferenciación cara o mesoendodermo -precursor do mesodermo e endodermo definitivo- (Rizzino, 2009; Zhang, 2014).

6.3.1.1.1 NANOG

Esta proteína exprésase durante o desenvolvemento embrionario temperá, na masa celular interna, en células ES e no desenvolvemento da liña xerminal en mamíferos. No caso das células ES, estas son sensibles á dose desta proteína: un aumento da expresión prevén a diferenciación destas células en ausencia de factores de crecemento extracelulares e, pola contra, a diminución causa a perda da pluripotencialidade. A pesar da súa implicación no mantemento da pluripotencialidade en células ES e no embrión temperá, non é necesario para a xeración das células iPS (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi & Yamanaka, 2016). Tamén se observou a súa implicación no incremento da proliferación, e/ou auto-renovación, en liñas de célula nai e somáticas a través da regulación de moléculas involucradas en *stemness*, ciclo celular e senescencia. Un dos mecanismo a través dos cales NANOG aumenta a proliferación e inhibe a senescencia é a través da regulación negativa do inhibidor do ciclo celular p27 (Mitsui *et al*., 2003; Münst *et al*., 2016).

NANOG controla os seus niveis de expresión a través dunha regulación negativa mediada por interacción con Zfp281 (proteína dedo de zinc), responsable de recrutar o complexo represor NuRD (De Kumar *et al*., 2017).

6.3.1.1.2 OCT3/4

OCT3/4 é un factor de transcrición da familia POU. A súa expresión pódese detectar no oocito, blastocisto e no ectodermo embrionario antes da etapa de gastrulación, o que nos indica que desempeña a súa función en poboacións de células pluripotenciais. Observouse que é esencial no desenvolvemento embrionario de ratos e que a súa deficiencia xera problemas xa no comezo do desenvolvemento fetal, debido a que non se pode establecer unha poboación de células pluripotentes. O nivel de expresión de *OCT3/4* é un elemento importante para manter a capacidade de auto-renovación das células nai (Shimozaki *et al*., 2003).

6.3.1.1.3 SOX2

SOX2 é un membro da familia SOX de factores de transcrición. A expresión de *SOX2* xa se detecta en células en estadio de mórula (a súa deficiencia resulta letal para o cigoto), e en fases máis tardías a súa expresión faise máis específica e localizada, aparecendo na masa celular interna do blastocisto e no epiblasto. Pódese concluír, polo tanto, que resulta fundamental para a formación de células pluripotentes no embrión temperá e para o seu posterior desenvolvemento. Ademais do seu papel en embrioxénese, tamén está implicado en diversos cancros, onde promove o crecemento tumoral, metástase, resistencia ao tratamento e diminúe a supervivencia (Wuebben & Rizzino, 2017; Zhang, 2014).

6.3.1.2 Os outros factores esenciais: KLF4 e MYC

A pesar da súa relación co cancro, ningún dos dous pode ser suplido por outro oncoxene, tipo *E-RAS*, *TCL1*, *β-Catenina* ou *STAT3*, na formación de células iPS (Takahashi & Yamanaka, 2006).

6.3.1.2.1 KLF4

Este factor de transcrición, que pertence á familia de factores de tipo Krüppel, caracterízase, igual que o resto dos membros, por conservar unha estrutura de dedo de zinc. A súa expresión detéctase en gran variedade de tecidos e, dependendo dos seus xenes diana, actúa a modo de activador ou represor transcricional. Igualmente, dependendo do contexto celular, pode exercer de oncoxene ou de supresor tumoral. Está implicado en múltiples procesos fisiolóxicos, dende proliferación ata a apoptose, pasando pola diferenciación terminal. Esta última función é a máis recente descuberta. Detectouse unha alta expresión de *KLF4* en células ES, expresión que diminúe drasticamente a medida que se van diferenciando. A súa sobre-expresión permite manter o estado de célula nai independentemente de LIF[3]. Atribúeselle, polo

[3] O factor ihibidor de leucemia (LIF) é unha citoquina da familia de IL6. Participa no mantemento das células ES murinas nun estado non diferenciado, con capacidade de auto-renovación indefinida e unha pluripotencialidade similar ao da masa interna do blastocisto. Actúa a través da súa unión ao seu receptor específico, LIF-R, que heterodimeriza con gp130 e activa a vía de sinalización JAK/STAT3. O papel de STAT3 é esencial no mantemento das

tanto, un papel na capacidade de auto-renovación e pluripotencialidade de células ES. O seu papel nesta función é dobre. Por unha parte, exerce de diana da vía de sinalización LIF/STAT3 e, unha vez activado, asóciase directamente a OCT3/4 e SOX2 formando un complexo que se une ao promotor de *NANOG*, regulando positivamente a súa expresión (Wei *et al.*, 2009; Zhang *et al*., 2010); e por outra parte, activa *NANOG* a través da súa función como represor de p53, proteína que presenta niveis baixos en células iPS e que se viu que suprime a expresión do xene *NANOG*. A través da represión de p53 tamén inhibe a activación da apoptose inducida por MYC e activa p21, que desencadea unha diminución da proliferación. Este último efecto é contrarrestado por MYC, responsable de inhibir p21. A relación entre KLF4 e MYC fai concluír que o balance entre os dous factores é un compoñente importante para a xeración das células iPS (Takahashi & Yamanaka, 2006).

6.3.1.2.2 MYC

MYC é un proto-oncoxene que codifica factores de transcrición da súperfamilia de proteínas básicas 'hélice-bucle-hélice' (bHLHZ). Os tres membros principais da familia MYC participan en procesos celulares normais, como a proliferación, a diferenciación, a transformación, o crecemento e a apoptose. Tamén se identificou o seu papel na embrioxénese, no sustento da auto-renovación e pluripotencialidade das células ES (función que exerce de forma independente de LIF cando está sobre-expresado), e resulta imprescindible para a formación de células iPS. Para levar a cabo a súa función no mantemento das células ES, son dúas as vías de sinalización que desembocan na súa expresión: LIF/STAT3 e WNT a través de β-catenina/TCF. En ambos casos prodúcese a activación transcricional de

células ES: a actividade ectópica de STAT3 en ausencia de LIF é suficiente para manter a pluripotencialidade e capacidade de auto-renovación; pola contra, aínda en presenza de LIF, o bloqueo de STAT3 supón a diferenciación espontánea destas células. Xenes diana de STAT3 son *KLF4* e *MYC*, ambos os dous pertencen aos factores OSKM para a xeración de células iPS. A vía LIF/STAT3, que é crucial para o mantemento das células ES murinas, non parece ser relevante para as células ES humanas, o que indica a existencia dunha vía alternativa e independente. Esta vía de sinalización é a de WNT, que actúa nos dous tipos celulares e un dos seus xenes diana tamén é *MYC* (Cartwright *et al*., 2005; Kristensen *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2010).

MYC. A proteína MYC participa na regulación do metabolismo, pluripotencialidade e auto-renovación, ademais de promover un estado de eucromatina (importante para a pluripotencialidade). Durante a tumoroxénese, estas funcións están bloqueadas e favorécese a transformación de células nai normais en células nai tumorais (Cartwright *et al*., 2005; Varlakhanova *et al*., 2010). Moitos tumores humanos mostran niveis elevados de MYC (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014).

6.3.2 Proceso de pluripotencialidade

Os factores OSKM son incapaces de alterar de forma rápida o estado diferenciado das células. É un proceso inestable que toma o seu tempo para consolidarse.

Unha vez introducidos os factores OSKM na célula somática, esta responde cun aumento da proliferación e cambios metabólicos (transición de fosforilación oxidativa a glicólise; característica común a células transformadas -células tumorais-, células nai pluripotentes e células nai adultas), en parte dirixidos por MYC. Tamén se somete a cambios epixenéticos locais. Pouco despois, KLF4 induce a expresión de xenes epiteliais, e OCT3/4 e SOX2 reprimen os xenes que sosteñen o estado mesenquimal.

A transición dun estado dependente de factores, e non pluripotencial, a un estado de célula iPS require de múltiples divisións e un amplo período de latencia baixo a influencia de OSKM. A reprogramación complétase só nunha pequena porcentaxe de células, e require da activación dunha rede endóxena, e consolidada, de características epixenéticas globais dunha pluripotencialidade estable. A célula adquire un potencial embrionario completo, bivalencia nos xenes do desenvolvemento, silenciamento de vectores retrovirais, insensibilidade á perda de represores epixenéticos e reactivación do cromosoma X en femias (Smith *et al*., 2016).

A través da expresión ectópica de OSKM, xunto con factores exóxenos e un paso transitorio pola pluripotencialidade, tamén se pode inducir un destino somático alternativo, como cardiomiocitos ou células nai neurais (NSCs; Smith *et al*., 2016). No caso das últimas, teñen un potencial de aplicación en enfermidades neurolóxicas e terapias de

substitución celular, por exemplo, na esclerose lateral amiotrófica, na esclerose múltiple, no Alzheimer ou no dano da medula espiñal (Zheng *et al*., 2018).

6.4 DESDIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS TUMORAIS

O tumor caracterízase, entre outras moitas cousas, pola súa heteroxeneidade xenética. Un reflexo da súa inestabilidade xenética. Esta característica fai que no mesmo tumor existan células que se atopan en diferentes estadios de diferenciación (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014).

Existen dúas teorías sobre a orixe da célula nai tumoral, que non teñen que ser excluíntes entre si:

- Célula nai do cancro (CSC). No tumor existe unha subpoboación de células tumorais con capacidade de auto-renovación e de xerar descendentes que proliferan de forma auto-limitada. As CSCs son as responsables de manter o crecemento tumoral e de xerar esa heteroxeneidade tan característica.

- Plasticidade da célula tumoral. Todas as células do tumor teñen o potencial de converterse en CSC, independentemente do seu estado de diferenciación, sempre e cando reciban o estímulo oncolóxico adecuado que induce a plasticidade. Neste caso ten un gran peso a influencia do microambiente tumoral inflamatorio, capaz de inducir cambios no estado de diferenciación da célula cancerosa.

6.4.1 O GB como exemplo de desdiferenciación

O GB pódese orixinar a partir dunha gran variedade de células do cerebro, incluso de astrocitos corticais totalmente diferenciados ou de neuronas. Todas elas son igual de permisivas para a gliomaxénese que as células nai neurais. Existe un nivel de desdiferenciación tal, que se xeran células pluripotenciais capaces de formar tanto neuronas como células gliais. Isto pódese observar nalgúns tumores orixinados a partir de astrocitos transformados, que son positivos para TUJ1, marcador de neuronas.

A proposta de Friedmann e Verma, respecto a esta plasticidade no cerebro, é que baixo os efectos de certos oncoxenes, como *RAS* ou *MYC*, as células maduras do cerebro sofren o proceso de desdiferenciación e adquiren características de célula nai, ou célula proxenitora, que favorecen a progresión tumoral. Pero isto non é todo. As células tumorais tamén poden transdiferenciarse en células endoteliais e formar os seus propios vasos sanguíneos funcionais, asegurando, deste xeito, o aporte de O_2 e nutrientes necesario para soster o seu crecemento. No contexto do glioma, esta transdiferenciación podería ser reversible, é dicir, as células endoteliais poderían reverter ao estado de CSCs (Figura 5; Friedmann-Morvinski & Verma, 2014).

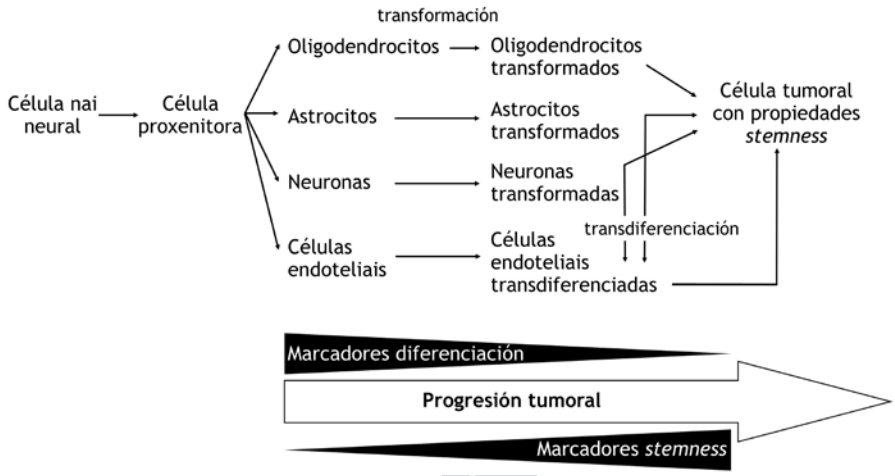


Figura 5| O proceso de diferenciación e desdiferenciación no SNC. Durante o proceso normal de diferenciación, unha célula nai neural xera neuronas, células gliais e, incluso, células endoteliais. No contexto de GB, os astrocitos, neuronas e oligodendrocitos transformados poden reprogramarse ata un estado de célula nai, que adquire a capacidade de auto-renovarse e de diferenciarse en máis células neurais transformadas. Os astrocitos e as neuronas transformadas tamén poden transdiferenciarse a células endoteliais, que a súa vez tamén poden reprogramarse ata un estado de CSC. A medida que evoluciona o tumor, aumentan os marcadores *stemness* en detrimento dos marcadores de diferenciación.

6.5 ORGANOIDES CEREBRAIS

O desenvolvemento do cerebro en mamíferos comeza coa expansión do neuroepitelio para xerar células nai da glía radial. Estas células divídense na superficie apical na zona ventricular para producir neuronas e proxenitores intermedios. Mentres que os proxenitores intermedios habitan a zona subventricular adxacente, as neuronas migran a través da zona intermedia para ocupar capas específicas na placa cortical. Nos humanos, esta organización é máis complexa: a zona subventricular está dividida por unha capa fibrosa interna (IFL) en zona subventricular interna e externa. A zona subventricular externa (OSVZ) está poboada por proxenitores intermedios e un subconxunto único de células nai denominado glía radial externa (oRG). A oRG está presente só nun grao limitado en roedores, mentres que a IFL e a OSVZ están completamente ausentes en rato. Estas diferenzas permiten a expansión do rendemento neuronal e do tamaño do cerebro en humanos (Lancaster *et al*., 2013).

No campo da neurociencia actual, xurde a necesidade de xerar un método que recapitule o desenvolvemento do cerebro humano *in vitro*. O establecemento de órganos completos xerados *in vitro* -intestino, pituitaria e retina- inspirou para a formación de organoides cerebrais. Esta ferramenta permite estudar as características evolutivas e do desenvolvemento do cerebro, porque recapitula as características morfoxenéticas e funcionais do órgano vivo *in vitro*, permite o *screening* de fármacos e o modelaxe de enfermidades neurodexenerativas ou do cancro. Os organoides cerebrais representan mellor a fisioloxía *in vivo* que as técnicas empregados ata o momento (Bian *et al*., 2018; Dezonne *et al*., 2017; Lancaster & Knoblich, 2014):

- Modelo de ratos modificados xeneticamente, aínda que permitiu grandes avances en distintos campos, ten unha aplicación limitada debido ás diferenzas xenéticas, morfolóxicas e fisiolóxicas que existen entre o cerebro humano e o de roedores.

- No caso da investigación do cancro, moitas investigacións centráronse no uso de *xenografts* derivados de pacientes. Neste caso,

aínda que representan a heteroxeneidade tumoral, non son cómodos para o estudo da iniciación tumoral. Ademais, as biopsias tardan en establecerse e o custo para o seu uso en probas de tratamentos é inviable.

- O sistema de cultivo celular, xunto cos estudos *in vivo* con roedores, proporcionaron unha ampla visión do desenvolvemento, función e disfunción do cerebro humano, pero non recollen toda a súa complexidade (Mansour *et al*., 2018). Os cultivos en monocapa de liñas tumorais teñen o seu valor en investigación, así como o de células nai neurais, que ademais teñen potencial para aplicacións terapéuticas, pero mostran limitacións, por exemplo, no caso das últimas, carecen de marcadores *stemness* do desenvolvemento cerebral, como a orientación apicobasal.

- As rosetas derivadas de células nai pluripotenciais recompilan esta orientación apicobasal e forman un patrón de organización radial en 2D. Recordan moitos aspectos do desenvolvemento do cerebro, como a progresión de liñaxe ou a especificación neuronal, pero carecen da organización complexa que se consegue co cultivo 3D.

Para o estudo de tumores serven como modelo pero, a parte de carecer da histoloxía típica de órgano, carece do microambiente e das interaccións propias entre tecido tumoral e tecido normal.

- As neuroesferas son agregados tridimensionais de células proxenitoras neurais que se poden empregar para valorar a súa capacidade proliferativa, pero carecen de organización e mostran as mesmas limitacións que as liñas NSC en 2D.

- Co método SFEBq (cultivo flotante, sen soro, de agregados-tipo ‘corpos embrionarios’) pódense obter rexións cerebrais individuais como retina, córtex cerebral ou pituitaria. É unha técnica similar á de formación de organoides cerebrais pero difiren na progresión do desenvolvemento e nos tempos. Esta técnica emprega factores de crecemento para estimular a diferenciación neural e a subseguinte

diferenciación en rexións específicas, mentres que os organoides adquiren de forma espontánea varias identidades de tecido cerebral e establece varias rexións internas.

A xeración de organoides cerebrais baséase na capacidade intrínseca das células nai humanas de diferenciarse en diferentes liñaxes neurais sen o suplemento extrínseco de morfóxenos ou inhibidores farmacolóxicos (Dezonne *et al*., 2017). Imita o programa de desenvolvemento endóxeno (Lancaster & Knoblich, 2014). Foi a investigadora Lancaster e os seus colaboradores os que xeraron os primeiros organoides. O seu protocolo é a base de moitos outros para a creación destas estruturas en numerosos laboratorios de investigación.

Os seus organoides cerebrais desenvolven varias rexións cerebrais discretas que inflúen unhas nas outras. Mostran unha rexión cortical, cunha organización similar á do cerebro en etapa temperá do desenvolvemento, con poboación de células proxenitoras, glía radial externa e neuronas corticais maduras que forman identidades piramidais. A súa xeración foi, nun primeiro momento, para o estudo da microcefalia (Lancaster *et al*., 2013).

A pesar das múltiples aplicacións actuais, os organoides cerebrais mostran, igual que o resto de técnicas, certas limitacións. Como método *in vitro* que é, carece dun tecido embrionario que o rodea e que é importante para establecer a comunicación entre o tecido neural e o tecido non neural, e a falta das meninxes e dunha vasculatura limita o seu crecemento. A pauta de crecemento é azarosa, depende da dispoñibilidade de nutrientes e da falta dos eixes corporais que establecerían o patrón do tecido neural. Isto provoca variabilidade entre preparacións (Lancaster & Knoblich, 2014).

Sobre unha das limitacións estivo traballando o equipo formado por Mansour e colaboradores. Propuxeron un modelo *in vivo* vascularizado e funcional dos organoides a través do seu transplante en cerebro de rato adulto. Os organoides *in vitro* carecen de microambiente, circuítos neuronais, circulación vascular e sistema inmune que si existen *in vivo*. Unhas limitacións que impiden o seu uso máis estendido. Observaron que os organoides enxertados mostran diferenciación e maduración

neuronal progresiva, glioxénese, integración da microglía e crecemento de axóns a varias rexións do cerebro do anfitrión. Tamén exhiben integración, viabilidade, supervivencia a longo prazo, actividade neuronal funcional, conexión sináptica co anfitrión e vascularización. Esta última característica é importante para recibir o aporte de O_2 e nutrientes adecuado, tanto para non limitar o seu crecemento, como para impedir que se necrose o centro, un efecto que podería interferir no seu desenvolvemento normal e nas potencias rutas migratorias das neuronas. Con este modelo é máis correcto o estudo de enfermidades ou o testado de fármacos porque se realiza baixo condicións fisiolóxicas (Mansour *et al*., 2018).

Unha variante xurdida dos organoides cerebrais orixinais é a xeración de organoides neoplásicos, coñecidos como neoCOR. Foron deseñados por Bian e colaboradores, e recapitulan a tumoroxénese cerebral a través de mutacións mediadas por transposóns e a técnica de CRISPR-Cas9. Propoñen o seu uso como complemento dos modelos básicos e preclínicos que existen para o estudo da bioloxía do tumor: iniciación, progresión e capacidade invasora; e para avaliar os efectos de fármacos en distintos contextos mutacionais (Bian *et al*., 2018).

Outra aplicación dos organoides cerebrais é a posibilidade que ofrecen para illar os distintos tipos celulares coas características fisiolóxicas e vías de sinalización que mostran no cerebro. O equipo formado por Dezonne conseguiu separar os astrocitos de organoides cerebrais para o seu estudo proteómico e análise funcional, substituíndo os métodos de obtención anteriores, como os modelos animais, o tecido cerebral *postmortem* ou os procedementos preclínicos invasivos. Tamén fan referencia á mellora que supón o emprego de organoides con respecto á xeración de astrocitos a partir de células ES ou iPS, que conta con certas restricións, como o cultivo a largo prazo, unha pureza de cultivo cuestionable (debido ao uso de factores de diferenciación que conducen ás células cara fenotipos específicos) e o elevado custo do procedemento (Dezonne *et al*., 2017).

Comentamos, brevemente, un par de estudos realizados en organoides non cerebrais para facernos unha idea, máis xeral, do potencial deste novo método de estudo:

- Análise da heteroxeneidade intratumoral, realizada por Roerink e colaboradores. Seleccionaron distintas rexións de tecidos de tumores colorrectais e illaron células únicas que creceron en cultivo 3D para formar organoides. O que se consegue, deste xeito, é amplificar poboacións de células tumorais raras e obter material suficiente para someter, neste caso, a unha análise xenética (Kuo & Curtis, 2018).

- Investigación en cancro de vexiga. O equipo formado por Lee conseguiu formar organoides a partir de fragmentos de tumores de vexiga, e xerar liñas de organoides tumorais que recapitulan o espectro mutacional deste tipo de cancros humanos. Comprobaron que o patrón de evolución clonal que observaron nos organoides é similar ao descrito en cancro de vexiga primario *in vivo*. Neste caso, o cultivo en 3D é de interese para identificar terapias combinatorias adecuadas para perfiles moleculares determinados, e para coñecer a resposta do organoide ao tratamento, porque esta podería ser recapitulada nun contexto *in vivo*.

7 CITOQUINAS

As citoquinas son polipéptidos de baixo peso molecular que teñen un papel importante na comunicación entre as células dun organismo multicelular. O modo de actuar entre elas pode ser aditivo, sinérxico ou antagónico. Como mediadores intercelulares, atópanse en concentracións en escala de nanomolar a picomolar, sintetízanse rapidamente tras unha estimulación e non se almacenan. Regulan funcións tales como supervivencia, proliferación e diferenciación. Caracterízanse pola súa redundancia, é dicir, moitas delas comparten funcións similares. Ademais son pleiotrópicas, o que significa que actúan sobre moitos tipos celulares diferentes.

En canto a súa función poden ser: autocrinas, actúan sobre a célula que as segrega; paracrinas, a súa acción desenvólvese no entorno onde se segrega; ou endocrina, cando empregan o sangue ou o plasma para alcanzar tecidos distantes onde actuar. Sempre levan a cabo a súa acción a través de receptores de membrana específicos na célula diana.

Pódense clasificar en base a súa resposta biolóxica en citoquinas pro- ou anti-inflamatorias, en función do receptor que empregan, ou segundo a súa estrutura tridimensional (Heinrich *et al*., 1998).

7.1 INTERLEUQUINA-6

En base á estrutura, composición e especificidade do complexo receptor que emprega, IL6 pertence a un grupo de citoquinas coñecido como 'familia de IL6' xunto con IL11, oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina 1 (CT1), factor inhibidor de leucemia (LIF), citoquina tipo cardiotrofina (CLC) (Heinrich *et al*., 1998) e IL27 (Rose-John, 2018). Este grupo defínese por usar a mesma subunidade glicolítica do receptor, gp130, do que xurde unha posible explicación á actividade redundante destas moléculas (Kishimoto, 2005). Todas elas activan xenes involucrados en proliferación, supervivencia, apoptose e diferenciación. Presentan propiedades pro- e anti-inflamatorias e participan fundamentalmente na hematopoese, na resposta inmune e na resposta de fase aguda (Heinrich *et al*., 2003).

A partir deste momento só nos centraremos en IL6, que ademais de ser a molécula de estudo deste traballo, tamén é a interleuquina modelo do seu grupo (Táboa 2; Kishimoto, 2005).

Varios estudos involucraban distintas citoquinas no crecemento e diferenciación de células B. Entre estas atopábase BSF2, máis tarde coñecida como IL6, que inducía a maduración final de células B en células secretoras de inmunoglobulinas. Estes coñecementos levaron a Kishimoto e ao seu equipo a realizar, en 1986, a primeira clonación de IL6, a súa análise estrutural e a expresión funcional do ADNc que codifica IL6 humano, unha interleuquina de 184 aminoácidos (Hirano *et al*., 1986; Kishimoto, 2005).

Debido á súa implicación en varias doenzas (moitas inmunolóxicas como a artrite reumatoide, artrite idiopática xuvenil sistémica, enfermidade de Castelman e a de Crohn, e en enfermidades malignas como o mieloma múltiple) e polo seu potencial patolóxico, este grupo interesouse por esclarecer os mecanismos de regulación xénica desta interleuquina. Para iso illaron o xene *Il6* murino e comparárono co de humano para identificar as potenciais secuencias reguladoras compartidas polas dúas especies. Atoparon que o xene murino consta de cinco exóns e catro intróns e, aínda que o terceiro intrón é aproximadamente dúas kilobases máis largo, a organización xeral é similar ao de humano. A semellanza na secuencia da rexión codificadora é do 60% e, tanto a rexión non traducida 3' como os primeiros 300 pb da secuencia da rexión flanqueante 5', están altamente conservadas (>80%). Nos intróns tamén atoparon varios bloques de secuencias cunha elevada homoloxía (Tanabe *et al*., 1988).

A fonte de IL6 son varios tipos celulares que a segrega tras unha estimulación adecuada durante unha infección, inflamación ou cancro. É excretada por monocitos e macrófagos, despois de que o receptores Toll (TLRs) son estimulados por antíxenos como lipopolisacáridos; por fibroblastos, queratinocitos, astrocitos e células endoteliais estimuladas con IL1; e polo conxunto de células B activadas, células T e microglía tras unha infección viral. É importante para regular a resposta de células B e T, así como para coordinar a actividade do sistema inmune innato e adaptativo (Garbers *et al*., 2018).

As actividades pleiotrópicas desta interleuquina son moitas, entre elas destacamos: a diferenciación de células B activas en células plasmáticas produtoras de inmunoglobulinas; a proliferación de células T e a súa diferenciación en células T citotóxicas; e a diferenciación terminal de macrófagos. No fígado, durante a fase aguda dunha reacción inflamatoria, IL6 estimula os hepatocitos para que produzan proteínas da fase aguda (proteína reactiva C [CRP], fibrinóxeno, α1-antitripsina e soro amiloide A [SAA]), suprime a produción de albumina, e axuda á produción de hepcidina, unha hormona peptídica que regula negativamente a absorción intestinal do ferro, que é reciclado polos macrófagos. Na medula ósea estimula a diferenciación de megacariocitos en plaquetas e ás células nai hematopoéticas a formar

colonias multipotenciais. Intervén sobre o metabolismo do óso favorecendo a diferenciación e activación dos osteoclastos; promove a produción de VEGF; e actúa como factor de crecemento de células tumorais, como plastocitoma/mieloma múltiple e carcinoma renal, e de células non tumorais como células mesanxiais de ril. Tamén promove a proliferación de queratinocitos; en fibroblastos dermais, favorece a produción de coláxeno e a súa diferenciación en miofibroblastos; e na liña celular PC12 observouse que tamén axudaba na súa diferenciación (Nishimoto & Kishimoto, 2006; Tanaka & Kishimoto, 2014).

Nome	Nº exóns	Localización	Nº transcritos		Nº aa	Pm (kDa)	Péptido sinal (predito)	Rexión transmembrana (predita)
IL6	6	7p15.3	7	IL6-001	212	27,7	SI	0
				IL6-002	152	16,8	SI	0
				IL6-003	122	13,9	NON	0
				IL6-004	136	15,6	NON	0
				IL6-005	189	21,5	NON	0
				IL6-006	198	22,1	SI	0
				IL6-201	212	23,7	SI	0
IL6R	13	1q21.3	6	IL6R-001	468	51,5	SI	1
				IL6R-002	294	32,9	NON	0
				IL6R-003	365	40,2	SI	0
				IL6R-004	170	17,9	SI	0
				IL6R-007	190	21,2	NON	1
				IL6R-201	352	38,8	SI	0
gp130	19	5q11.2	9	gp130-001	918	103,5	SI	1
				gp130-003	203	23	SI	0
				gp130-005	66	7,5	SI	0
				gp130-007	329	37,5	SI	0
				gp130-011	918	103,5	SI	1
				gp130-012	857	96,3	SI	1
				gp130-201	918	103,5	SI	1
				gp130-202	329	37,5	SI	0
				gp130-203	55	6	SI	1

Táboa 2| Información sobre IL6 humana e o seu receptor. Datos acerca do xene, como o número de exóns que o compoñen ou a localización cromosómica, e información da proteína, tales como o número de transcritos posibles, o número de aminoácidos que os conforman e os seus pesos moleculares. Tamén se indican outras características, como a presenza ou non de péptido sinal e/ou rexión transmembrana.

7.1.1 Estrutura

IL6 é un polipéptido de vida corta de 21-28 kDa, dependendo do grao de glicosilación (Johnson *et al*., 2018) e está formado, segundo os estudos de cristalografía por raios X, por catro α-hélices. A hélice A está unida á hélice B por un lazo largo e mantéñense nunha conformación paralela. A hélice B conéctase coa C por un enlace moi curto que só permite un ensamblaxe antiparalelo. Igual que antes, a hélice C mantense unida á D por outro lazo longo, permitindo que os dous extremos C-terminais se dispoñan en paralelo. En conxunto, a estrutura abarca unha topoloxía 'arriba-arriba-abaixo-abaixo' moi particular porque, se se tirase do extremo N- e C-terminal en dirección oposta, acabaríase formando un nó (Figura 6).

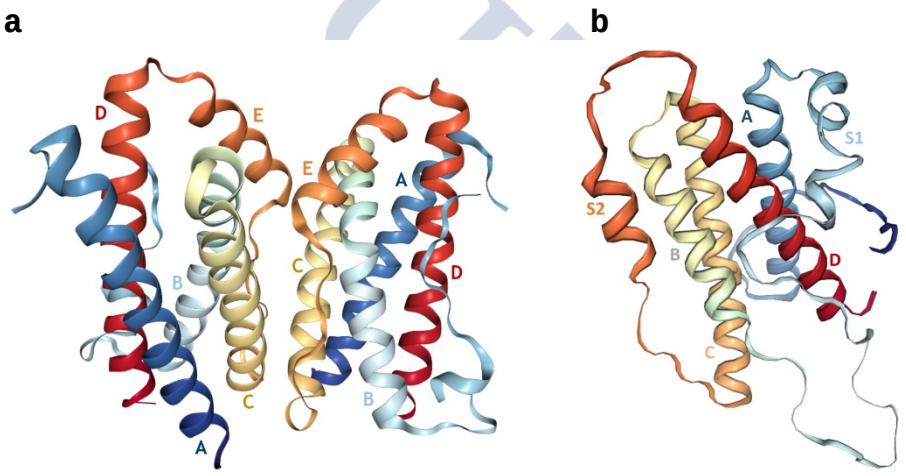


Figura 6| Estrutura proteica de IL6 humana e murina. a| IL6 humana está formada por catro α-hélices, indicadas como A, B, C e D. As hélices A e B van na mesma dirección e están conectadas por un lazo longo; as hélices C e D van en dirección oposta e tamén están conectadas entre si por outro lazo longo, onde aparece unha hélice extra marcada como E. A conexión entre as hélices B e C realízase por unha lazada curta (PDB ID: 1ALU; Somers, 1997). **b|** IL6 murina consta tamén de catro α-hélices relativamente longas: A, B, C e D, e outras dúas menos definidas marcadas como S1 e S2, ademais de varios lazos de conexión (PDB ID: 2L3Y; Veverka *et al*., 2012).

Estudos de mutaxénese demostraron que IL6 presenta tres sitios de unión ao receptor (Boulanger, 2003; Heinrich *et al*., 1998):

- Sitio 1: formado por residuos do extremo C-terminal da hélice D e o extremo C-terminal do lazo A-B. Este sitio determina a especificidade de unión do receptor α.

- Sitio 2: consiste en residuos localizados cerca da metade da hélice A e C. A través deste sitio prodúcese a interacción do complexo binario IL6/IL6Rα co dominio CBM de gp130.

- Sitio 3: no que están involucrados residuos do final do lazo C-D, do extremo N-terminal da hélice D e do extremo N-terminal do lazo A-B. É o lugar onde se recruta a segunda molécula de gp130 a través do seu dominio tipo IgG.

7.1.2 Receptor de IL6

Para exercer as súas funcións, IL6 debe unirse ao seu receptor específico.

O receptor de IL6 (IL6R) consta de dúas subunidades. Unha subunidade α que se une especificamente a IL6, e unha subunidade β, coñecida como glicoproteína 130 (gp130), encargada de transmitir o sinal ao interior da célula e que é común para todos os receptores de citoquinas relacionadas con IL6.

7.1.2.1 IL6R (subunidade α)

O grupo de Kishimoto continuou coa investigación de IL6 e a necesidade de esclarecer a vía de sinalización desta molécula e das demais citoquinas. Conseguiron illar o ADNc de *IL6R* e coñecer a súa estrutura proteica de 468 aminoácidos (Kishimoto, 2005; Yamasaki *et al*., 1988).

É unha proteína de membrana de tipo I de 80 kDa, formada por un extremo N-terminal extracelular, un dominio transmembrana (~ 28 aa) e un extremo C-terminal intracelular moi curto (~ 82 aa) que carece dun dominio tirosina quinasa e, polo tanto, sen capacidade de sinalización. Esta singularidade levou a suxerir que a transdución do sinal se levaba a cabo por un mecanismo bioquímico diferente ao descrito en receptores de factores de crecemento, que si albergan na súa estrutura un dominio tirosina quinasa.

A súa rexión extracelular presenta unha serie de características que a levan a incluír dentro da clase I da familia de receptores de citoquinas. No extremo N-terminal presenta un dominio tipo IgG de aproximadamente 90 aminoácidos, seguido, como mínimo, por un dominio de unión á citoquina (CBM) que, a súa vez, está composto por dous subdominios tipo fibronectina III, cada un deles cunha estrutura conservada: o do extremo N-terminal contén un conxunto formado por catro cisteínas, e o do C-terminal presenta un motivo 'triptófano-serina-X-triptófano-serina' (Figura 7; Heinrich *et al*., 1998; Yamasaki *et al*., 1988).

A rexión intracelular, aínda que non sexa necesaria para a transmisión do sinal, parece ter un papel importante en dirixir o conxunto da molécula á membrana basolateral das células polarizadas. Esta función realízase a través do motivo de tirosina e dileucina presente no extremo C-terminal. Un motivo similar tamén se identificou en gp130, onde parece ter a mesma función (Figura 7; Heinrich *et al*., 2003; Martens *et al*., 2000).

IL6 presenta unha gran afinidade pola subunidade α do receptor, pero non así pola β. Pero é este último o que se expresa en todas as células, mentres IL6R mostra un patrón de expresión máis restrinxido e fortemente controlado (basicamente en hepatocitos, certas células epiteliais, algúns leucocitos e megacariocitos). Este feito limita o número de células que responden a IL6. A existencia dunha forma soluble da subunidade α, sIL6R, amplía o rango de actuación da interleuquina. IL6 mostra unha afinidade por este receptor similar á que ten por IL6R e, polo tanto, permite que as células que carecen deste último, pero que si presentan gp130 (expresado de forma ubicua), poidan ser igualmente estimuladas (Garbers *et al*., 2018; Heinrich *et al*., 2003). A liberación de sIL6R por neutrófilos, monocitos e células T infiltradas ao tumor, proporcionan a IL6 a oportunidade de activar a súa vía de sinalización en células tumorais e estromais con baixos niveis, ou ningún, de IL6R (Johnson *et al*., 2018).

Son dúas as explicacións dadas para a orixe da forma soluble do receptor: unha baséase na modificación post-traducional da proteína, a través da acción proteolítica da proteasa desintegrina e o dominio

metaloproteinasa da proteína 17 (ADAM17; Müllberg *et al*., 1994; Riethmueller *et al*., 2017); e a outra sostén a existencia dun corte e empalme alternativo do ARNm que codifica para a proteína transmembrana (Lust *et al*., 1992).

No soro tamén existe a forma soluble de gp130, sgp130, que actúa como antagonista do complexo IL6/sIL6R. A combinación natural de sIL6R e sgp130 pode actuar como tampón para modular a resposta sistémica á IL6 circulante (Heinrich *et al*., 2003).

IL6R desencadea o que se coñece como sinalización clásica: o ligando únese ao receptor de membrana para desencadear toda unha cascada de eventos que remata cunha resposta fisiolóxica por parte da célula. Pero esta non é a única vía descrita para IL6. Existe a vía de *trans*-sinalización, que é a que se orixina a partir do complexo IL6/sIL6R; e unha terceira, a sinalización *cluster*, que se xera entre a célula dendrítica, que actúa de doante, e a célula T, que é o receptor porque non presenta IL6Rα. O complexo IL6/IL6Rα, que se forma na membrana da célula plasmática, preséntase a modo *trans*- á célula T e activa a súa subunidade β (gp130). A resposta final é a diferenciación da célula T *helper* no subconxunto Th17 (Garbers *et al*., 2018; Heink *et al*., 2017).

A vía de sinalización clásica parece mediar os efectos anti-inflamatorios de IL6. É a responsable das actividades protectoras e rexenerativas: proliferación das células epiteliais do intestino, inhibición da apoptose epitelial, rexeneración do fígado e páncreas, resposta da fase aguda no fígado e defensa fronte a infeccións bacterianas. Por outra parte, a sinalización *trans*- parece ser a principal responsable da actividade pro-inflamatoria e da activación do sistema inmune: recrutamento de células mononucleares, estimulación de células endoteliais e células do músculo liso, inhibición da apoptose en células T e inhibición da diferenciación das células T reguladoras (Rose-John, 2018). Ten tamén un papel importante no microambiente tumoral, onde controla o recrutamento de leucocitos e a activación inflamatoria das células do estroma asociado ao tumor (Johnson *et al*., 2018).

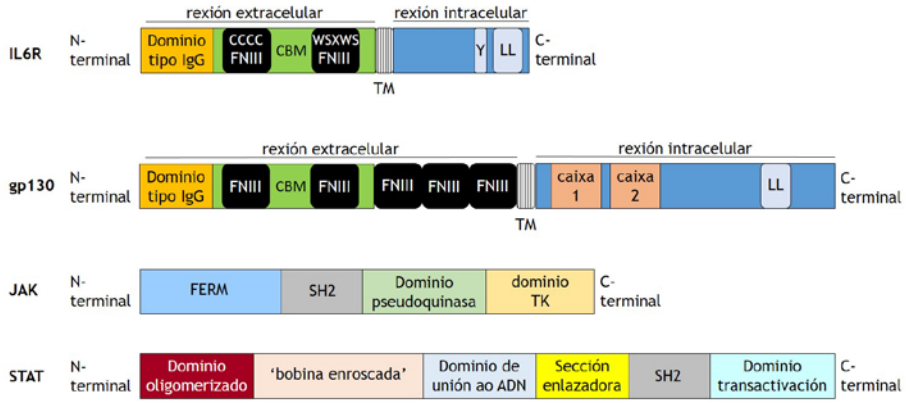


Figura 7| Estrutura dos distintos compoñentes da sinalización de IL6. Representación dos dominios que conforman as moléculas de IL6R, gp130, JAK e STAT (FNIII, fibronectina III; TM, transmembrana; TK, tirosina quinasa)

7.1.2.2 gp130 (subunidade β)

O complexo formado por IL6 e IL6R une un segundo compoñente, a glicoproteína de membrana gp130.

No traballo de Taga de 1989 descubriron que, tras someter ás células a IL6, a molécula IL6R, obtida por inmunoprecipitación, estaba asociada a outra de 130 kDa. Cando non sometían ás células a unha estimulación previa coa interleuquina, só precipitaba a proteína de 80 kDa. A partir deste dato especularon que o receptor de IL6 estaba formado por dúas cadeas polipeptídicas, e que a estimulación de IL6 provocaba a asociación entre ambas. Identificaron esta molécula de 130 kDa como unha glicoproteína de membrana localizada no exterior da célula e nomeárona gp130 (Kishimoto, 2005; Taga *et al.*, 1989).

É unha proteína de membrana que consta dunha porción extracelular, formada por un dominio tipo IgG no extremo N-terminal e varios dominios tipo fibronectina III, dous dos cales forman a rexión de unión á citoquina (CBM); un fragmento transmembrana; e unha porción citoplasmática moi longa que reflexa a súa función como transdutor do sinal. Nesta última parte identificáronse motivos de dileucina, necesarios para a internalización do ligando, e dúas secuencias coñecidas como caixa 1 e caixa 2, que interveñen na unión de gp130 coas tirosina quinasas JAK (Figura 7).

A interacción de IL6 con IL6R, ou con sIL6R, induce a homodimerización de gp130. As dúas rexións CBM do homodímero están separadas 9 nm, e son os dominios de fibronectina III os que salvan esta distancia, favorecendo a aproximación dos fragmentos citoplasmáticos para que sexan activados pola asociación das proteínas JAK (Heinrich *et al*., 2003). Os estudos de cristalografía revelaron que o complexo ternario, composto por IL6, o dominio extracelular de IL6Rα e o dominio extracelular de gp130, forma un hexámero que contén dúas copias de cada unha destas moléculas. Esta ensamblaxe fórmase de maneira secuencial e cooperativa: primeiro únese IL6 a IL6R estabilizando un complexo preformado que, posteriormente, se somete a cambios conformacionais que lle permite adoptar unha xeometría adecuada para presentarse a gp130 e activar a súa dimerización (Figura 8). Esta arquitectura mantense conservada en todos os sistemas de sinalización citoquina-gp130 (Boulanger, 2003; Heinrich *et al*., 2003).

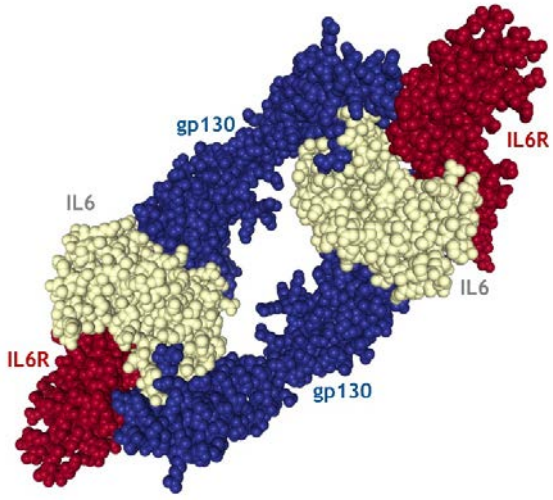


Figura 8| Estrutura do complexo hexamérico IL6/IL6Rα/gp130 humano. A formación do complexo realízase de maneira secuencial. Primeiro, IL6 e IL6Rα forman un complexo binario ao que, posteriormente, se asocian os dominios D2 e D3 de gp130, formando un complexo binario sen capacidade de sinalización. A subseguinte unión do dominio D1 de gp130 ao complexo permite a formación dun hexámero competente, pero é necesaria a ensamblaxe dos tres dominios membrana-proximais de gp130 para formar o complexo de sinalización final (PDB ID: 1P9M; Newman, 2003).

7.1.3 Transdución intracelular activada por IL6

O sinal desencadeado por IL6 está mediada por tres vías: a vía de JAK-STAT, a cascada de MAPK e a de PI3K.

7.1.3.1 Vía de JAK/STAT

A unión de IL6 a IL6R induce a dimerización de gp130 que, a súa vez, activa proteína quinasas da familia JAK que ten asociadas, de forma constitutiva, á súa rexión citoplasmática. Estas quinasas fosforilan e activan factores de transcrición da familia STAT, que se atopan latentes no citoplasma, favorecendo a súa dimerización e traslado ao núcleo, onde estimulan ou reprimen a expresión dos seus xenes diana (Figura 9).

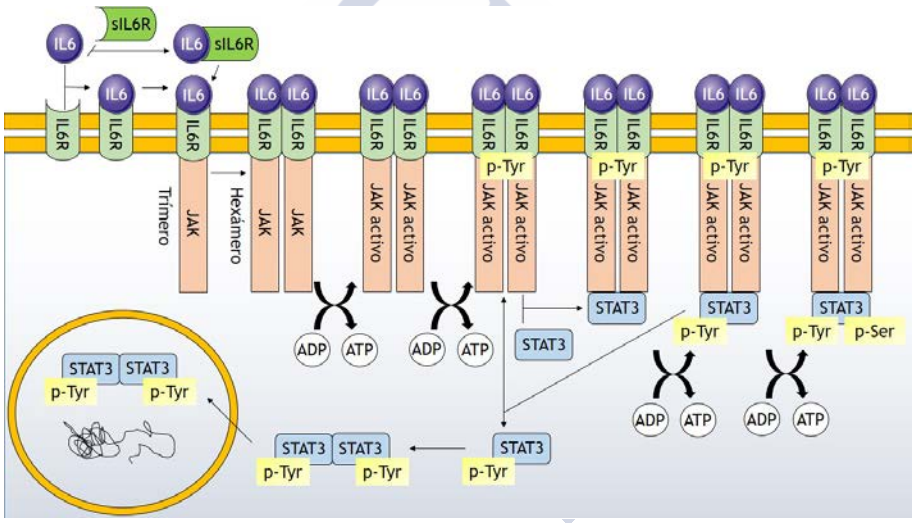


Figura 9| A vía de sinalización JAK/STAT3 desencadeada por IL6. A formación do hexámero IL6/IL6Rα/gp130 provoca a activación das JAK, asociadas á rexión intracelular de gp130 de forma constitutiva. As JAK, na súa forma activa, fosforilan residuos de tirosina da rexión citoplasmática de gp130, o que desencadea a activación de STAT3 e a formación de homo- ou heterodímeros que se trasladan ao núcleo, onde levan a cabo a regulación da transcrición xénica.

7.1.3.1.1 JAK

É unha familia de tirosina quinasas intracelulares que actúan na transdución do sinal, así como na regulación da expresión na superficie celular de determinados receptores de citoquinas. En mamíferos identificáronse catro membros: JAK1, JAK2 e TYK2, amplamente expresados, e un cuarto, JAK3, restrinxido a células de orixe hematopoética.

Todas elas comparten similitudes estruturais e presentan un peso molecular de 120-140 kDa. Esta estrutura caracterízase por conter, no extremo C-terminal, un dominio tirosina quinasa cuxa actividade está regulada polo dominio pseudoquinasa que lle sucede. Este último carece de actividade catalítica. A continuación está o dominio SH2 e, no extremo N-terminal, a rexión FERM, crucial para a asociación ao receptor (Figura 7; Heinrich *et al*., 2003; Heinrich *et al*., 1998; Johnson *et al*., 2018).

A activación de JAK implica a fosforilación de residuos de tirosina presentes na rexión citoplasmática de gp130 favorecendo, por unha parte, a activación da vía RAS-MAPK-PI3K e, por outra parte, a fosforilación e activación de STAT1 e STAT3 (Garbers *et al*., 2018).

Ademais da familia JAK, hai outras quinasas que tamén participan na sinalización de IL6, por exemplo: as quinasas da familia Src, a CDK9 e a PKCδ (Heinrich *et al*., 2003).

7.1.3.1.2 STAT

É unha familia de factores de transcrición formada, en mamíferos, por sete membros: STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b e -6. Todos eles exprésanse de forma ubicua excepto STAT4, que está máis restrinxida. Non se identificaron xenes que codifican estas proteínas de 90 kDa en sistemas unicelulares, incluíndo lévedos, o que suxire que a súa aparición se dou co desenvolvemento de organismos multicelulares.

A súa estrutura mostra unha organización conservada, formada dende o extremo N- ao C-terminal por: un dominio oligomerizado, unha rexión coñecida como ‘bobina enroscada’, un dominio de unión ao ADN na metade da molécula e seguido por unha sección enlazadora. A continuación aparece un dominio SH2, moi conservado e responsable

da unión dos STAT aos motivos de tirosina fosforilados do receptor, así como da súa dimerización, e, por último, o dominio de transactivación, onde se fosforila a serina 727 para regular a actividade transcricional, neste caso, de STAT3 e -1 (Figura 7; Eulenfeld *et al*., 2012; Heinrich *et al*., 2003; Heinrich *et al*., 1998).

Para que a activación dos STAT sexa posible, é necesaria a súa unión transitoria ao receptor de citoquinas. Estes factores de transcrición son fosforilados tanto a nivel de tirosina como de serina, e ambas son necesarias para traducir, de maneira cooperativa, o sinal de liberación da citoquina nunha resposta biolóxica (Eulenfeld *et al*., 2012).

A homodimerización de gp130 activa preferentemente a STAT3, que tamén resulta ser o máis fortemente asociado coa progresión tumoral e inmunosupresión, e o único cuxa deleción xenética resulta en letalidade embrionaria (Johnson *et al*., 2018; Rose-John, 2018). STAT3 únese a motivos 'fosfo (p)tirosina-X-X-glutamina' da subunidade β do receptor e é fosforilado na tirosina 705 para poder formar os dímeros activos e trasladarse ao núcleo. Como o seu tamaño excede o límite de exclusión do poro nuclear, propúxose un transporte activo. Varios estudos atoparon en STAT1 diversos sinais de localización nuclear (NLS) e sinais de exportación nuclear (NES), estas últimas necesarias para a unión de STAT1 ao receptor de importación, importina-α5, e entrar no núcleo. Existe un solapamento funcional entre as secuencias de unión ao ADN, NLS e NES, o que indica que a unión ao ADN ten un papel importante no trasporte núcleo-citoplasmático das proteínas STAT.

A dimerización dos STAT é un pre-requisito para a súa unión ao ADN, e a composición destes dímeros determina os elementos do ADN aos cales unirse. STAT3 e -1 mostran preferencia polas rexións $TTCN_3GAA$, que son rexións promotoras de xenes que codifican proteínas da fase aguda (Heinrich *et al*., 2003).

7.1.3.1.3 Balance entre a activación STAT e MAPK

IL6 regula a proliferación celular a través da acción concertada de STAT3 e MAPK. A primeira vía desencadea sinais anti-apoptóticas a través de Bcl2, e tamén controla a expresión das ciclinas D2, D3 e A,

da fosfatasa Cdc25A e dos inhibidores do ciclo celular p21 e p27. A vía MAPK actúa como sinal mitoxénica. O balance entre unha e a outra vía depende do estado de fosforilación da tirosina 759 (Y759) de gp130, e resulta crucial para a homeostase do organismo e o control da proliferación celular (Eulenfeld *et al*., 2012; Schaper & Rose-John, 2015).

7.1.3.1.4 Regulación negativa: SOCS e SHP2

Para prever a sobre-estimulación de citoquinas xurdiron mecanismos que apagan esta sinalización. Entre eles atópanse as proteínas inhibidoras SOCS, que actúan a través dun bucle de retroalimentación negativo: son inducidas pola vía JAK/STAT e, ao mesmo tempo, inhiben a transdución do sinal mediado por STAT (Heinrich *et al*., 2003).

A estimulación de IL6 provoca:

- Activación e traslado de STAT ao núcleo, onde inicia a expresión de xenes diana, entre eles o que codifica SOCS3. Esta proteína únese a pY759 de gp130 e inhibe a sinalización JAK/STAT.

- Recrutamento da tirosina fosfatasa SHP2 tamén a pY759 de gp130 para a activar a cascada MAPK.

Non obstante, se este residuo de tirosina non se atopa fosforilado, gp130 non é sensible ao inhibidor SOCS3, polo que se mantén activa a vía de STAT; e tampouco pode unir SHP2, impedindo a activación da cascada MAPK (Eulenfeld *et al*., 2012).

7.1.3.2 Activación da cascada MAPK

SHP2, recrutado por pY705 de gp130, é fosforilado por JAK1 para logo interaccionar co complexo Grb2-SOS. Isto supón a aproximación de SOS (factor de intercambio de nucleótidos de guanina) a RAS onde media o intercambio de GDP por GTP e, polo tanto, a activación desta pequena proteína G de membrana. Este é o primeiro paso para activar a vía MAPK.

Un dos resultados da activación da cascada MAPK por IL6 é a fosforilación da proteína adaptadora Gab1 na serina 552 e, como consecuencia, o seu traslado á membrana plasmática, onde é recrutada por fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP_3). PIP_3 xurde pola acción da quinasa PI3K sobre fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato e a súa presenza depende do balance entre PI3K e fosfatasas lipídicas como PTEN. Na membrana, Gab1 actúa como plataforma de sinalización doutras proteínas, tales como: SHP2, Grb2, PI3K, fosfolipasa Cγ e RAS-GAP. No caso da unión de Gab1 a SHP2 o resultado é a activación de ERK2 (Eulenfeld *et al*., 2012).

A vía de MAPK dependente de IL6 non só desencadea a activación de ERK1/2, que xoga un papel importante en proliferación celular, senón tamén activa outros membros implicados no estrés celular, como p38 e JNK (Heinrich *et al*., 2003).

7.1.3.3 Activación da cascada PI3K/AKT

A activación da vía PI3K/AKT por IL6 está relacionada coa protección fronte á apoptose e coa proliferación celular.

Como xa se mencionou anteriormente, Gab1 interacciona con PI3K. Este enzima modifica fosfatidilinosítidos da membrana plasmática, o que favorece a unión da proteína serina/treonina quinasa B/AKT a esta estrutura celular. AKT actúa sobre proteínas involucradas na supervivencia e crecemento celular, tales como o factor de transcrición FKHR e o factor pro-apoptótico Bad (Heinrich *et al*., 2003).

7.2 SINALIZACIÓN DE IL6 EN CANCRO: O SEU PAPEL EN GB

Nos casos de GB, igual que en outros tipos de cancro (Cadro 4), os pacientes mostran niveis elevados de IL6 circulante. Estes valores aumentan tras a cirurxía e a quimio-radioterapia, e en enfermos con tumores recorrentes. Esta interleuquina é empregada como indicador de prognostico, supervivencia e resposta á terapia.

Son varios os tipos celulares localizados no tumor que producen IL6: as células inmunes infiltradas, as células do estroma e as propias células tumorais. Neste último caso, as mutacións en oncoxenes poden ser un desencadeante (Ancrile *et al*., 2007; Caetano *et al*., 2016;

Johnson *et al*., 2018). Outra fonte importante desta interleuquina no tumor son as células senescentes a través da activación do SASP, do cal, como xa mencionamos anteriormente, esta interleuquina é o factor principal, xunto con IL8 (Coppé *et al*., 2008; Yeung *et al*., 2013). O resultado dunha expresión tan ubicua de IL6, mediada basicamente polo factor de transcrición NF-κB, é o aumento dos seus niveis no microambiente tumoral, onde dirixe un estado pro-inflamatorio en colaboración con outras citoquinas e factores (Johnson *et al*., 2018). Neste contexto podemos diferenciar dous niveis de actuación de IL6, unha autocrina e outra paracrina: efecto célula-autónomo e efecto sobre o microambiente, respectivamente (Figura 10).

- Nivel de actuación célula-autónomo. IL6 actúa directamente sobre as células tumorais inducindo a expresión de xenes diana de STAT3. Entre estes xenes están os que codifican proteínas que favorecen a proliferación celular (ciclina D1 e MYC), a anxioxénese (VEGF) e a invasión e metástase (MMPs). Tamén están os xenes que codifican factores de crecemento inmunosupresivos e citoquinas (IL10, TGFβ, VEGF), entre elas IL6, indicando a participación dun bucle de retroalimentación positivo (Johnson *et al*., 2018; Shan *et al*., 2015). Esta interleuquina tamén é responsable da resistencia á morte celular, ou supervivencia, posto que rompe o balance que se establece entre as proteínas pro- e anti-apoptóticas a favor das últimas, promovendo a expresión de Bcl2, Bcl-xL e Mcl-1 a través de STAT3 e NF-κB (West *et al*., 2018).

Os tumores sólidos, como o GB, caracterízanse por mostrar hipoxia cando o seu crecemento é rápido e o suplemento de sangue inadecuado. Nestas circunstancias actívase a autofaxia, un programa de catabolismo celular evolutivamente conservado, para asegurar a supervivencia do tumor a través da inhibición da apoptose e promoción da proliferación celular. Observouse que nun entorno hipóxico a maior porcentaxe de IL6 presente procede, principalmente, de células tumorais, e comprobouse que, a través de STAT3 (que regula a transcrición de HIF1α, un factor de transcrición involucrado na adaptación da célula ao estrés hipóxico), ten un papel na activación da autofaxia inducida por hipoxia (Xue *et al*., 2016).

Máis recente foi o descubrimento da implicación desta citoquina na reprogramación celular (Mosteiro *et al*., 2016; Mosteiro *et al*., 2018). Fai que as células tumorais sexan máis permisivas á desdiferenciación, unha característica frecuente en cancro e que contribúe á súa progresión (Taguchi & Yamada, 2017).

- Actuación a nivel de microambiente. IL6 actúa como nexo de unión entre a inflamación crónica e a progresión tumoral, e como xa se mencionou en temas anteriores, a inflamación crónica constrúe un entorno pro-tumoral. Esta interleuquina modula o microambiente cara un fenotipo inmunosupresor: recruta macrófagos de tipo M2 e células mieloides supresoras, estimula a infiltración e/ou diferenciación de células Th17 e T reguladoras, inhibe a diferenciación de Th1 e a actividade citotóxica de células T $CD8^+$, e favorece a polarización de monocitos cara o estado M2 (Caetano *et al*., 2016; Johnson *et al*., 2018; Xue *et al*., 2016).

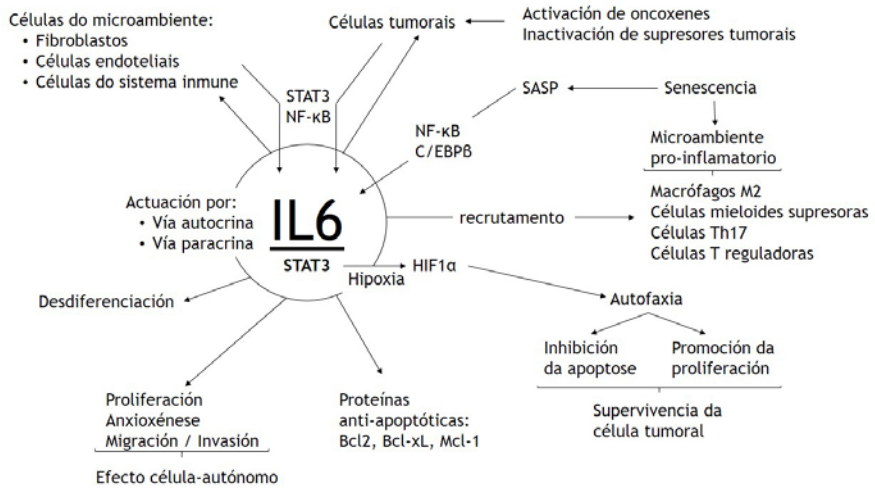


Figura 10| Papel de IL6 en GB. IL6 exerce unha dobre función no GB porque, por un lado, ten un efecto célula-autónomo que favorece a proliferación, anxioxénese, invasión, metástase e desdiferenciación celular; e por outro, un efecto a nivel de microambiente, xerando un entorno inmunosupresor e pro-tumoral. Ambos papeis van encamiñados a un mesmo propósito: o crecemento e a progresión do tumor

Varios estudos, realizados en diferentes contextos e tipos tumorais, observaron que ao interromper a vía de sinalización de IL6, actuando sobre a propia molécula, ben a través da ablación do seu xene (Ancrile *et al*., 2007; Weissenberger *et al*., 2004) ou a través do bloqueo da proteína cun anticorpo específico (Caetano *et al*., 2016), reducíanse moitos dos seus efectos aquí explicados e o resultado final era a redución do tamaño do tumor e un retraso no tempo de aparición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cadro 4	O papel de IL6 en distintos cancros	
Cabeza-pescozo	• IL6 favorece a progresión tumoral e metástase a través da modulación da anxioxénese • Un aumento da expresión do seu xene correlaciónase coa recorrencia tumoral, metástase e mal prognóstico • Promove a proliferación, a migración, a supervivencia, a invasión, o fenotipo *stemness* e a quimioresistencia • Potencia o mecanismo EMT a través da vía JAK/STAT/Snail • Regula unha complexa e recíproca rede de citoquinas e proteasas • Promove a progresión maligna por mecanismos autocrinos e paracrinos	Choudhary *et al*., 2016 Yadav *et al*., 2011
Esófago	• IL6 promove a proliferación, migración, invasión, inhibición da apoptose, aceleración da anxioxénese, crecemento e diferenciación • Induce EMT a través da vía STAT3 • Aporta un microambiente cómodo para o crecemento tumoral • IL6 producida polos CAFs favorece a resistencia á quimioterapia a través do aumento da expresión da quimioquina CXCR7 pola vía STAT3/NF-κB • A inhibición de CXCR7 supón a inhibición da proliferación dependente de IL6, a inhibición da quimioresistencia e a diminución da expresión de xenes relacionados co mecanismo EMT e *stemness* • Estudos baseados no uso de vectores para silenciar *IL6* observaron que nas liñas KYSE170 e TE13 producíase unha redución da proliferación e invasión. Tamén detectaron que diminuía o crecemento tumoral en *xenografts* nun modelo murino	Ladeira *et al*., 2017 Qiao *et al*., 2018 Zhao *et al*., 2016
Estómago	• Os CAFs producen gran cantidade de IL6 que, a través da vía JAK/STAT, aumenta a migración celular e favorecen o mecanismo EMT • O emprego de anticorpos anti-IL6 ou inhibidores da vía JAK/STAT diminúe este fenotipo • O silenciamento do xene *IL6* ou a inhibición da vía JAK/STAT tamén impiden a metástase peritoneal • O aumento de IL6 correlaciónase positivamente co aumento de macrófagos M2 • IL6 promove a conversión de macrófagos normais ao fenotipo M2 a través da vía STAT3. Estes macrófagos teñen unha función pro-tumoral: promoven a proliferación e a migración	Fu *et al*., 2017; Wu *et al*., 2017

Pulmón	• IL6 está asociada cun mal prognóstico
	• En oncoxénese mediada por K-RAS observaron que exerce un papel oposto en iniciación e crecemento:
	  • Ratos *Il6*$^{-/-}$ mostran maior número de tumores que os *Il6*$^{+/+}$ pero significativamente máis pequenos
	  • Dificulta a iniciación por regular a homeostase, os macrófagos e a activación das células T citotóxicas.
	  • Promove o crecemento a través da indución da ciclina D1
		Qu *et al*., 2015

Fígado	• IL6 é considerada a principal condutora da carcinoxénese hepatocelular
	• Móstranse niveis altos de IL6 e sIL6R en soro
	• Nun modelo murino de cancro hepático con uso de dietilnitrosamina (DEN):
	  • Na fase inicial, o dano producido por DEN nos hepatocitos activa as células de Kupffer, que segregan IL6. Esta interleuquina promove a proliferación dos hepatocitos e mantén o fenotipo de célula nai a través dos macrófagos M2
	  • IL6 promove a transformación de macrófagos M1 a M2
	• Outro modelo de estudo: en ratos deficientes en proteína 2 de resistencia a multidrogas, a inhibición de IL6 ou STAT3 agrava o dano nos hepatocitos porque se altera a vía EGFR e aumenta a síntese de ácidos biliares. Aumenta a fibrose e, polo tanto, a predisposición á formación de tumores
	• Tim-3 promove o crecemento tumoral a través de IL6/STAT3: fosforila NF-κB p65, cuxo xene diana é *IL6*
		Schmidt-Arras & Rose-John, 2016
		
		Zhang *et al*., 2018

Hemato-lóxicos	• Un nivel elevado de IL6 en soro está relacionado cun mal prognóstico • En mieloma múltiple: IL6 aparece no microambiente da medula ósea, onde, a través de accións autocrinas e paracrinas, actúa como factor de crecemento e supervivencia, e favorece a migración e a resistencia ao tratamento • En leucemias e linfomas: os niveis de IL6 e sIL6R en soro son elevados. A través da súa acción autocrina emite sinais proliferativos e anti-apoptóticos • En leucemia mieloblástica: describíronse efectos estimuladores e inhibidores de IL6 sobre o crecemento de blastos clonoxénicos • En leucemia promielocítica aguda: IL6 participa na diferenciación	Burger, 2013

Próstata	**EFECTO ESTIMULADOR**
	• IL6 correlaciona negativamente coa supervivencia e está asociada cun cancro de fenotipo agresivo
	• Co bloqueo da vía IL6/STAT3 observaron unha inhibición do crecemento do tumor de próstata *in vitro* e *in vivo*. En clínica, o anticorpo anti-IL6 non ten éxito como monoterápico en estudos de fase II en pacientes con metástase de cancro de próstata
	• Mostra un efecto oncoxénico. Regula a proliferación, apoptose, anxioxénese, diferenciación e metástase
	• A través da vía JAK/STAT3, mantén o fenotipo *stemness*. IL6 aumenta nos exosomas en condicións hipóxicas, o que aumenta o potencial *stemness* das células tumorais
	• Participa na interacción bidireccional entre o estroma e o epitelio:
	  • O estroma é fonte de IL6, que favorece o mecanismo EMT
	  • IL6 segregada polo tumor regula a activación de fibroblastos
	• Induce a diferenciación neuroendocrina: efector paracrino de neuropéptidos que estimulan a proliferación e anxioxénese
	EFECTO INHIBIDOR
	• Na liña LNCaP observaron que IL6 induce a detención do ciclo celular na fase G1. Diminúe a actividade de CDK2, 4 e 6 por inducir a expresión do inhibidor do ciclo $p27^{Kip1}$ (este efecto é dependente da liña celular)
	• IL6 producida polas células estromais de próstata sa ten un efecto inhibidor do crecemento na liña LNCaP
		Culig, 2014
		
		Culig & Puhr, 2018
		
		Degeorges *et al*., 1996
		
		Mori *et al*., 1999
		
		Nguyen *et al*., 2014

Ril	• IL6 e IL6R son importantes para o desenvolvemento tumoral • As liñas celulares de cancro renal con mutacións no xene *TP53* mostran maior nivel de expresión de *IL6* • A activación de STAT3 dependente de IL6 prevén a apoptose, aumenta a proliferación, a anxioxénese, a invasión e promove a evasión do sistema inmune • O complexo IL6/sIL6R actúa como mediador da metástase • A través da vía PI3K, suprime a apoptose e promove a mobilidade celular • Un estudo clínico mostrou que o polimorfismo 174CC no promotor do xene *IL6* vai asociado cun aumento do risco na susceptibilidade ao cancro renal	Kamińska *et al*., 2015 Liu *et al*., 2015

Cervix	• *In vitro* non observaron cambios na cinética de crecemento • *In vivo*, IL6 promove o crecemento do cancro cervical a través da vía STAT3, co aumento da expresión de VEGF	Wei *et al*., 2003
Mama	• Existe unha expresión elevada de *IL6* • Regula o microambiente e o comportamento tumoral: estimula a proliferación celular e a invasión • Involucrada en *stemness*, anxioxénese, caquexia e resistencia á terapia • Induce EMT • Actúa por vía autocrina	Gyamfi *et al*., 2018

Ovario	• As células tumorais mostran unha activación constitutiva de STAT3 que desencadea a produción autocrina de IL6
	• IL6 activa tamén a vía JAK/STAT en células veciñas, aumentando os seus niveis e favorecendo a xeración dun microambiente inflamatorio que mantén o crecemento tumoral e a metástase
	• IL6R xoga un papel importante na progresión tumoral:
	  • Favorece a proliferación, supervivencia, migración e invasión
	  • Favorece a quimioresistencia
	  • Estimula a polarización de macrófagos ao fenotipo M2, responsables da supresión da resposta inmune e da estimulación da anxioxénese e da metástase
	  • Dirixe a diferenciación das células T $CD4^+$ a Th17, que colaboran co crecemento tumoral por aumentar a microvasculatura e a produción de IL6
	  • Estimula a indución de células dendríticas toleroxénicas
		Kumar & Ward, 2014;
		
		Milagre *et al*., 2015;
		
		Wen *et al*., 2014

Páncreas	• IL6 colabora na oncoxénese, anxioxénese e metástase • Contribúe ao mecanismo EM • Participa na resistencia ao tratamento	Pop *et al*., 2017
Melanoma	**EFECTO ESTIMULADOR** • O aumento de IL6 en plasma correlaciónase cun mal prognóstico • Estudos clínicos propoñen a IL6 como biomarcador para a detención do cancro en estadio temperá **EFECTO INHIBIDOR** • Inhibe o crecemento en células de melanoma	Armstrong *et al*., 1994; Kucera *et al*., 2015; Young *et al*., 2017

Endometrio	• Un maior nivel de expresión de *IL6* correlaciona cun peor prognóstico • Promove a proliferación celular • Promove a súa propia síntese a través dun bucle autocrino e depende da vía ERK/NF-κB • Actúa como nexo de unión entre a inflamación e a transformación maligna • A través da vía STAT3, está implicada na autorenovación de células nai e na súa formación *de novo* a través da indución de EMT	Che *et al*., 2014 Van Der Zee *et al*., 2015

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OBXECTIVOS

Moitos dos traballos realizados no campo da oncoloxía baséanse en modelos de células mesenquimais, máis fáciles de establecer pero que non se axustan adecuadamente á realidade porque a maior porcentaxe de cancros humanos son de orixe ectodérmica/endodérmica. Estudos previos, realizados no laboratorio, concluíron diferenzas no comportamento entre fibroblastos e astrocitos. En base a isto, é a publicación de diversos traballos que relacionan a progresión tumoral con IL6, e esta coa desdiferenciación celular, xurdiron os obxectivos deste traballo:

- Estudar o papel que exerce IL6 durante a transformación celular, empregando para elo un modelo de glioma

- Analizar o grao de desdiferenciación que se produce no modelo de glioma e a implicación de IL6 no proceso

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL E MÉTODOS

1 RATOS MODIFICADOS XENETICAMENTE

1.1 CONDICIÓNS DE ESTABULACIÓN

As colonias de ratos empregadas neste estudo mantivéronse no Animalario do Centro de Investigación en Medicina Molecular e Enfermidades Crónicas (CIMUS) da Universidade de Santiago de Compostela, rexistrado co número REGA 150780275701. Estas colonias estabuláronse baixo as condicións de aloxamento e manexo establecidos no Real Decreto 53/2013, do 1 de febreiro, sobre a protección dos animais utilizados para a experimentación e outros fins científicos, no marco do proxecto autorizado co número 15010/14/002. As cepas usadas alimentáronse *ad libitum* e mantivéronse en microaisladores en condicións SPF, con ciclos de doce horas de luz/escuridade. A eutanasia realizouse por inhalación de CO_2 ou dislocación cervical.

1.1.1 Ratos *Il6*

Esta cepa foi cedida por Juan Hidalgo (UAB) e Horst Bluethmann (Transgenic Animal Models 93/614, F. Hoffmann-La Roche).

A xeración desta cepa foi levada a cabo polo grupo de Köhler e consistiu na interrupción do xene *Il6* pola inserción do *cassette neo*^{r} no segundo exón (primeiro exón codificante). A F1 resultante do cruce [C57B1/6 x 129 Sv] foron heterocigotos para a mutación (*Il6*$^{+/-}$) e

cruzáronse entre si para conseguir os ratos homocigotos *Il6*$^{-/-}$ (Kopf *et al*., 1994).

1.1.2 Ratos condicionais *Rb1*

Esta cepa de ratos foi cedida polo MMHCC. O seu fondo xenético é FVB;129 e é portadora dunha mutación condicional no xene *Rb1* (Retinoblastoma 1) endóxeno. Esta mutación consiste na inserción de secuencias LoxP nos intróns adxacentes ao exón 19 do locus *Rb1*. A través da expresión da recombinasa *Cre*, que recoñece as secuencias LoxP e xera un corte e empalme do ADN, conséguese a deleción de dito xene e un espectro tumoral igual a un *Rb1-null* convencional (Marino *et al*., 2000).

1.1.3 Ratos *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$

Para levar a cabo este proxecto foi necesario xerar esta cepa de ratos que nos permitía conseguir a combinación da deleción dos xenes *Il6* e *Rb*. Realizamos cruces coas dúas cepas mencionadas anteriormente: ratos *Il6*$^{-/-}$ co fondo xenético C57B1/6 e 129 Sv, e os ratos *cRb1*$^{flox/flox}$ (fondo xenético FVB;129). A F1 obtida foi heterocigota para ambos xenes (*Il6*$^{+/-}$ *cRb*$^{+/loxP}$). Cruzamos estes animais entre si para conseguir xerar o xenotipo *Il6*$^{+/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$, que formarían as nosas unidades de cría para levar a cabo os experimentos. Co cruce destes ratos conseguimos que nunha mesma camada puidese haber individuos *Il6*$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ e *Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$, permitíndonos, deste xeito, realizar os experimentos de comparación pertinentes.

1.1.4 Ratos *Sox2-TK*

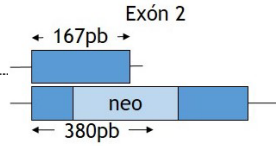
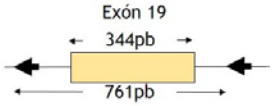
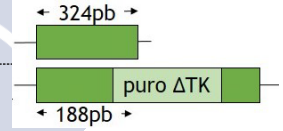
Esta cepa de ratos foinos cedida polo Laboratorio de Células Nai en Cancro e Avellentamento do Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) dirixido por Manuel Collado.

O grupo de Hochedlinger xerou esta cepa knockin para comprobar se *Sox2*$^{+}$ era esencial para o mantemento tisular e, polo tanto, a viabilidade dos ratos. Para conseguilo, incluíron o xene de timidina quinasa truncado (puΔtk) no locus de *Sox2* endóxeno en células nai embrionarias (Arnold *et al*., 2011). A proteína de fusión puΔtk está formada pola puromicina N-acetiltrasferasa (Puro) e unha versión

truncada da timidina quinasa do virus do herpes (Δtk) (Chen & Bradley, 2000).

1.2 XENOTIPADO

O xenotipado de cada rato realizouse mediante a amplificación, por PCR, das secuencias específicas de cada xenotipo, usando para elo xogo de oligonucleótidos cebadores correspondentes (Táboa 1).

Xenes	Cebadores	Secuencias 5`-3`	Diana
Il6	IL6A	GGCGTGTGCCATCAATG	
	IL6B	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	
	IL6 P1	TTCCATCCAGTTGCCTTCTTGG	
	Neo P1	CCGGAGAACCTGCGTGCAATCC	
Rb$^{flox/flox}$	R007	GGCGTGTGCCATCAATG	
	R008	AACTCAAGGGAGACCTG	
Sox2	OIM R 7338	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	
	OIM R 7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	
	OIM R 4054	GTAATGACAAGCGCCCAGA	
	OIM R 4055	ATGCTGCCCATAAGGTATC	

Xenes	Nº ciclos	Temperaturas / Tempo				
		Inicial	Desnat.	Amplif.	Elong.	Elong. final
Il6	35	94˚C 3 min.	94˚C 1 min.	60˚C 1 min.	72˚C 1 min.	72˚C 10 min.
Rb$^{flox/flox}$	30	94˚C 3 min.	94˚C 1 min.	60˚C 1 min.	72˚C 1 min.	72˚C 1 min.
Sox2	35	95˚C 3 min.	95˚C 1 min.	55˚C 1 min.	72˚C 1 min.	72˚C 10 min.

Táboa 1| Cebadores e condicións empregadas nas amplificacións. Especificacións de cada parella de cebadores empregados nos xenotipados: *Il6*, *Rb1*$^{flox/flox}$ e *Sox2* (Desnat., desnaturalización; Amplif., amplificación; Elong., elongación)

Para a extracción de ADN, realizouse unha biopsia de cola de cada rato e o tecido incubouse con 150 µL de tampón de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8, SDS 1%) e 5 µL de Proteinasa K 20 mg/mL (Promega) a 55 ºC durante 2 horas en rotación. Pasado este tempo, as mostras centrifugáronse a 13.000 rpm durante 5 minutos para descartar os restos non dixeridos, e empregar o sobrenadante para precipitar o ADN engadindo un volume de isopropanol. O ADN precipitado recolleuse e depositouse nun volume de auga miliQ.

Para a PCR utilizouse unha mestura de reacción formada por:

Buffer de PCR 10X: 200 mM Tris-HCl pH 8.4 500 mM KCl	Invitrogen
0,2 mM dNTPs	Invitrogen
1,5 mM $MgCl_2$	Invitrogen
0,05 mM *Primers* (de cada un)	Invitrogen
1,25 U Taq polimerasa	Invitrogen
0,5 µL ADN	

2 CULTIVOS CELULARES

Neste traballo utilizáronse astrocitos primarios e liñas tumorais de rato (T653 e T731), e a liña celular humana Phoenix ECO (Swift *et al*., 2001). Todas as células mantivéronse en medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de FBS (Gibco), a 37°C nunha atmosfera húmida con CO_2 ao 5%. A manipulación de células realizouse en condicións de esterilidade nunha cámara de fluxo laminar.

2.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS

Os cultivos primarios de astrocitos realizáronse a partir de cerebros de ratos neonatos de tres días de vida, das cepas *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$ e *Sox2-TK*.

Tras o sacrificio dos ratos, extraéronse os cerebros e disgregáronse mecanicamente en DMEM con 10% FBS. A suspensión celular restante pasouse a través dunha malla de nailon estéril de 40 µm de diámetro de poro (BD, Falcon) e centrifugouse a 1.000 rpm durante 10 minutos. O *pellet* celular foi resuspendido en 9 mL de DMEM-10% FBS e depositouse en placas de 100 mm de diámetro. Despois de 24 e 48 horas de facer o cultivo, laváronse as placas de astrocitos con PBS estéril (Sigma-Aldrich), para eliminar os restos celulares, e engadíuselles medio de cultivo fresco (DMEM-10% FBS). As células mantivéronse en cultivo ata alcanzar unha confluencia apropiada para comezar cos experimentos propostos.

2.1.1 *Il6 Rb$^{loxP/loxP}$*

Cada rato foi xenotipado antes de realizar o cultivo primario para seleccionar só aqueles que fosen *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$. Para facelo, tomouse unha pequena mostra de cada un deles e realizouse o protocolo descrito no apartado 1.2. Pero, a maiores, no momento do cultivo tamén se gardaron mostras de cada animal para repetir a PCR e así confirmar o xenotipo (Figura 1). O estudo realizouse con ratos irmáns de camada e a falta dun dos xenotipos supoñía o descarte do cultivo.

2.1.2 *Sox2-TK*

O procedemento realizado foi o mesmo que no caso anterior. Antes de facer o cultivo tomáronse pequenas mostras de cada rato da camada para facer unha PCR e seleccionar, deste xeito, os xenotipos *Sox2*$^{+/+}$ e *Sox2*$^{+/TK}$ (existe letalidade en homocigose *Sox2*$^{TK/TK}$). Durante o cultivo tamén se gardaban pequenas mostras de cada animal para repetir o xenotipado e confirmar que se estaba a traballar co adecuado (Figura 1). A falta dun dos xenotipos na camada supoñía o descarte do cultivo.

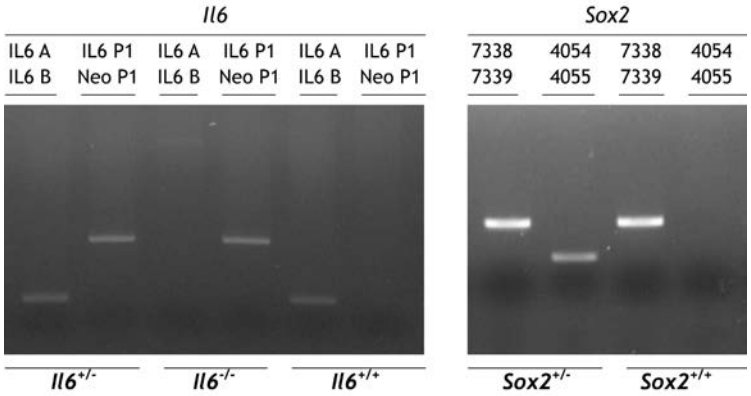


Figura 1| Amplificación por PCR dos xenes *Il6* e *Sox2*. Seguindo o protocolo do apartado 1.2 e cos *primers* especificados na Táboa 1 obtivemos os xenotipos dos ratos. Para realizar os experimentos sempre se seleccionaron as mostras con xenotipos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$, e *Sox2*$^{+/+}$ e *Sox2*$^{+/TK}$.

2.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS (MEFS)

Para os cultivos primarios de fibroblastos empregáronse embrións de E13,5 días. Neste caso só se utilizou a cepa *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$. Ao tratarse en todos os casos de femias preñadas heterocigotas (*Il6*$^{+/-}$), no momento do cultivo descoñecíase o xenotipo dos embrións. Por ese motivo, procesáronse todos os que había en cada xestación e de forma independente para evitar contaminacións.

Unha vez extraído o útero cos embrións, e tras lavalo un par de veces con PBS, procedeuse á individualizar cada embrión na súa cavidade amniótica. Despois, cada embrión foi depositado nun *multiwell* de 6 con PBS para o seu lavado. Separouse a cabeza do resto do corpo, para evitar a contaminación de fibroblastos con astrocitos, e os órganos vermellos que puidesen contribuír coa presenza non desexada de células sanguíneas. Engadíuselles 1 mL do enzima Tryple Express (Gibco) e, coa axuda de bisturís, procedeuse ao disgregado do resto de embrión. Deixouse incubando durante aproximadamente 10 minutos a 37 °C e continuouse coa disgregación mecánica con micropipeta ata conseguir unha mestura homoxénea. Esta disolveuse en 9 mL de DMEM-10% FBS e pasouse a través da malla de nailon estéril, de 40 µm de diámetro de poro, para asegurar unha maior disgregación do tecido. Sometéronse as mostras a unha centrifugación de 1000 rpm

durante 10 minutos, e o *pellet* obtido foi resuspendido en 9 mL de DMEM-10% FBS fresco e depositado en placas de 100 mm de diámetro.

Tras 24 e 48 horas do cultivo, laváronse as placas de fibroblastos con PBS estéril, para eliminar os restos celulares, e engadíuselles medio de cultivo fresco (DMEM-10% FBS). As células mantivéronse en cultivo ata alcanzar unha confluencia adecuada para comezar cos experimentos.

En paralelo, os restos do embrión non utilizados no cultivo, neste caso as cabezas, empregáronse para determinar o xenotipo de cada un deles seguindo o protocolo detallado no apartado 1.2. Deste xeito puidéronse descartar os embrións *Il6*$^{+/-}$ e manter só os homocigotos para este xene (Figura 1).

3 TRANSFECCIÓN E INFECCIÓN RETROVIRAL

A transfección de cultivos primarios e determinadas liñas celulares é pouco eficiente, polo que se optou pola infección retroviral como método para a expresión estable do oncoxene *H-Ras*^{V12} e a recombinasa *Cre* nos astrocitos. Para levar a cabo o método empregáronse as células empaquetadoras Phoenix ECO (Swift *et al*., 2001) que se transfectaron cos plásmidos retrovirais PIG, PIG-CRE, pBABE e pBABE-*H-Ras*^{V12} (Táboa 2; cedidos por P.P. Pandolfi).

As células Phoenix ecotrópicas foron sementadas a unha densidade de 4x10^6 por placa de 100 mm de diámetro. Despois de 24 horas, cada vector retroviral, mencionado anteriormente, foi transfectado por separado nunha placa de Phoenix seguindo o método do PEI25 (Sigma-Aldrich). Para elo, usáronse 15 µg de plásmido acomplexado con PEI25 nunha relación 1:5 (5 µg de PEI25 por 1 µg de DNA) en 500 µl de DMEM-10% FBS. Tras unha axitación e curta centrifugación, deixouse a mestura en repouso durante 10 minutos para facilitar a formación dos complexos. Transcorrido este tempo, engadiuse DMEM-10% FBS á

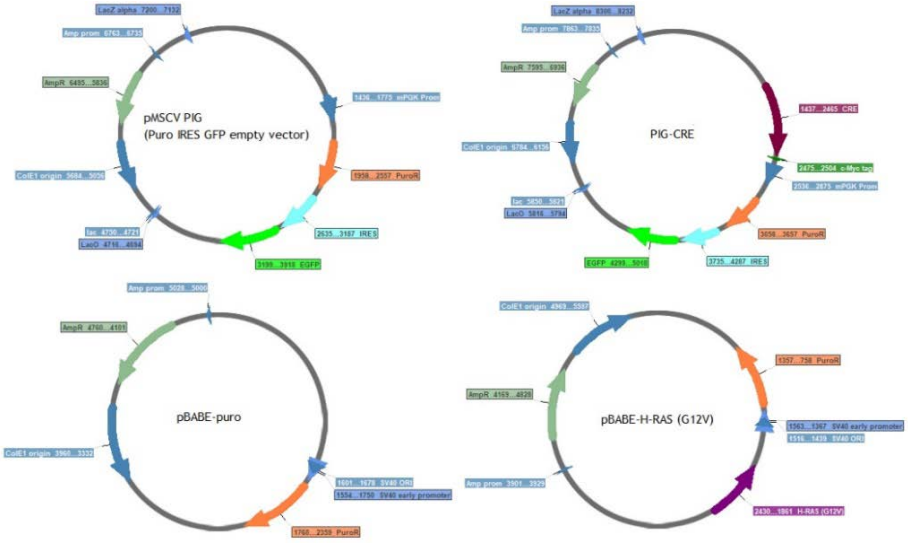
mestura, ata un volume final de 9 mL, que despois se agregou á placa de células empaquetadoras.

Ao día seguinte comprobouse a eficiencia de transfección a través da fluorescencia emitida por GFP, expresada nas células transfectadas con PIG e PIG-CRE, cun microscopio de fluorescencia Olympus IX51 (Figura 2). Retiróuselles o medio ás placas Phoenix para eliminar a presenza do PEI25, tóxico para as células, e substituíuse por DMEM-10% FBS fresco. Este mesmo día tamén se sementaron os astrocitos a infectar a unha densidade de $4x10^5$ por placa de 100 mm de diámetro.

Transcorridas 24 horas realizouse a co-infección retroviral: recolleuse o sobrenadante de cada placa de Phoenix, onde están presentes os retrovirus, pasouse a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro (Sarstedt) para eliminar calquera célula que puidese ser arrastrada, e engadíuselles aos astrocitos xunto con polibreno (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 4 µg/mL. Deste xeito establecéronse os grupos experimentais (Figura 2 e 3).

As células mantivéronse con este medio retroviral durante 48 horas e despois engadíuselles puromicina 2 µg/mL (Sigma-Aldrich) para eliminar as células non infectadas. A selección mantívose durante tres días, tras os cales se lavaron as células con PBS para eliminar todo resto de antibiótico e púxoselles DMEM-10% FBS fresco. Dous días despois subcultiváronse os astrocitos para os distintos experimentos en placas de 100 mm de diámetro ou *multiwell* de 24.

No caso dos astrocitos da cepa *Sox2-TK* a selección non se realizou porque, como se mencionou no apartado 1.1.4, o xene timidina quinasa truncado, incorporado no locus de *Sox2*, confire resistencia á puromicina. Así que, neste caso, despois de 48 horas da infección retroviral, laváronse as células con PBS, engadíuselles DMEM-10% FBS fresco e deixáronse en repouso ata o momento de subcultivalas para os experimentos.



Grupos experimentais obtidos a partir da cepa *Il6 Rb$^{loxP/loxP}$* (dobre infección)		
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$	PIG	pBABE
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}	PIG	pBABE-*H-Ras*^{V12}
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$	PIG-CRE	pBABE
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}	PIG-CRE	pBABE-*H-Ras*^{V12}
Il6$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$	PIG	pBABE
Il6$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}	PIG	pBABE-*H-Ras*^{V12}
Il6$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$	PIG-CRE	pBABE
Il6$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}	PIG-CRE	pBABE-*H-Ras*^{V12}
Grupos experimentais obtidos a partir da cepa *Sox2-TK* (infección simple)		
Sox2$^{+/+}$	-	pBABE
Sox2$^{+/+}$ *H-Ras*^{V12}	-	pBABE-*H-Ras*^{V12}
Sox2$^{+/TK}$	-	pBABE
Sox2$^{+/TK}$ *H-Ras*^{V12}	-	pBABE-*H-Ras*^{V12}

Figura 2| Infección retroviral: plásmidos e grupos experimentais.
Representación dos plásmidos retrovirais empregados na infección para conseguir todos os grupos de astrocitos de estudo.

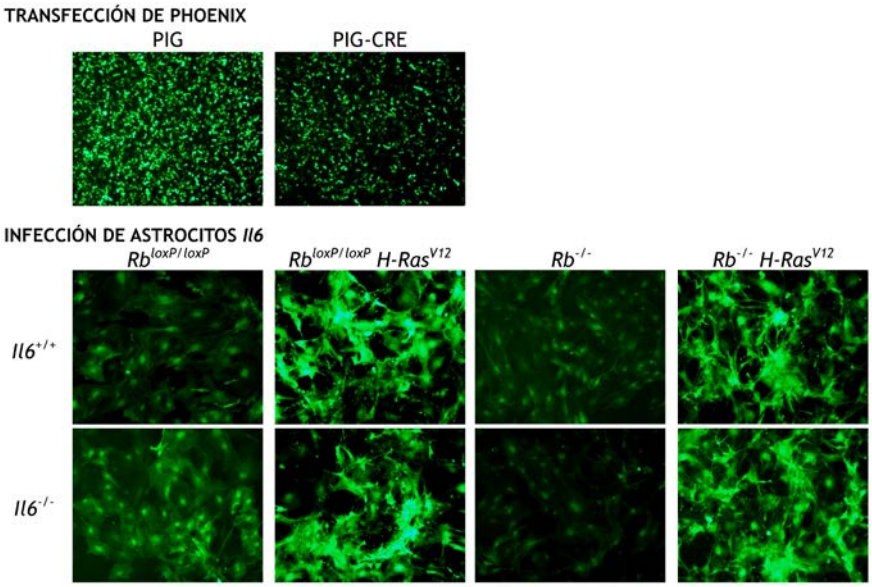


Figura 3| Transfección e infección retroviral. Microfotografías da fluorescencia emitida pola proteína GFP tras a transfección de células *Phoenix* cos plásmidos PIG e PIG-CRE e da infección dos astrocitos da cepa *Il6*, establecéndose os distintos grupos de estudo.

4 PROLIFERACIÓN CELULAR

A proliferación celular foi determinada mediante o método de cristal violeta e a incorporación de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU).

4.1 CURVAS DE PROLIFERACIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Para elaborar as curvas de proliferación determinamos o número de células de forma indirecta coa técnica de cristal violeta.

As células de cada grupo experimental sementáronse, por triplicado, en *multiwell* de 24 a unha densidade de 8.000 células/pocillo os astrocitos e 5.000 os fibroblastos. Os días 1, 3, 5 e 7 despois do cómputo, tras retirarlles o medio e lavalas con PBS, fixáronse as células

con metanol:acético (3:1) durante 15 minutos. Transcorrido este tempo, laváronse de novo con PBS e deixáronse secar.

Para a tinguidura, engadíuselle a cada pocillo cristal violeta (Sigma-Aldrich) ao 0,1% en PBS (p/v) durante 30 minutos e despois retirouse o exceso mediante lavados con PBS. Deixáronse secar.

Para a cuantificación foi necesario extraer o cristal violeta captado polas células cunha solución de ácido acético ao 10% (v/v), durante 5 minutos en axitación. Mediuse, por triplicado, a absorbencia do colorante obtido cun espectrofotómetro a lonxitude de onda de 590 nm.

A tinguidura con cristal violeta serviu tamén para observar e fotografar as diferenzas na morfoloxía celular entre os distintos grupos de estudo.

4.1.1 *Sox2-TK*

Neste experimento o procedemento seguido foi o mesmo que o mencionado anteriormente pero coa diferenza de que, 24 horas despois de sementar 20.000 astrocitos/pocillo en *multiwell* de 24, as células tratáronse con ganciclovir 2 µM (Roche; Arnold *et al*., 2011), ou HBSS os grupos controis, e fixáronse con metanol:acético (3:1) aos días 2, 4 e 6 despois do tratamento.

4.2 INCORPORACIÓN DE EdU

Para detectar a síntese de ADN en células que están a proliferar é necesario incorporar un análogo da timidina, a 5-etinil-2'-deoxiuridina, na que o grupo alcalino terminal substitúe o grupo metilo na posición 5 do anel de pirimidina, que se incorpora facilmente ao ADN durante a replicación. Este grupo alcalino, que queda exposto no suco maior da hélice de ADN, é detectado a través da súa reacción con azidas orgánicas fluorescentes en presencia de Cu(I) (Salic & Mitchison, 2008).

Para determinar a incorporación de EdU en todos os grupos experimentais da cepa *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$, estes astrocitos foron sementados en *multiwell* de 24 a unha densidade de 8.000 células/pocillo. Despois de 24 horas, sincronizáronse as células coa serodeprivación, substituíndo DMEM-10% FBS por DMEM-0,5% FBS durante 44-48 horas e, a continuación, DMEM-15% FBS durante 16 horas.

Transcorrido o tempo, incubáronse as células con EdU (Sigma-Aldrich) a unha concentración final de 10 µM durante 5 horas e, tras un lavado con PBS, fixáronse con paraformaldehído 4% pH 7,4 durante 20 minutos en escuridade. Unha vez retirado este composto químico, realizáronse dous lavados cunha solución de 3% de BSA en PBS e permeabilizáronse os astrocitos con 0,5% de Tritón X-100 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Fixéronse dous lavados máis con 3% BSA en PBS e tratáronse, durante 30 minutos, a temperatura ambiente, coa solución de tinguidura:

100 mM Tris-HCl pH 8,5	Scharlau
1 mM CuSO4	Emsure
10 µM ROX-azida	Lumiprobe
100 mM Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich

Por último, laváronse as mostras para eliminar os restos, e visualizáronse e fotografáronse cun microscopio Olympus IX51.

5 SENESCENCIA E APOPTOSE

Para levar a cabo estes experimentos, sementáronse os astrocitos obtidos da cepa *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$ en *multiwell* de 24 a unha densidade de 8.000 células/pocillo, cada grupo de estudo por triplicado. No caso de fibroblastos, o número foi de 5.000 células/pocillo.

5.1 SENESCENCIA

O ensaio de senescencia está baseado na presenza da actividade β-Galactosidasa a pH ácido nas células.

Para coñecer o número de células senescentes, ao sexto día tras a semente, empregouse un *kit* comercial para a detección da senescencia (Cell Signaling), fixando e tinguindo as células seguindo as indicacións do fabricante. Para coñecer o número total de células, marcáronse os seus núcleos con Hoechst-33258 (2 µM; fluorescencia azul; Sigma-Aldrich) durante 40 minutos en escuridade. Os astrocitos e os

fibroblastos tratados visualizáronse cun microscopio Olympus IX51 e tomáronse microfotografías en campos aleatorios para cuantificar a porcentaxe de senescencia.

5.2 APOPTOSE

As imaxes tomadas dos núcleos tinguidos con Hoechst-33258 no experimento anterior serviron para cuantificar tamén a porcentaxe de apoptose en relación ao número total de células. Este colorante ten unha elevada afinidade polo ADN, sobre todo polas pares de bases adenina-timina, permitindo apreciar a condensación da cromatina tanto na membrana nuclear como nos núcleos fragmentados.

6 WESTERN BLOT

A análise bioquímica realizouse en todos os grupos de estudo de astrocitos da cepa de ratos *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$. As células sementáronse a unha densidade de 400.000 por placa de 100 mm de diámetro.

6.1 EXTRACCIÓN E CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Transcorridos seis días despois da semente realizouse a extracción de proteínas. Para iso, laváronse as placas dúas veces con PBS antes de lisar e recoller as células cun raspador e un tampón de lisis con inhibidores de proteasas:

Tampón de lisis:		**Inhibidores de proteasa:**	
0,14 M NaCl	Scharlau	30 µL/mL Aprotinina	Sigma-Aldrich
0,05 M EDTA	Scharlau	10 µL/mL PMSF	Sigma-Aldrich
1% Glicerol	Sigma-Aldrich	10 µL/mL Ortovanadato	Sigma-Aldrich
0,1% IGEPAL	Sigma-Aldrich	50 mM NaF	Sigma-Aldrich
0,02 M Tris pH 7	Scharlau		

As mostras sometéronse a dous pulsos de sonicación de tres segundos, para axudar a romper as células, e centrifugáronse a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Recolleuse o sobrenadante que era onde

se encontraba o extracto proteico total. Todo o proceso foi realizado en xeo para evitar a degradación das proteínas.

A cuantificación das proteínas realizouse co método de Bradford (Bradford, 1976) e o reactivo Protein Assay (BioRad). Previamente estableceuse unha curva de calibrado con dilucións crecentes de BSA. Mediuse a absorbencia a 595 nm cun espectrofotómetro.

6.2 ELECTROFORESE E TRANSFERENCIA

A electroforese realizouse en xeles de poliacrilamida en condicións desnaturalizantes (SDS-PAGE) do 12%. De cada mostra cargáronse 30 µg de proteína.

Para a transferencia empregouse unha membrana de nitrocelulosa (BioRad), que se bloqueou posteriormente durante 1h cunha solución 5% BSA (p/v) (NZYTech) ou 5% leite (0% graxa) (p/v) en TBS-T, dependendo das especificacións indicadas para cada anticorpo. A incubación cos anticorpos primarios fíxose durante toda a noite a 4 °C, á concentración indicada polo fabricante (Táboa 2).

Para o revelado foi necesario, primeiro lavar a membrana, e despois incubala durante 1h a temperatura ambiente co correspondente anticorpo secundario conxugado con peroxidasa. Empregáronse o anti-IgG de rato a dilución 1:1000, ou o anti- IgG de coello a dilución 1:5000, en 5% leite en TBS-T (p/v). Despois dos lavados, detectouse a actividade peroxidasa co sistema de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific), seguido da exposición e revelado da película fotográfica.

Proteína	Monocl. Policl.	Especie diana	Epitopo	kDa	Dilución	Tampón dilución	Marca
RB	Monocl.	Rato	aa 332-344	110-114	1:1000	TBS-T leite	BD 554136
p-STAT3 (B7)	Monocl.	Rato	Tyr705	~90	1:1000	TBS-T BSA	Santa Cruz sc-8059
p-CHK1 (133D3)	Monocl.	Coello	Ser345	56	1:1000	TBS-T BSA	Cell Signaling 2348
CHK1 (2G1D5)	Monocl.	Rato		56	1:1000	TBS-T leite	Cell Signaling 2360
p-p53	Policl.	Coello	Ser15	53	1:1000	TBS-T leite	Cell Signaling 9284
p53 (1C12)	Monocl.	Rato		53	1:1000	TBS-T leite	Cell Signaling 2524
p-Histona H2A.X	Policl.	Coello	Ser139	15	1:1000	TBS-T BSA	Santa Cruz sc-517348
PAN-RAS V12 OP38	Monocl.	Rato	Val12	21	1:1000	TBS-T leite	Calbiochem
p-NF-KB p65	Policl.	Coello	Ser536	65	1:1000	TBS-T BSA	Cell Signaling 3031
WIP1 (H-300)	Policl.	Coello	aa 306-605	67	1:1000	TBS-T leite	Santa Cruz sc-20712
p-p38	Policl.	Coello	Thr180/Tyr182	38	1:1000	TBS-T BSA	Santa Cruz sc-17852-R
p38α (C-20)	Policl.	Coello	C-terminal	38	1:1000	TBS-T leite	Santa Cruz sc-535
Tubulina	Monocl.	Rato	C-terminal	~50	1:5000	TBS-T leite	Sigma T5168

Táboa 2| Anticorpos de inmunoblot. Características e condicións de uso de todos os anticorpos primarios empregados na análise bioquímica (Monocl., monoclonal; Policl., policlonal).

7 DETERMINACIÓN DA PRODUCIÓN DE ROS

As ROS, xeradas por estrés oxidativo, pódense detectar coa sonda fluorescente dihidroetidio (DHE; Sigma-Aldrich). Este composto é permeable á membrana e, ao entrar na célula, oxídase pola acción dos radicais O_2^- converténdose nun complexo impermeable capaz de intercalarse no ADN e emitir unha fluorescencia vermella.

Para levar a cabo este experimento, os astrocitos da cepa *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$ sementáronse a unha densidade de 8.000 células/pocillo en *multiwell* de 24. Ao sexto día tras a semente, laváronse os astrocitos con PBS e engadíuselles medio fresco con DHE a 5 µM. Mantivéronse en escuridade e a 37 °C durante 30 minutos e despois visualizáronse, e fotografáronse, cun microscopio Olympus IX51. A produción de ROS determinouse por un aumento da fluorescencia baixo as mesmas condicións en todos os grupos experimentais (Seoane *et al*., 2011).

8 CARACTERIZACIÓN MITOCONDRIAL

Para determinar o número de mitocondrias e a súa distribución empregouse a sonda selectiva MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes).

Os astrocitos de todos os grupos de estudo da cepa *Il6 Rb*$^{loxP/loxP}$ sementáronse a unha densidade de 8.000 células/pocillo en *multiwell* de 24. Ao sexto día tras o cómputo das células, laváronse con PBS e engadíuselles DMEM-0% FBS fresco con 0,1 µl/mL de MitoTracker. Mantivéronse en repouso durante 45 minutos a 37 °C e despois, tras retirarlles o medio e lavalas con PBS, engadíuselles DMEM completo (sen MitoTracker; Seoane *et al*., 2011). A observación e a toma das microfotografías realizouse cun microscopio Olympus IX51.

9 TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE CÉLULAS TUMORAIS EN RATOS E IMAXE *in vivo* DA BIOLUMINISCENCIA

Os ensaios *in vivo* foron realizados en ratos $Il6^{+/+}$ $Rb^{loxP/loxP}$ e $Il6^{-/-}$ $Rb^{loxP/loxP}$, machos e femias por separado, de idades comprendidas entre 9 e 13 semanas e peso entre 21 e 25 gramos.

As células inxectadas foron as da liña T653 e T731, ambas as dúas derivadas de tumores formados por astrocitos primarios $Rb^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12} e $Rb^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}, respectivamente, en ratos SCID (Seoane *et al*., 2008).

Para facer o seguimento do crecemento tumoral con bioluminiscencia foi necesario transfectar estas células co plásmido Luciferasa-pBABE (Figura 4) e seleccionalas despois con puromicina, tal e como se especifica no apartado 3. Deste xeito conseguiuse que os astrocitos expresasen o enzima luciferasa, responsable de catalizar a oxidación do substrato luciferina (administrada aos ratos no momento do seguimento) e, como consecuencia, a liberación de fotóns que rexistra o sistema de imaxe IVIS Spectrum.

O procedemento levouse a cabo anestesiando cada rato cunha mestura de 100 mg/mL de ketamina (Merial) con 20 mg/mL de xilacina (Bayer). A dose utilizada foi de 0,1 mL por cada 10 g de peso do animal e por vía intraperitoneal. Como analxésico usouse buprenorfina a unha dose de 0,1 mg/kg e por vía subcutánea.

Empregando a técnica de estereotaxia, realizouse unha inxección ortotópica en cerebro para introducir 100.000 células nun volume de 5 µL de PBS. As coordenadas empregadas foron:

- 1 mm anterior (+)
- 1,8 mm lateral (+)
- 2,5 mm de profundidade (-)

Despois da operación, levouse a cabo un control e coidado diario dos animais e o seu benestar.

Os días 2, 4, 6 e 8 realizouse o seguimento do crecemento tumoral a través do rexistro de unidades de bioluminiscencia co sistema de imaxe IVIS Spectrum® (Caliper Life Sciences, Perkin-Elmer, USA). Para iso foi necesario administrar, previamente, unha dose única de 100 µL de luciferina (Intrace Medical) a unha concentración de 15 mg/mL a cada animal mediante inxección intraperitoneal. Posteriormente, recolléronse as imaxes de bioluminiscencia durante 15 minutos en exposicións de 60 segundos, asegurando así a captura do pico de emisión. O día 8 xa os animais mostraban síntomas de malestar, polo que procedemos o seu sacrificio e necropsia. Os cerebros mantivéronse en formalina tamponada durante 24h e despois transferíronse a etanol de 70°, onde se conservaron ata o momento de realizar a inmunohistoquímica.

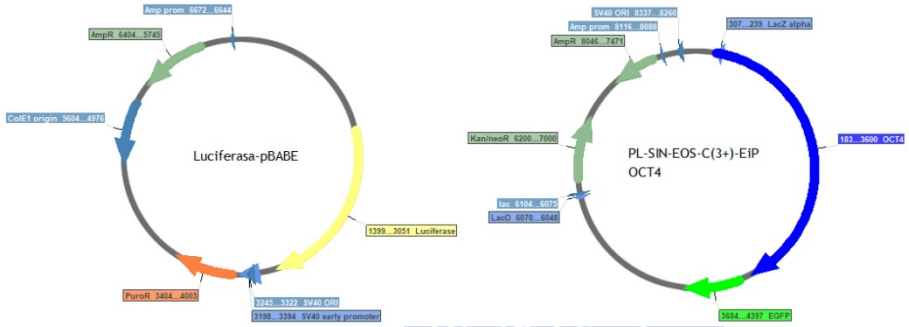


Figura 4| Plásmidos adicionais. Representación dos plásmidos Luciferasa-pBABE e PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP OCT4, empregados nos experimentos *in vivo* e desdiferenciación respectivamente.

10 FORMACIÓN DE ORGANOIDES CEREBRAIS

Para a formación dos organoides cerebrais empregáronse as dúas liñas celulares, T653 e T731, derivadas de tumores formados por astrocitos primarios *Rb*$^{loxP/lox}$ *H-Ras*^{V12} e *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}, respectivamente, en ratos SCID (Seoane *et al*., 2008).

O primeiro paso foi a formación de neuroesferas. Para iso foi necesario romper a adherencia das células á placa á que estaban adheridas coa enzima Tryple Express (Gibco) e recollelas para centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos. Retirouse o medio de cultivo e fíxose un lavado con PBS para asegurar que non quedaban restos de DMEM-10% FBS. Repetiuse a centrifugación. O *pellet* resultante mesturouse co medio de cultivo para a formación de neuroesferas (composición especificada na Táboa 3) e depositado en placas de 60 mm de diámetro.

Despois de 24 horas formáronse as neuroesferas pero para continuar co experimento esperáronse ata 48 horas. Transcorrido este tempo, recolléronse as neuroesferas e centrifugáronse a 1.000 rpm durante 5 minutos para eliminar o medio de cultivo no que estaban e engadir un diferente, o de indución neural (composición especificada na Táboa 3), onde se mantiveron as células, en placas de 60 mm de diámetro, durante 48 horas (Figura 5).

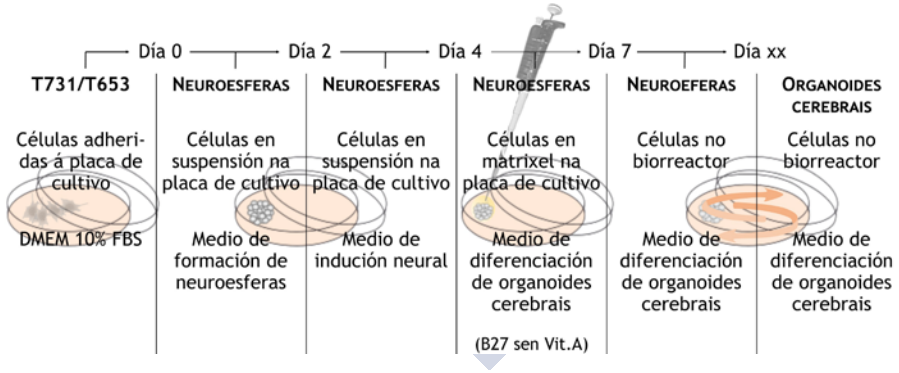


Figura 5| Esquema do protocolo de formación de organoides cerebrais. Representación das distintas fases para a formación dos organoides, dende o cultivo dos astrocitos en 2D ata o traspaso das neuroesferas ao biorreactor. Para os tempos de cada unha das fases tomamos como referencia o artigo de Lancaster (Lancaster *et al*., 2013). A composición de cada un dos medios empregados refléxase na Táboa 3.

O seguinte paso foi a inclusión das neuroesferas en matrixel (Corning). Para iso foi necesario preparar previamente unha cuadrícula de parafilm, de tamaño adecuado para unha placa de 60 mm de

diámetro, de 4x4 cavidades. Nestas cavidades depositáronse unhas poucas neuroesferas e, sobre elas, 30 µL de matrixel. Deixouse a placa coas gotas de matrixel a 37°C durante 30 minutos para que polimerizase. Posteriormente engadíuselle 5 mL de medio de diferenciación de organoides cerebrais (composición especificada na Táboa 3), desprendéronse as gotas de matrixel coas neuroesferas do parafilm e mantivéronse a 37°C durante 72 horas.

Por último, transferíronse as células da placa ao biorreactor, onde se mantiveron co medio de diferenciación ata alcanzar un tamaño adecuado para o seu estudo (Figura 5). O medio substituíuse por un fresco cada tres días e o seguimento realizouse cunha lupa Leica MZ75.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Medios de cultivo	Composición	Concentr.	Marca	Referencia
Formación de neuroesferas	DMEM/F12 + GlutaMAX	100%	Gibco	Yoon *et al*., 2011
	B-27	1X	Gibco	
	EGF	0,02 µg/mL	Sigma-Aldrich	
	FGF	0,02 µg/mL	Invitrogen	
Indución neural	DMEM/F12 + GlutaMAX	98%	Gibco	Lancaster & Knoblich, 2014
	N-2	1%	Gibco	
	MEM-NEAA	1%	Sigma-Aldrich	
	Heparina	1 µg/mL	Sigma-Aldrich	
Diferenciación de organoides cerebrais	DMEM/F12 + GlutaMAX	48,5%	Gibco	Lancaster & Knoblich, 2014
	Medio Neurobasal	48,5%	Gibco	
	N-2	0,5%	Gibco	
	Insulina	0,025%	Sigma-Aldrich	
	MEM-NEAA	0,5%	Sigma-Aldrich	
	Penicilina/ Estreptomicina	1%	Gibco	
	Dilución 1:1000 2-mercaptoetanol en DMEM/F12 + GlutaMAX	0,035%	Sigma-Aldrich	
	* B-27	1%	Gibco	
* Durante a fase de crecemento das neuroesferas en matrixel, o suplemento B-27 non debe conter vitamina A				

Táboa 3| Medios de cultivo de organoides cerebrais. Información e composición dos medios de cultivo empregados en cada paso da formación dos organoides cerebrais (Concentr., concentración)

11 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

A técnica da inmunohistoquímica realizouse nos cerebros dos ratos, obtidos a partir do estudo *in vivo,* e nos organoides cerebrais; e a inmunofluorescencia fíxose en neuroesferas, para a súa visualización ao microscopio confocal, e en astrocitos en cultivo 2D.

11.1 INMUNOHISTOQUÍMICA

Como xa se indicou no apartado 9, os cerebros foron conservados en formalina tamponada durante 24h e despois transferidos a etanol de 70° ata o momento da súa deshidratación e inclusión en parafina. Realizáronse cortes de 4 µm que posteriormente se desparafinaron e hidrataron. A recuperación antixénica para Caspasa-3 activa, p-Histona H3 e Arginasa-1 foi tampón citrato a pH 6, e para iNOS, Neurofilamento, GFAP e Nestina, o tampón Tris-EDTA a pH 9. Despois dun lavado con PBS, fíxose un bloqueo con peroxidasa ao 3% durante 10 minutos. De novo, laváronse as mostras con PBS (3 lavados de 5 minutos cada un) e procedeuse á incubación co anticorpo primario durante toda a noite a 4 °C (Táboa 4).

Ao día seguinte, tras un lavado con PBS, incubáronse as seccións co anticorpo secundario (Dako Envision) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Despois dun lavado con PBS, realizouse o revelado con DAB (Dako) 10 minutos e tinguíronse con hematoxilina de Mayer 10 minutos máis. Finalmente, levouse a cabo a deshidratación e montaxe. As mostras visualizáronse cun microscopio Olympus BX43 para identificar as células positivas para os anticorpos usados. Tamén se tomaron as correspondentes microfotografías co *software* cellSens de Olympus.

11.1.1 Hematoxilina-Eosina

Para a tinguidura con Hematoxilina-Eosina, primeiro levouse a cabo o desparafinado das mostras, para o cal foi necesario mantelas na estufa a 60 °C durante 1 hora e logo somerxidas en xilol durante 10-15 minutos. O seguinte paso foi a hidratación, no que se empregou alcohol a gradación decrecente:

- 5 minutos en alcohol absoluto
- 5 minutos en alcohol 96°
- 5 minutos en alcohol 70°
- 5 minutos en alcohol 50°

Tras facer un lavado con auga destilada, tinguíronse os cortes con hematoxilina durante 5 minutos e, despois doutro lavado de 2 minutos, con eosina alcohólica tamén durante 5 minutos. O último paso, antes da montaxe, foi a deshidratación con alcohol de 70°, de 96°, alcohol absoluto e, finalmente, xilol. Estas mostras tamén se visualizaron e fotografaron co microscopio Olympus BX43

11.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica empregouse en cultivos 2D e neuroesferas (formadas co protocolo indicado no apartado 10) das seguintes células:

Astrocitos en cultivo 2D		Neuroesferas
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$	*Il6*$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}	*Il6*$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}

Os astrocitos en 2D infectados xa foron sementados sobre cubre-obxectos, tratados previamente con polilisina. As neuroesferas, unha vez formadas, foron sometidas a un *citospin* para pegalas aos portaobxectos. Posteriormente, os dous tipos de mostras, fixáronse con formalina tamponada durante 24 horas e permeabilizáronse con Tritón ao 0,1% durante 1 hora. Despois dun lavado con PBS, incubáronse co anticorpo primario durante toda a noite a 4 °C (Táboa 4).

Ao día seguinte laváronse as mostras con PBS antes de incubalas co anticorpo secundario correspondente, marcados con Cy3 α Ms vermello ou Alexa Fluor 488 α Rb verde, a concentración 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras o lavado con auga destilada, procedeuse á súa montaxe co medio de montaxe acuoso con DAPI 1:1.000 (Electron Microscopy Science).

Os astrocitos en 2D visualizáronse e fotografáronse co microscopio Olympus IX51; as neuroesferas, cun microscopio confocal Leica TCS-SP2.

11.2.1 Microscopía confocal

Ademais das neuroesferas marcadas co anticorpo anti-SOX2, tamén se visualizaron co microscopio confocal neuroesferas formadas a partir das células mencionadas no apartado anterior pero que, previamente, foron transfectadas co plásmido PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP OCT4 (Figura 4) seguindo o protocolo da sección 3. Unha vez formadas, tamén se someteron a un citospin e á fixación posterior con formalina tamponada durante 24 horas.

Neste caso só se empregou a solución de montaxe con DAPI, xa que a expresión de *Oct3/4*, un dos principais marcadores de pluripotencialidade, correlaciónase co nivel de expresión da proteína fluorescente mCherry.

As mostras visualizáronse e fotografáronse empregando co microscopio confocal Leica TCS-SP2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INMUNOHISTOQUÍMICA						
	Proteína	**Monocl. Policl.**	**Especie diana**	**Epitopo**	**Dilución**	**Marca**
Cerebros	Arginasa-1 (D4E3M)	Monocl.	Coello	Val47	1:200	Cell Signaling 93668
	iNOS	Policl.	Coello	aa 1125-1144 C-terminal	1:1000	Abcam Ab15323
	p-Histona H3	Policl.	Coello	Ser10	1:100	Cell Signaling 9701
	Caspasa-3 activa	Policl.	Coello	Asp175	1:1000	Cell Signaling 9661
Organoides Neuroesferas	Neuro-filamento	Monocl.	Rato	-	*ready to use*	Dako IR607
	GFAP	Policl.	Coello	-	*ready to use*	Dako IR524
	Nestina (D9)	Monocl.	Rato	aa 235-320	1:500	Santa Cruz sc-377380
INMUNOFLUORESCENCIA						
	Proteína	**Monocl. Policl.**	**Especie diana**	**Epitopo**	**Dilución**	**Marca**
Neuro-esfera	SOX2	Policl.	Coello	-	1:1000	Seven Hills Bio-reagents WRAB 1236
Cultivo 2D	SOX2	Policl.	Coello	-	1:1000	Seven Hills Bio-reagents WRAB 1236
	Nestina (10c2)	Monocl.	Rato	epitopo de 150 aa C-terminal	1:500	Santa Cruz sc-23927

Táboa 4| Anticorpos empregados en inmuno-histoquímica e -fluorescencia. Características e condicións de uso de cada un dos anticorpos primarios empregados nos experimentos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (Monocl., monoclonal; Policl., policlonal).

12 CITOMETRÍA DE FLUXO

A citometría de fluxo empregouse para medir a intensidade de fluorescencia de astrocitos tinguidos con EdU, para a proliferación celular; con DHE, para a medición de ROS; e MitoTracker, para coñecer a masa de mitocondrias. Tamén se usou con astrocitos transfectados co plásmido PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP OCT4 para determinar a desdiferenciación celular. En todos os casos, recolléronse as células tratadas previamente coas sondas ou plásmido, laváronse con PBS para eliminar calquera resto de DMEM presente e, mantidas no tampón de fosfato salino, analizáronse co citómetro Guava Easy Cyte™5 empregando o láser adecuado á lonxitude de onda de excitación correspondente a cada sonda ou plásmido.

Os datos foron adquiridos e analizados co *software* propio do citómetro, o guavaSoft™.

13 ANÁLISE ESTADÍSTICO DOS RESULTADOS

Todos os experimentos repetíronse un mínimo de tres veces de forma independente. Para cada grupo de datos calculáronse e representáronse a media ± SD. No experimento *in vivo*, a elección do tamaño de mostra realizouse baixo a premisa de que o número de animais empregados fose o mínimo necesario para detectar un efecto en caso de existir, cunha significancia estatística pero respetando o principio de redución das tres R. Neste caso, calculáronse e representáronse a media ± SEM coa dispersión dos datos.

O análise estatístico realizouse co *software* GraphPad aplicando o test de Mann-Whitney para as comparacións de dous grupos. As diferenzas obtidas considerábanse estatisticamente significativas cando o p-valor era inferior a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

1 DESDIFERENCIACIÓN

1.1 EFECTO DO ONCOXENE *H-Ras^{V12}* SOBRE A EXPRESIÓN DE *Sox2*: H-RAS^{V12} INDUCE A EXPRESIÓN DESTE FACTOR *STEMNESS*

O GB é o tumor primario de cerebro máis frecuente e agresivo en humanos. Un dos maiores problemas que xurde ao enfrontarse a el é a elevada taxa de recorrencia que mostra tras o tratamento. A causa da reaparición é a enorme capacidade que teñen as células tumorais, non erradicadas, de continuar proliferando e inducir a formación dun novo tumor. A maioría das células diferenciadas do SNC teñen a capacidade para formar gliomas. Calquera delas, tras sufrir determinadas alteracións xenéticas que favorecen a súa transformación, adquiren a capacidade de desdiferenciarse para iniciar e manter a progresión tumoral. Existen estudos que demostran que astrocitos, neuronas e oligodendrocitos son dianas de alteracións xénicas que favorecen a formación de gliomas malignos. Un traballo de Friedmann e colaboradores evidencia que a cooperación entre dous eventos oncoxénicos, neste caso inhibición de p53 e expresión de *H-Ras^{V12}*, é necesaria para a desdiferenciación de astrocitos e a posterior formación de gliomas, nos cales a presenza de neuronas diferenciadas manifesta a submisión dos astrocitos a este proceso. Todos os tumores mostran un aumento da expresión de marcadores de células nai/proxenitora, como son SOX2 e Nestina, a medida que evolucionan e en detrimento dos marcadores específicos de diferenciación (Friedmann-Morvinski *et al*., 2012). O estudo de fibroblastos tamén revelou a existencia dunha

poboación capaz de evadir a senescencia inducida por oncoxenes a pesar de ter activada a expresión de *RAS*. Se nestas células se eliminan os supresores de tumores *p53* ou *RB,* adquiren un fenotipo aneuploide, o potencial para formar colonias *in vitro* e tumores *in vivo*, e a expresión de factores de transcrición do tipo OCT3/4, SOX2 e Nanog (Kohsaka *et al*., 2011). Polo tanto, a formación de tumores require de alteracións xenéticas que favorezan unha desdiferenciación celular previa e, tamén, dun microambiente permisivo formado por células e sinais moleculares capaces de soster, por unha parte, a diferenciación de células tumorais e, por outra, o mantemento daquelas con características de células nai (Friedmann-Morvinski *et al*., 2012). Como compoñente deste microambiente permisivo está IL6 e a sinalización que desencadea. Esta interleuquina xorde como mediadora principal da desdiferenciación a partir das investigacións realizadas polo equipo de Serrano, que nos últimos anos están centradas na reprogramación *in vivo*. A partir dos seus traballos conclúen que a senescencia, inducida por dano ou avellentamento, xera un contexto favorecedor para a reprogramación das células do entorno a través de IL6 como compoñente principal do SASP (Mosteiro *et al*., 2016; Mosteiro *et al*., 2018).

É habitual mencionar a proteína SOX2 cando se trata o tema de desdiferenciación. Este factor de transcrición é un dos responsables do control da expresión de xenes durante o desenvolvemento e ten un papel fundamental en neuroxénese e glioxénese. A pesar deste papel beneficioso, en GB está identificado como oncoxene, cuxa reactivación contribúe ao fenotipo maligno do tumor. É máis, existe unha correlación positiva entre a expresión de *SOX2* e o grao de malignidade do glioma. Identificaron un incremento da súa expresión naquelas áreas do tumor caracterizadas por unha porcentaxe elevada de células e hiper-proliferación. O estudo de mutacións no xene de *SOX2* en GB revela que no 100% dos casos (N=258) o seu promotor está hipo-metilado (modificación epixenética que favorece a súa expresión), no 86% de casos (N=414) existe unha sobre-expresión e, no 8,5% (N=492), a reactivación do xene prodúcese por amplificación (Alonso *et al*., 2011; Annovazzi *et al*., 2011). Estes datos indícanos o gran peso que exerce no desenvolvemento do GB en particular, e no resto de cancros en xeral.

Dado que a cascada de RTK/RAS/PI3K é unha das principais vías de sinalización afectadas en GB (McLendon *et al*., 2008), establecemos un modelo de glioma *in vitro* con astrocitos de ratos neonatais que, a través da expresión do oncoxene retroviral *H-Ras*^{V12}, recapitulan a hiperactivación das vías de sinalización dependentes de factores de crecemento (Seoane *et al*., 2008). Tendo presente o papel de IL6 na reprogramación, cabe mencionar que estes astrocitos teñen intacto o xene que codifica dita interleuquina.

Baixo o noso modelo experimental, quixemos determinar se a expresión do oncoxene *H-Ras*^{V12} era suficiente para inducir a desdiferenciación a través da expresión de xenes *stemness* como *Sox2*. Para lavar a cabo o experimento empregamos cultivos primarios de astrocitos *Sox2*-TK, caracterizados por incluír no locus de *Sox2* o xene truncado de timidina quinasa, os dous regulados polo mesmo promotor. Baixo o efecto de ganciclovir, os astrocitos que proliferan e expresan *Sox2* converten este antiviral nunha sustancia bioactiva que inhibe a incorporación de dGTP pola ADN polimerasa, activando a apoptose (Arnold *et al*., 2011; Chen & Bradley, 2000). Esta células foron sementadas, tratadas con ganciclovir (HBSS as células control) e fixadas ao sexto día despois do tratamento para realizar o análise de incorporación de cristal violeta.

A expresión do oncoxene *H-Ras*^{V12} ten efecto sobre a proliferación celular: aumenta o número de células con respecto ao grupo que non o expresa (Figura 1a). Analizando *Sox2* en presenza de ganciclovir, podemos observar unha redución do número de células en xeral, pero só é significativo nos astrocitos que expresan o oncoxene *H-Ras*^{V12} (Figura 1b). Como era de esperar, os grupos controis tratado con HBSS e en ausencia de ganciclovir non manifestaron morte celular (Figura 1).

A partir deste dato podemos concluír que nos astrocitos neonatais existe unha expresión basal de *Sox2* que se ve incrementada baixo os efectos de *H-Ras*^{V12}. Este oncoxene parece inducir a expresión do xene *stemness*.

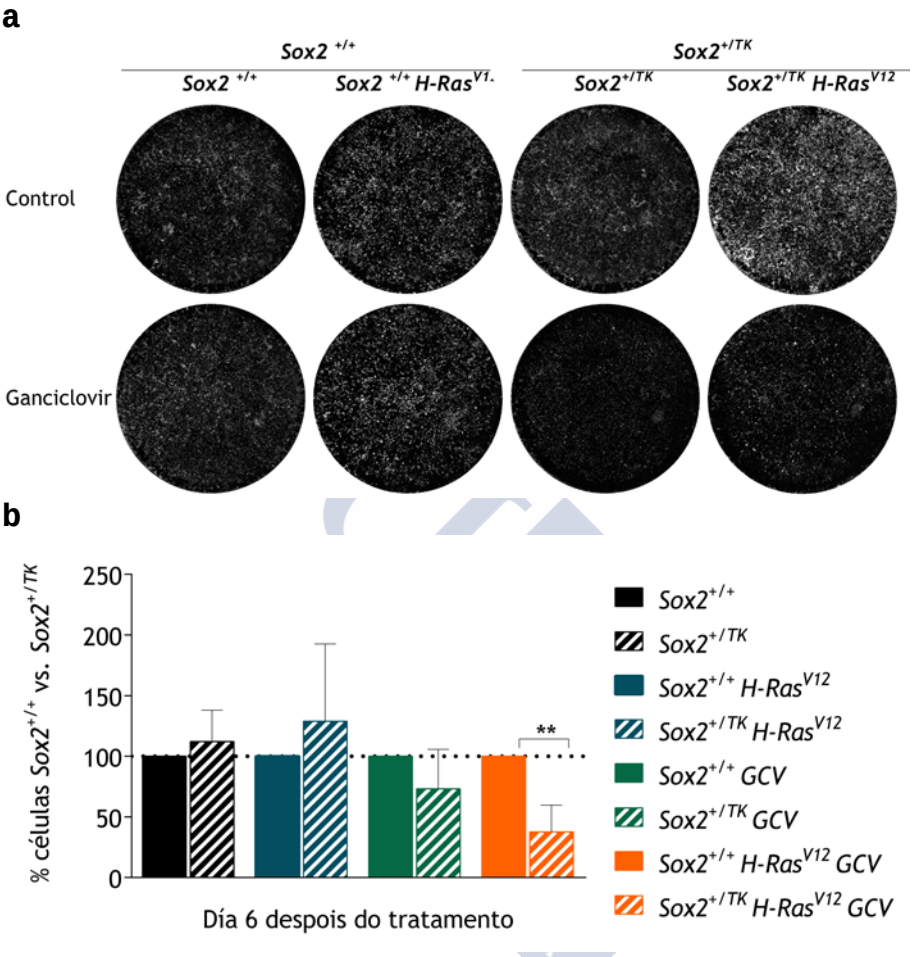


Figura 1| O papel do oncoxene *H-Ras^{V12}* na expresión de *Sox2*. a| Confluencia de astrocitos en placa ao sexto día despois do tratamento con GCV e tinxidas con cristal violeta. Para apreciar mellor as diferenzas realizouse o contraste co programa de procesamento de imaxe dixital *ImageJ*. **b|** Representación da porcentaxe normalizada de células *Sox2$^{+/TK}$* fronte a *Sox2$^{+/+}$* ao sexto días tras o tratamento con GCV (media ± SD). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, n=5, * p < 0,05 respecto á condición control.

1.2 ALTERACIÓNS XENÉTICAS INDUCEN DESDIFERENCIACIÓN CELULAR E A CAPACIDADE DE FORMAR ORGANOIDES CEREBRAIS

O grupo de Lancaster foi o primeiro en establecer un protocolo de formación de organoides a partir de células iPS (Lancaster *et al*., 2013; Lancaster & Knoblich, 2014) pero, máis recentemente, Roerink e colaboradores conseguiron formalos a partir de células illadas directamente de tumores colorrectais, o que xa nos proporciona unha idea sobre o estado diferenciado das células tumorais (Kuo & Curtis, 2018).

Tras observar a capacidade de *H-Ras*^{V12} de inducir a desdiferenciación de astrocitos e a posibilidade de xerar organoides sen requirir dunha etapa de formación de células iPS, quixemos ir un paso máis alá e comprobar se a partir do noso modelo de glioma *in vivo* podiamos formar os devanditos organoides cerebrais. Para comprobar esta posibilidade, empregamos dúas liñas celulares derivadas de tumores formados por astrocitos primarios *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12} e *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12} en ratos SCID (T653 e T731, respectivamente). Coas T653 podemos observar o efecto só do oncoxene na formación dos organoides, e coas T731 podemos observar o efecto combinado desta sobre-estimulación das vías de sinalización de factores de crecemento coa perda dun dos reguladores do ciclo celular, RB.

Adaptamos o protocolo de Lancaster á nosa estratexia experimental. A partir do cultivo 2D de astrocitos formamos as neuroesferas, produto base dos nosos organoides. Mantivémolas en crecemento en placa en medios específicos ata transferilas, na última fase do protocolo, á axitación do biorreactor. Con esta técnica, empregada en enxeñería tisular, favorécese a absorción de nutrientes e O_2 e evítase a necrose do tecido central do organoide unha vez que este supera un tamaño máis alá dos límites de difusión estacionario de O_2 e nutrientes (Figura 2; Lancaster & Knoblich 2014).

O resultado final foi a obtención de masas con células ben organizadas e diferente á organización celular en neuroesferas (Figura 3a). Por inmunohistoquímica detectamos a presenza dos dous liñaxes do SNC: neuronal e glial, a través dos marcadores Neurofilamento e GFAP respectivamente; e de células desdiferenciadas, por medio da

marcaxe con Nestina (Figura 3b). Isto significa que unha proporción dos astrocitos de partida sufriron un proceso de desdiferenciación e unha posterior nova diferenciación a un tipo celular diferente, a neuronas.

Con este dato concluímos que, xa só a expresión do oncoxene *H-Ras*^{V12} é suficiente para inducir a reprogramación de astrocitos e a súa diferenciación a outros tipos celulares. Tamén comprobamos que, como xa expuxera Friedmann-Morvinski no 2012, os eventos combinados de expresión de *H-Ras*^{V12} e perda dun supresor tumoral, no noso caso *Rb*, favorecen a desdiferenciación e formación de organoides cerebrais (Friedmann-Morvinski *et al*., 2012).

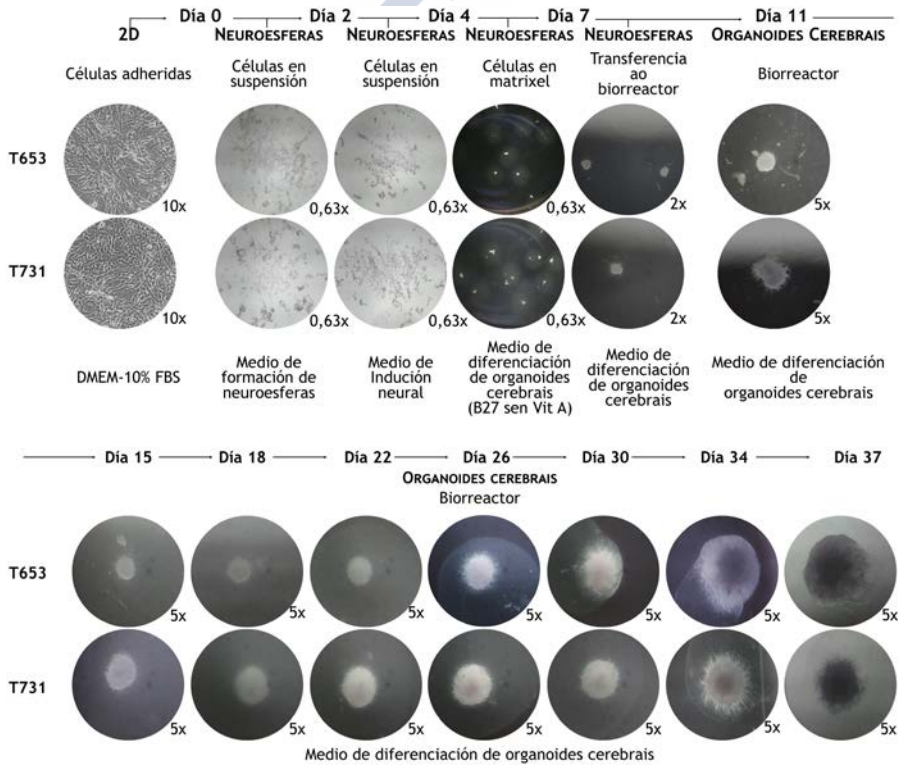


Figura 2| Formación de organoides cerebrais. Evolución das células T653 e T731 dende astrocitos diferenciados ata a formación do organoide cerebral, pasando polo estadio de neuroesfera.

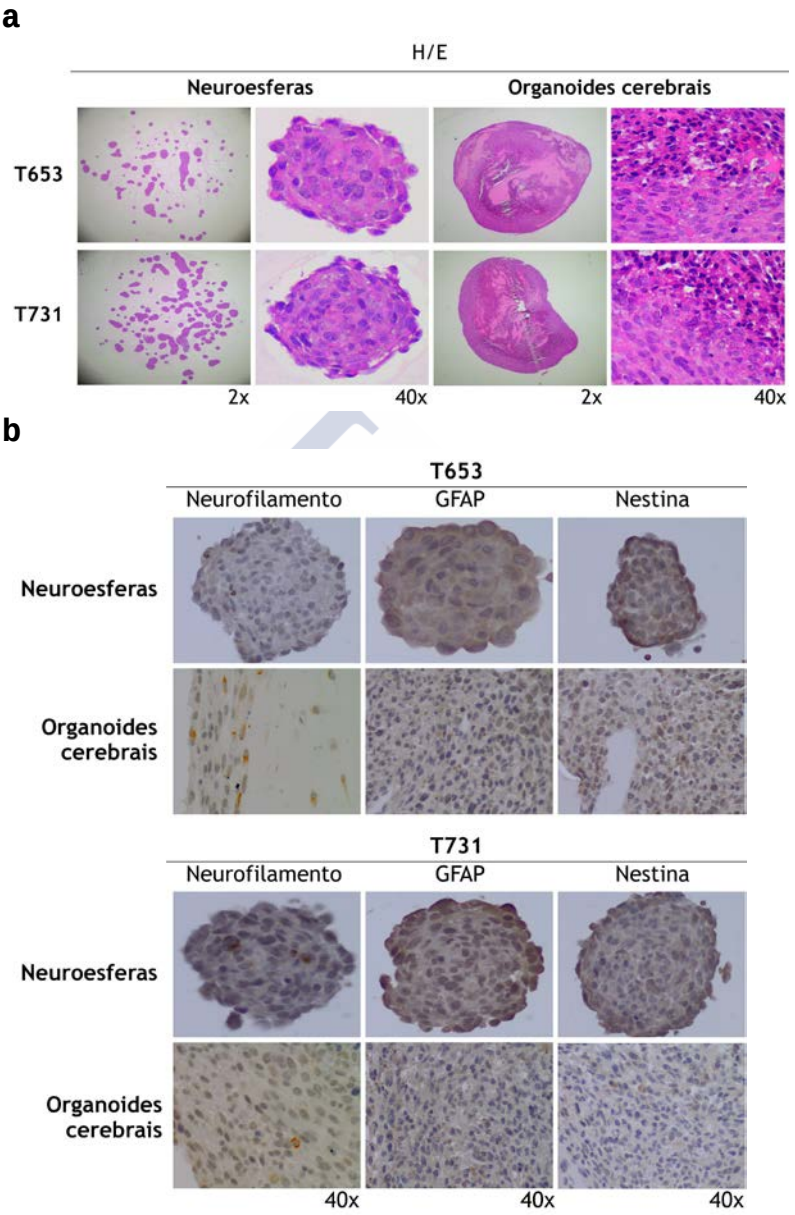


Figura 3| Inmunohistoquímica de neuroesferas e organoides cerebrais. a| A tinguidura de H/E mostra a diferenza na organización celular que hai entre as dúas estruturas. **b|** Detectamos a liñaxe neural e glial das células cos marcadores de neurofilamento e GFAP, respectivamente, e as células desdiferenciadas coa nestina.

2 IL6 E MICROAMBIENTE

2.1 A PRESENZA DE IL6 FAVORECE O CRECEMENTO TUMORAL *in vivo*

Como xa mencionamos previamente, IL6 identificouse como principal factor do SASP responsable da reprogramación celular (Mosteiro *et al*. 2018; Mosteiro *et al*. 2016) e por outra parte, Weissenberger e colaboradores observaron que a presenza de IL6 era necesaria para o desenvolvemento e progresión de gliomas nun modelo murino (Weissenberger *et al*., 2004). É máis, o traballo realizado por Ancrile e o resto do equipo mostra que RAS oncoxénico induce a segregación desta interleuquina, responsable da anxioxénese e crecemento tumoral (Ancrile *et al*., 2007).

Nos dous últimos traballos comentados utilizan ratos *Il6*$^{-/-}$. Weissenberger empregou un modelo de astrocitoma espontáneo con ratos transxénicos que expresaban o oncoxene viral src, e advertiron que en ausencia de IL6 se previña a formación do tumor (Weissenberger *et al*., 2004). Ancrile induciu papilomas premalignos con altas mutacións en *RAS* coa aplicación tópica do carcinóxeno 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), e detectou que o número de ratos *Il6*$^{-/-}$ con tumores era menor con respecto a *Il6*$^{+/+}$, e que en caso de desenvolverse tumores, estes presentábanse en menor número e tamaño (Ancrile *et al*., 2007).

Tras comprobar a capacidade do oncoxene *H-Ras*^{V12} de inducir a desdiferenciación de astrocitos T653 e T731 baixo condicións de cultivo específicas, quixemos comprobar o comportamento destas células *in vivo*, baixo os efectos dun sistema inmune competente, e observar o papel que interpreta IL6 neste contexto. Para abordar esta cuestión, empregamos ratos *Il6*$^{-/-}$ e *Il6*$^{+/+}$ (estes últimos como control) aos que sometemos a un transplante ortotópico destas células mediante cirurxía estereotáxica. Ambas as dúas liñas expresaban luciferasa para permitirnos monitorizar o seu crecemento e a progresión tumoral a través do sistema de imaxe *in vivo*, IVIS Spectrum®. O experimento foi feito en machos (Figura 4) e femias (Figura 5 e 6) por separado para comprobar se existe un efecto sexo dependente. No caso de femias,

realizáronse dous experimentos independentes para corroborar o resultado.

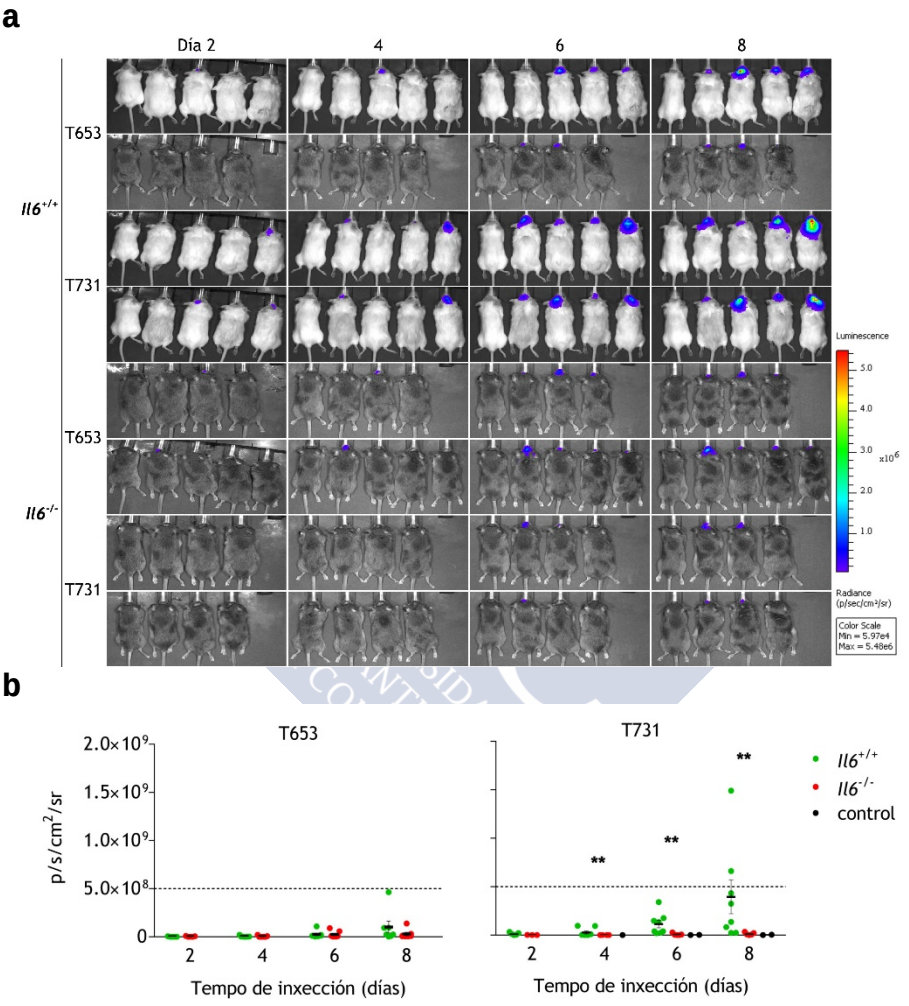


Figura 4| Crecemento tumoral *in vivo* a partir das liñas celulares T653 e T731 en ratos machos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$. a| Imaxes do seguimento *in vivo* da progresión tumoral a través da detección de bioluminiscencia (IVIS Spectrum®). En todas as imaxes, o primeiro rato é o control de cada xenotipo sen células tumorais inxectadas. **b|** Curvas de crecemento tumoral (media ± SEM). Para T653, control (n=7), *Il6*$^{-/-}$ (n=7); para T731, control (n=8), *Il6*$^{-/-}$ (n=6). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ respecto á condición control.

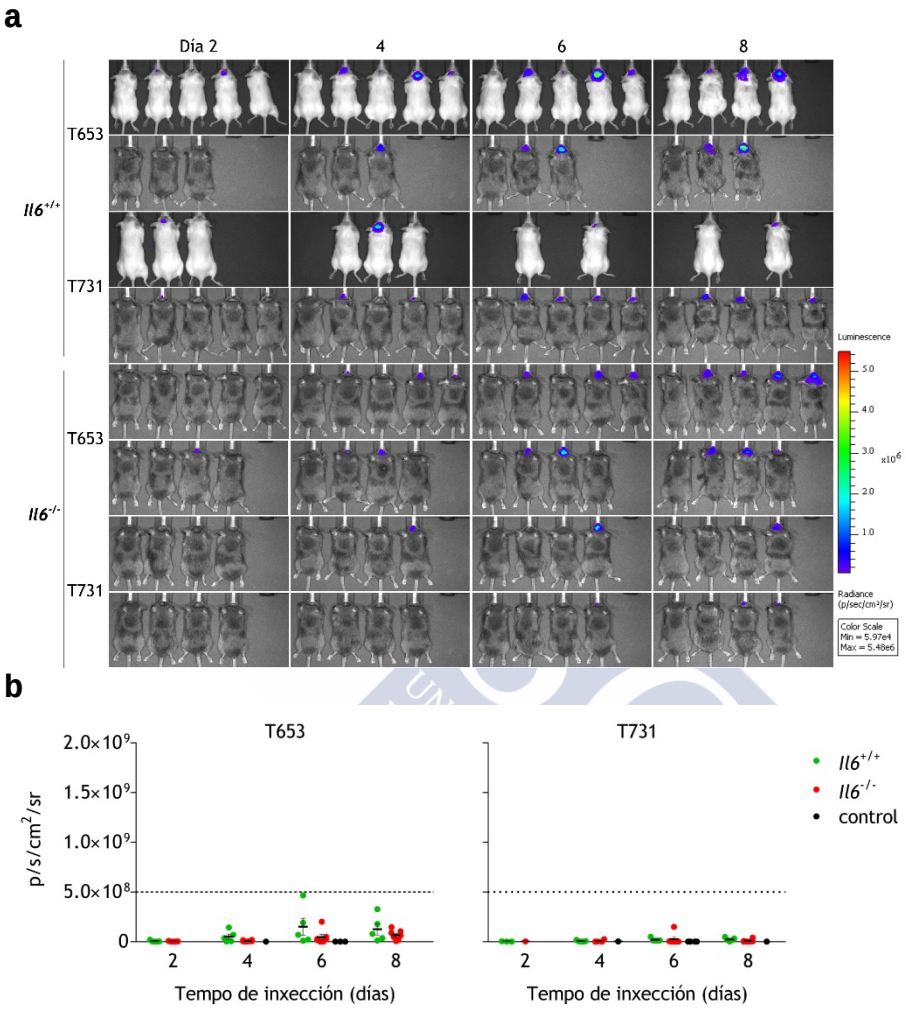


Figura 5|Crecemento tumoral *in vivo* a partir das liñas celulares T653 e T731 en ratos femia *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$. a| Imaxes do seguimento *in vivo* da progresión tumoral a través da detección de bioluminiscencia (IVIS Spectrum®). En todas as imaxes, o primeiro rato é o control de cada xenotipo sen células tumorais inxectadas. **b|** Curvas de crecemento tumoral (media ± SEM). Para T653, control (n=5), *Il6*$^{-/-}$ (n=7); para T731, control (n=5), *Il6*$^{-/-}$ (n=6). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ respecto á condición control. Baixa dun rato control inxectado con células T731 e outro con T653.

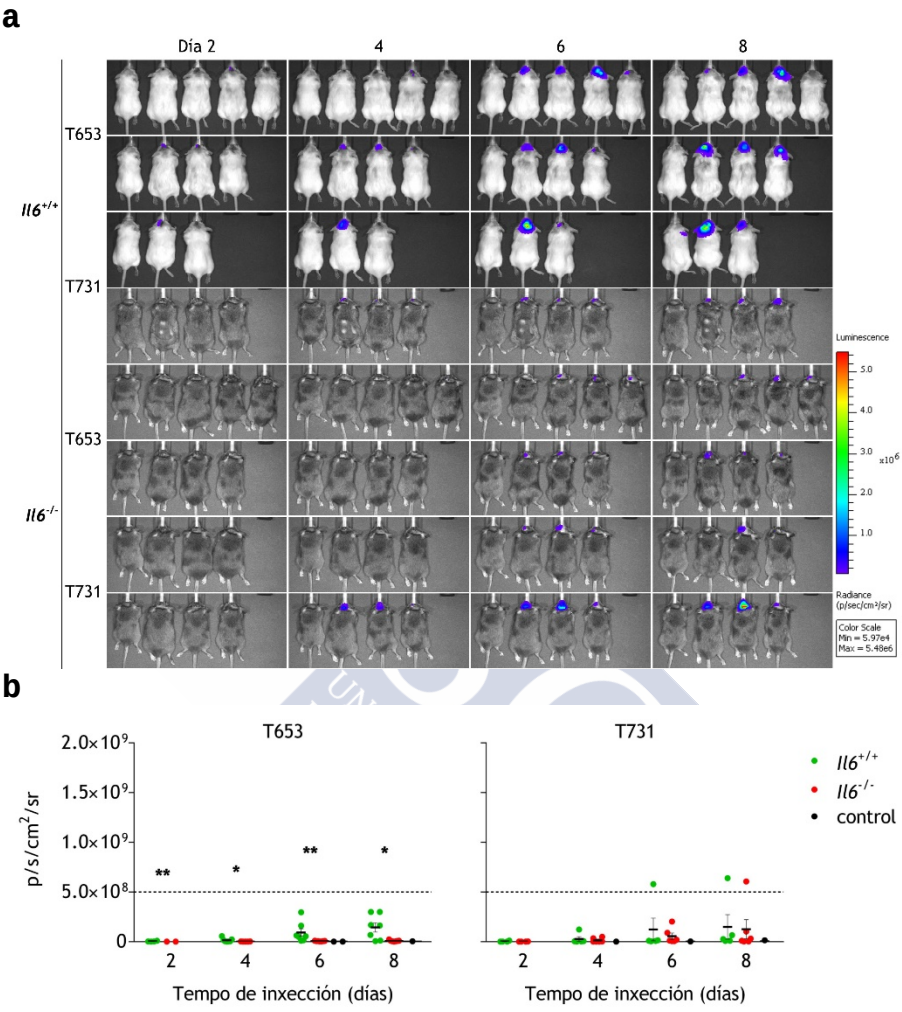


Figura 6|Crecemento tumoral *in vivo* a partir das liñas celulares T653 e T731 en ratos femia *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$. a| Imaxes do seguimento *in vivo* da progresión tumoral a través da detección de bioluminiscencia (IVIS Spectrum®). En todas as imaxes, o primeiro rato é o control de cada xenotipo sen células tumorais inxectadas. **b|** Curvas de crecemento tumoral (media ± SD). Para T653, control (n=7), *Il6*$^{-/-}$ (n=7); para T731, control (n=5), *Il6*$^{-/-}$ (n=6). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ respecto á condición control.

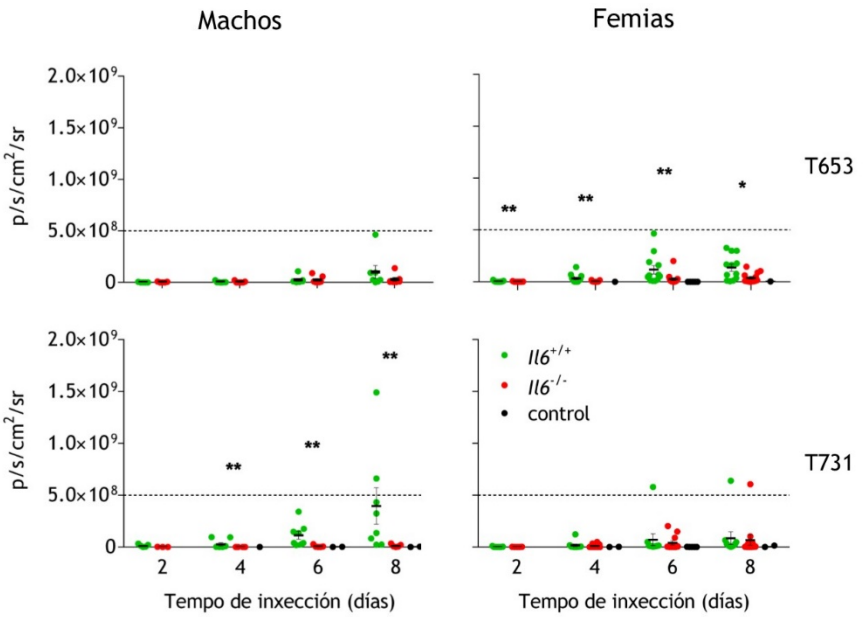


Figura 7| Efecto dos niveis de IL6 no microambiente sobre o crecemento tumoral *in vivo*. Recompilación das curvas de crecemento tumoral (media ± SEM). En machos, para T653, control (n=7), *Il6*$^{-/-}$ (n=7); para T731, control (n=8), *Il6*$^{-/-}$ (n=6). No conxunto de femias, para T653, control (n=12), *Il6*$^{-/-}$ (n=14); para T731, control (n=10), *Il6*$^{-/-}$ (n=12). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ respecto á condición control.

A partir do rexistro de unidades de bioluminiscencia podemos observar o crecemento tumoral en ambas as dúas liñas de células inxectadas. Se establecemos como medida para realizar a comparación un tamaño de tumor que emite $5.0x10^8$ p/s/cm^2/sr, os resultados obtidos en machos inxectados coa liña T731 mostran unha correspondencia cos datos obtidos por Weissenberger e Ancrile: IL6 promove o crecemento tumoral *in vivo* (Figura 4 e 7). Os ratos *Il6*$^{-/-}$ mostran un crecemento do tumor moito máis discreto respecto aos ratos *Il6*$^{+/+}$, nos que o tamaño da masa tumoral se dispara no día oito tras a cirurxía. O resultado arroxado polas femias pódese empregar como reforzo da idea de que a ausencia de IL6 no microambiente protexe fronte ao crecemento tumoral. En femias, o comportamento do cancro en *Il6*$^{+/+}$ non é significativamente diferente ao de *Il6*$^{-/-}$ (Figura 5 e 6) e, nos dous casos

o patrón de crecemento é similar ao de machos *Il6*$^{-/-}$ (Figura 7). A progresión tumoral en femias *Il6*$^{+/+}$ é moito máis sutil que en machos do mesmo xenotipo debido aos niveis de expresión de *Il6*.

Son varios os estudos que avalan esta discordancia de xénero en canto ao crecemento tumoral (Caetano *et al*., 2018; Caetano *et al*., 2017; Mosteiro *et al*., 2018; Naugler *et al*., 2007). No caso de gliomas de alto grao, obsérvase unha maior incidencia da enfermidade e unha menor efectividade da terapia estándar en homes respecto a mulleres (Yang *et al*., 2019) ¿A causa? Aínda que un novo estudo suxire que non só son as hormonas as responsables destes efectos desiguais entre sexos (Yang *et al*., 2019), con relación ás diferenzas observadas por efecto de IL6, unha explicación pode ser os niveis de estróxenos. Está descrito que estas hormonas inflúen na patoxénese e exercen un efecto protector fronte o desenvolvemento do tumor (Kabat *et al*., 2010; Lan *et al*., 2017). Os estróxenos exercen a súa función biolóxica a través da súa unión aos receptores de estróxenos (ER), que son intracelulares e de dous tipos: ERα, cun maior papel en glándulas mamarias, útero, regulación do metabolismo e no mantemento da homeostase ósea; e ERβ, con maiores efectos sobre o SNC. A unión do ligando ao receptor provoca cambios na conformación deste último e a formación de dímeros que se trasladan ao núcleo onde executan dous modos de actuación: 1) a súa unión aos elementos de resposta a estróxenos (EREs) dos promotores dos xenes diana, ou 2) a súa unión a outros factores de transcrición, por exemplo, NF-κB (Lan *et al*., 2017). Neste caso exerce un efecto inhibidor mediado por varios mecanismos, dependendo do estímulo e o tipo celular, pero que en xeral se dividen en dous tipos: 1) citoplasmático, no que se ven afectados compoñentes da vía de sinalización que activa NF-κB, e 2) nuclear, no que se ve afectado directamente a unión de NF-κB ao ADN ou a activación da transcrición. A través deste último mecanismo podemos relacionar os estróxenos con IL6: ER exerce un bloqueo directo da unión de NF-κB ao promotor de IL6 (Kalaitzidis & Gilmore, 2005). Os niveis de estróxenos presentes en femias, pero non en machos, suprimen a produción excesiva de IL6, prevendo así a progresión tumoral (Naugler *et al*., 2007).

Os tumores de baixo grao do modelo de estudo arroxan un resultado diferente respecto á función de IL6 no microambiente

tumoral. Para coñecer o motivo é necesario ter en conta as células de orixe, as T653. En 1997 publicouse o traballo de Manuel Serrano, e o resto do equipo de Lowe, no que se demostraba que a expresión de *Ras* en células murinas inmortalizadas é suficiente para inducir a súa transformación pero, non así, en células primarias, onde é necesaria a participación dun segundo evento oncoxénico (Serrano *et al*., 1997). As células definidas como inmortais adquiriron unha serie de mutacións que lles permitiron evadir a senescencia e proliferar durante largos períodos de tempo *in vitro*. Neste contexto, a introdución de *Ras* oncoxénico é suficiente para transformalas. No caso das células primarias, en principio libres de mutacións, a expresión deste oncoxene induce a activación da senescencia que, a súa vez, protexe fronte a transformación maligna. É por este motivo polo que é necesario un segundo evento oncoxénico que permita evadir este mecanismo de defensa (Serrano *et al*., 1997). No traballo de Seoane demostran que a expresión de *H-Ras*^{V12} non induce senescencia en astrocitos, en cambio, si favorece a súa hiper-proliferación e adquisición dun fenotipo transformado. Pero, a pesar destas características, non é suficiente para a formación de tumores *in vivo*. A inxección subcutánea en rato SCID de astrocitos *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12} só xerou tumores en dous ratos dun total de 13 inxectados, cun longo período de latencia (entre 10 e 15 semanas). Un dato ben distinto foi arroxado a partir da inxección de astrocitos *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}: de 13 animais sometidos ao procedemento, os 13 manifestaron crecemento tumoral e nun curto intervalo de tempo (Seoane *et al*., 2008). Queda demostrado, deste xeito, a necesidade dun segundo evento oncoxénico, neste caso a perda do supresor tumoral *Rb*, non só para incrementar a taxa de proliferación celular senón tamén para conferir unha maior agresividade ao tumor (Seoane *et al*., 2008). Isto significa que eses dous tumores formados a partir de astrocitos *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}, do total de 13, tiveron que sufrir algunha mutación adicional, durante ese tempo de latencia, que favoreceu o desenvolvemento da masa tumoral. A partir destes tumores xurdiu a liña T653, como xa mencionamos previamente. Retomando o noso experimento *in vivo* con esta liña celular, podemos comprobar que as diferenzas no crecemento do tumor entre machos e femias son moi sutís. Isto indícanos que os niveis da interleuquina non son relevantes

neste contexto, resultado que corrobora a semellanza que atopamos na progresión do tumor cando comparamos os xenotipos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$.

A partir dos resultados obtidos podemos concluír que a presenza de IL6 no microambiente promove o crecemento do glioma *in vivo* e que a súa participación é maior canto máis agresivo é o tumor.

2.2 A POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS CARA O FENOTIPO M2 É INDEPENDENTE DE IL6 EN GLIOMAS

O papel de IL6 no microambiente tumoral consiste na conversión deste cara un fenotipo inmunosupresor e, como consecuencia, pro-tumoral (Caetano *et al*., 2016). Caetano e colaboradores observaron que a diferenza nos niveis da interleuquina debidas ao sexo xera un perfil de células inmunes infiltradas no tumor tamén diferente. No caso de machos o microambiente é inmunosupresor pro-tumoral, no que o aumento dos niveis de IL6 favorece o recrutamento de neutrófilo N2, células mieloides supresoras, células T reguladoras e células Th17. Pola contra, en femias, trátase dun micoambiente inflamatorio anti-tumoral, onde os niveis baixos de IL6 permite reunir macrófagos tipo M1, células Th1, células T CD8^{+} e NKs (Caetano *et al*., 2017; Caetano *et al*., 2018). Un mecanismo polo que esta interleuquina promove un ambiente tumoral podería ser a través da polarización de macrófagos tipo M1 pro-inflamatorios cara o fenotipo M2 pro-tumoral. Realmente non está moi claro como se produce esta polarización no entorno do tumor pero algúns equipos de investigación atribúenlle a IL6 esta responsabilidade. Un estudo realizado por Chen e colaboradores, en cancro colorrectal, demostrou que o ambiente inflamatorio asociado ao tumor activa as vías de sinalización de NF-κB e STAT3, responsables da produción de grandes cantidades de citoquinas, entre elas IL6. Esta interleuquina, que induce a expresión de receptores M-CSF na superficie de monocitos e promove a súa diferenciación a macrófagos, tamén parece estar involucrada na polarización destes últimos cara o fenotipo M2 (Chen *et al*., 2018). Un resultado similar obtiveron Yin e o resto do equipo nun traballo realizado en carcinoma hepatocelular. Neste caso comprobaron que a vía IL6/STAT3 é a responsable da polarización cara o fenotipo M2 e que inhibíndoa conseguían o retorno ao tipo M1 (Yin *et al*., 2018).

Para comprobar se o efecto de IL6 *in vivo* como promotor da progresión tumoral está relacionado coa súa capacidade de xerar un microambiente pro-tumoral a través da polarización de macrófagos, analizamos por inmunohistoquímica a expresión de iNOS como marcador do fenotipo M1, e Arg1 como marcador de M2 (Gabrusiewicz *et al*., 2015) nos cerebros dos ratos inxectados coas liñas de astrocitos tumorais T653 e T731.

Algúns estudos observaron que, en certos casos, máis do 50% da masa de GB estaba composta por macrófagos asociados ao tumor (Broekman *et al*., 2018). Os nosos resultados tamén mostran unha maior presenza de macrófagos M2 nos tumores respecto aos macrófagos M1, condición que contribúe ao crecemento tumoral. O que non detectamos son diferenzas, en ningún dos dous marcadores, iNOS e Arg1, entre os ratos $Il6^{+/+}$ e $Il6^{-/-}$, e tampouco entre machos e femias, independentemente da liña celular inxectada (Figura 8).

Respecto ao tumor en si, non hai diferenzas entre os formados nun microambiente con ou sen IL6 (Figura 9) e igual que no traballo de Seoane, a tinguidura por hematoxilina/eosina do tecido cerebral revela que os tumores xerados a partir da liña T731 son fenocopias de gliomas humanos de alto grao, mentres que os que se formaron a partir das células T653 imitan aos gliomas de baixo grao (Seoane *et al*. 2008).

O análise por inmunohistoquímica das seccións tumorais non mostran activación da vía apoptótica, detectada a través da expresión de Caspasa-3 activa, en ningún dos xenotipos, liñas celulares e sexo (Figura 8). Respecto á proliferación celular, o marcaxe p-Histona H3 presenta unha positividade débil en todas as mostras en xeral, independentemente do xenotipo $Il6^{+/+}$ ou $Il6^{-/-}$ dos cerebros, do sexo dos ratos ou da liña de astrocitos tumorais inxectada. Ora ben, podemos apreciar un pequeno aumento dos niveis de p-Histona H3 en machos $Il6^{+/+}$ inxectados con astrocitos T731 comparado co resto dos grupos (Figura 8). Este dato apunta na mesma dirección que o que observamos no análise do crecemento tumoral por bioluminiscencia (Figura 7).

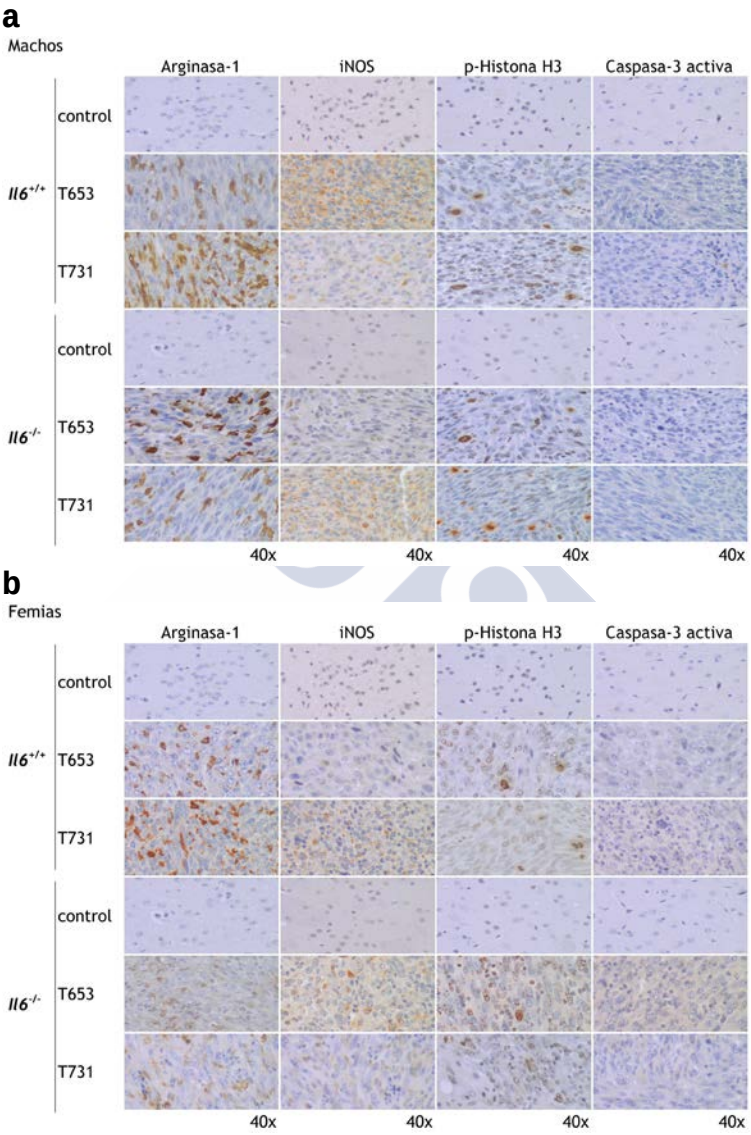


Figura 8| Inmunohistoquímica dos cerebros dos ratos *Il6*$^{-/-}$ e *Il6*$^{+/+}$ inxectados coas liñas celulares T653 e T731. Móstranse os niveis de iNOS e Arg1, marcadores de macrófagos M1 e M2, respectivamente; así como os niveis de p-Histona H3 como indicador de proliferación celular, e Caspasa-3 como marcador de apoptose. **a|** Microfotografías das tinguiduras inmunohistoquímicas dos cerebros de ratos *Il6*$^{-/-}$ e *Il6*$^{+/+}$ machos. **b|** Microfotografías das tinguiduras inmunohistoquímicas dos cerebros de ratos *Il6*$^{-/-}$ e *Il6*$^{+/+}$ femias.

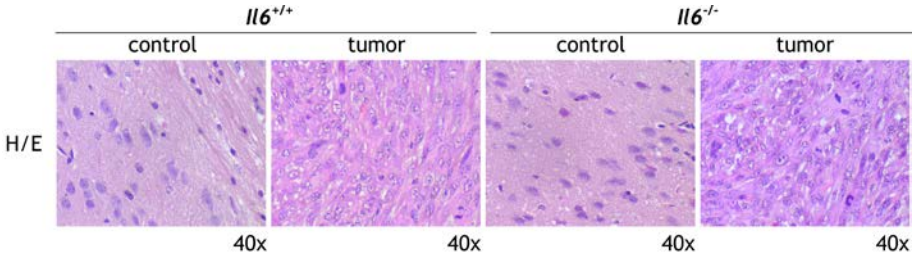


Figura 9| Inmunohistoquímica de cerebros saudables e cerebros con tumores de ratos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$. Microfotografías que mostran a distribución e morfoloxía das células no tecido san fronte ao tecido tumoral a través da tinguidura con hematoxilina e eosina.

Con estes resultados podemos deducir que a polarización de macrófagos cara o fenotipo M2 require dalgún mecanismo independente de IL6, posto que nun microambiente carente desta interleuquina están presentes en grandes cantidades igual que nun microambiente con presenza de IL6. A presenza doutros tipos celulares que contribúen, xunto con macrófagos M2, ao desenvolvemento dun glioma de alto grao nun microambiente con IL6 cobra maior importancia. Os traballos de Caetano identificaron outras células do sistema inmune como mediadoras dun microambiente pro-tumoral, entre elas, os neutrófilo N2, as células mieloides supresoras, as células T reguladoras e as células Th17 (Caetano *et al*., 2017; Caetano *et al*., 2018).

3 IL6 E O SEU EFECTO CÉLULA-AUTÓNOMO

3.1 CARACTERIZACIÓN DA AUSENCIA DE IL6 EN ASTROCITOS MURINOS *Rb*$^{-/-}$ E/OU *H-Ras*^{V12}

3.1.1 A ausencia de IL6 non ten efecto sobre a proliferación celular *in vitro*

Tras observar o efecto que exercía IL6 a nivel de microambiente sobre o crecemento tumoral, o interese centrouse en coñecer o seu papel

a nivel célula-autónomo, concretamente, na proliferación celular. Son varios os estudos que analizan esta cuestión en diversos tipos de cancros e as deducións non van todas na mesma dirección. Hai unha maioría de resultados publicados que defenden a súa capacidade de inducir a proliferación, por exemplo, en células tumorais de mama, pulmón e ovario (Gyamfi *et al*., 2018; Kumar & Ward, 2014; Qu *et al*., 2015), pero noutros estudos realizados en cancro de próstata ou melanoma a conclusión obtida foi contraria: IL6 inhibe a proliferación (Armstrong *et al*., 1994; Culig, 2014; Culig & Puhr, 2018; Mori *et al*., 1999; Young *et al*., 2017). No caso do cancro de próstata, na liña LNCaP, viron que IL6 tiña un efecto directo sobre o ciclo celular ao inducir a expresión de inhibidores do ciclo como p27 e p21 e que diminuía os niveis das CDK2, 4 e 6 (Culig, 2014; Culig & Puhr, 2018; Mori *et al*., 1999). Outro traballo feito coa liña tumoral C33A de cérvix demostrou que esta interleuquina aceleraba o crecemento tumoral *in vivo* pero, pola contra, a súa sobre-expresión *in vitro* non arroxou diferenzas na cinética de crecemento con respecto ao control (Wei *et al*., 2003).

Para comprobar en que grupo podiamos incluír o noso modelo de astrocitos, replicamos a primeira parte do protocolo de xeración das liñas T653 e T731 (prescindido da inoculación das células en ratos SCID; Seoane *et al*., 2008) en astrocitos obtidos por cultivo primario de ratos neonatos *Il6*$^{-/-}$ *e Il6*$^{+/+}$, estes últimos como control. O protocolo consistiu en infectar estes astrocitos con plásmidos retrovirais que codifican a proteína oncoxénica H-RAS^{V12} e a recombinasa CRE, capaz de recoñecer as secuencias *loxP* que flanquean o exón 19 do xene *Rb*. Desta maneira, recompilamos a sobre-expresión das vías de sinalización de factores de crecemento e/ou a perda dun dos reguladores do ciclo celular. Obtivemos así os oito grupos de estudo, catro para o xenotipo *Il6*$^{-/-}$ e os seus equivalentes en *Il6*$^{+/+}$ como control:

Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$
Il6$^{+/+}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}	*Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}

Analizamos a capacidade proliferativa destes astrocitos co método de tinguidura con cristal violeta e confirmamos o resultado co ensaio de incorporación de EdU.

O resultado obtido nos grupos $Il6^{+/+}$ reflexan o mesmo efecto que observou Seoane e colaboradores no seu estudo: a expresión de *H-Ras*^{V12} aumenta a taxa de proliferación dos astrocitos respecto aos grupos que non o expresan, e este incremento é maior naqueles que ademais perderon o xene supresor tumoral *Rb* (Figura 10a; Seoane *et al*. 2008). A ausencia de *Rb* non ten un efecto significativo con respecto ao control (astrocitos $Rb^{loxP/loxP}$), a pesar de que se perdese a inhibición de E2F mediada por RB e se facilite a progresión a través do ciclo celular. Neste caso entra en xogo o outro supresor tumoral, igualmente importante, p53. Esta proteína, a través de ARF e MDM2, parece contrarrestar fortemente os efectos da perda de RB no ciclo celular (Kitajima *et al*., 2017). Podemos concluír, polo tanto, que é o oncoxene *H-Ras*^{V12} o que capacita á célula cun maior poder proliferativo e que a adquisición dun segundo evento oncoxénico coopera reforzando o efecto. Como mencionamos anteriormente, os grupos $Il6^{+/+}$ son o control deste estudo e o interese é coñecer o efecto que IL6 ten sobre o crecemento celular. Como partimos duns resultados para $Il6^{+/+}$ que replican os conseguidos por Seoane, podemos ver que sucede nese escenario cando é o xene de *Il6* o que falta. Neste caso podemos comprobar que o perfil de proliferación dos grupos $Il6^{-/-}$ é exactamente igual que o alcanzado nos grupos $Il6^{+/+}$ (Figura 10a). O dato aportado polo ensaio de incorporación de EdU confirma a observación inicial (Figura 10b). O EdU actúa como análogo da timidina (Salic & Mitchison, 2008), polo tanto, marca aquelas células que se atopan en fase S do ciclo celular. Podemos observar como o grupo de astrocitos que presentan ambos eventos, ausencia de *Rb* e expresión de *H-Ras*^{V12}, mostran un sinal máis intenso que o resto dos grupos. O efecto de só *H-Ras*^{V12} é menor respecto ao dobre evento pero si maior que o no caso no que só falta *Rb*, igual que o que reflexan as curvas de proliferación (Figura 10a). O menor sinal provén do grupo control, $Rb^{loxP/loxP}$. De novo, o patrón é o mesmo para $Il6^{+/+}$ que para $Il6^{-/-}$.

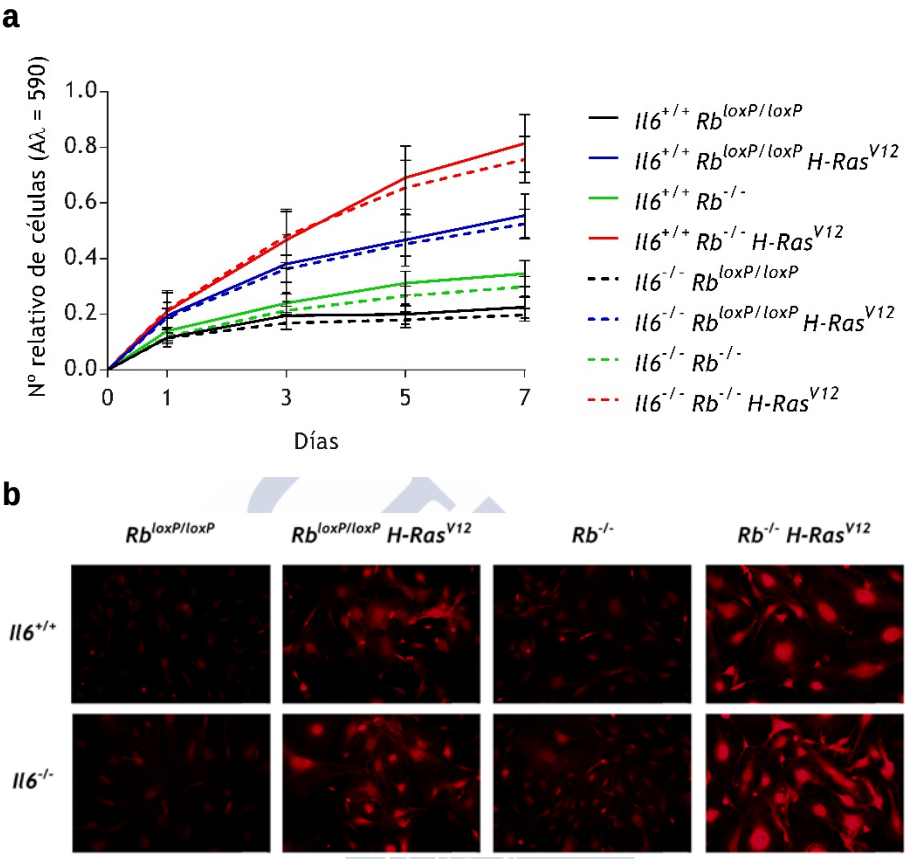


Figura 10| Efecto da falta de IL6 sobre o crecemento celular de astrocitos en presenza/ausencia do oncoxene *H-Ras*^{V12} e/ou o supresor tumoral *Rb*. a| Curvas de crecemento celular, obtidas a partir da fixación dos astrocitos aos días 1, 3, 5 e 7 despois da semente, e a posterior tinguidura con cristal violeta Os datos foron representados como media ± SD. **b|** Incorporación de EdU en astrocitos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$Ao día seguinte da semente, os astrocitos foron serodeprivados durante 44-48 horas e, posteriormente, expostos 16 horas a un exceso de soro antes da súa incubación con EdU.

Para analizar máis detidamente se existen ou non diferenzas entre os grupos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$ partimos do ensaio de cristal violeta, seleccionando só os datos do día 7, último día do ensaio e onde o número de células é maior. Cada valor obtido para cada grupo de

astrocitos *Il6*$^{-/-}$ foi normalizado co valor obtido para o seu grupo correspondente de *Il6*$^{+/+}$.

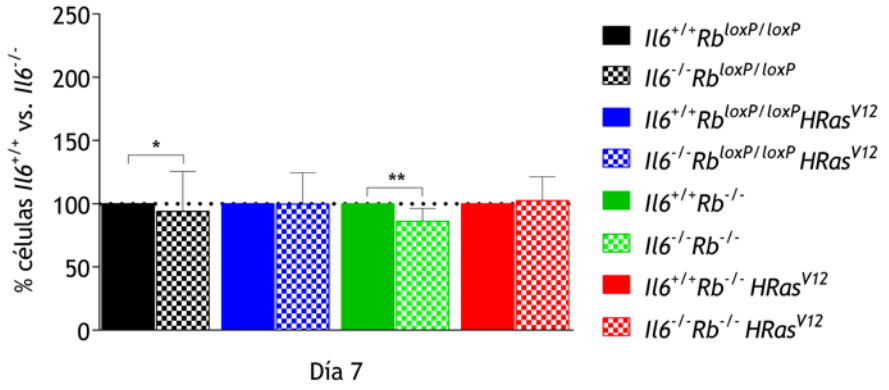


Figura 11| Representación da porcentaxe normalizada de células *Il6*$^{-/-}$ fronte a *Il6*$^{+/+}$. Empregáronse os datos de cristal violeta dos astrocitos fixados ao sétimo día tras a semente (media ± SD). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, n=9, * p < 0,05 respecto á condición control.

De forma inesperada, obtivemos diferenzas significativas nos grupos que non expresan o oncoxene *H-Ras*^{V12}: o grupo control *Rb*$^{loxP/loxP}$ e o grupo *Rb*$^{-/-}$. Nestes casos a ausencia de IL6 diminúe a proliferación celular con respecto aos astrocitos *Il6*$^{+/+}$. Nos astrocitos nos que se expresa *H-Ras*^{V12} non se aprecia esta diferenza e a taxa de crecemento é similar entre ambos xenotipos (Figura 11).

Con estes datos podemos concluír que, en condicións tumoroxénicas, cando se combina a expresión de *H-Ras*^{V12} coa deleción de *Rb*, a devandita interleuquina non xoga un papel no mecanismo de proliferación celular. Este modelo arroxa unha condición similar á que obtivo Wei en cancro de cérvix (Wei *et al*., 2003): existe unha clara participación de IL6 no crecemento tumoral *in vivo* pero esta non se reflexa no crecemento celular *in vitro*.

3.1.2 A ausencia de IL6 non modifica o patrón de adquisición do fenotipo transformado

Como non observamos cambios significativos na proliferación celular entre os grupos de astrocitos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$ centrámonos na súa morfoloxía. Quixemos comprobar se IL6 exercía algún efecto neste aspecto. A técnica de tinguidura con cristal violeta facilitounos este traballo, pois claramente se percibe a morfoloxía dos astrocitos.

Centrándonos no xenotipo *Il6*$^{+/+}$, o grupo control *Rb*$^{loxP/loxP}$ mostran a morfoloxía normal dos astrocitos primarios: aplanados e non refractantes. Este fenotipo é reproducido no grupo de astrocitos aos cales lles falta a expresión de *Rb*, un evento oncoxénico que non as capacita para a transformación celular (Peeper *et al*., 2001). Pola contra, os grupos que expresan o oncoxene *H-Ras*^{V12} si mostran un cambio dramático na súa morfoloxía. Neste caso, a poboación de células é moi heteroxénea, con tamaños moi dispares entre si, dende células normais aplanadas ata algunha moi grande e cun citoplasma refractante que se expande formando proxeccións longas e finas. Este fenotipo característico de células transformadas é efecto, claramente, do oncoxene (Kalman *et al*., 1999). Podemos observar que a transformación é un proceso rápido porque ao quinto día tras a semente xa se detecta o cambio morfolóxico (Figura 12a). Se nos centramos agora nos grupos que non expresan *Il6* non detectamos diferenzas con respecto aos grupos con xenotipo *Il6*$^{+/+}$, o que nos suxire que IL6 non ten ningún tipo de efecto sobre a morfoloxía celular.

Outro efecto que se detecta nos grupos de astrocitos que expresan *H-Ras*^{V12}, de novo, independente da expresión ou non de *Il6*, é o crecemento das células en focos, un reflexo da perda da inhibición por contacto (Figura 12b).

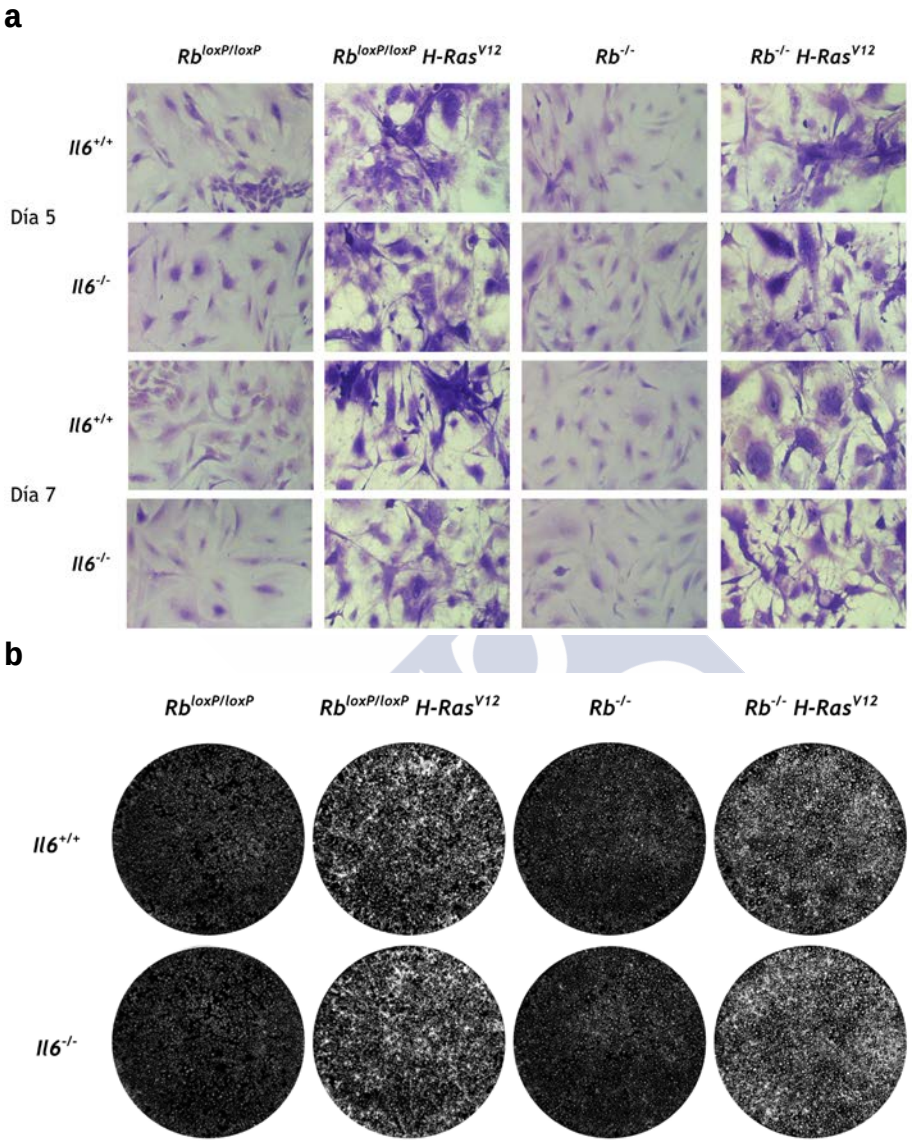


Figura 12|Efecto da falta de IL6 na adquisición do fenotipo transformado, en presenza/ausencia do oncoxene *H-Ras*^{V12} e o supresor tumoral *Rb*, en astrocitos tinguidos con cristal violeta. a| Morfoloxía dos astrocitos ao quinto e sétimo día tras a semente. **b|** Confluencia de astrocitos en placa ao sétimo día despois do semente. Para apreciar mellor as diferenzas realizouse o contraste co programa de procesamento de imaxe dixital *ImageJ*.

3.1.3 A ausencia de IL6 non ten efecto sobre os mecanismos de senescencia e apoptose en astrocitos

IL6 é o principal compoñente do SASP, cuxa función máis inmediata é a de transmitir a senescencia ás células veciñas e evitar así a transformación maligna (Freund *et al*., 2010). O equipo de Campisi determinou que a expresión de *RAS* amplifica e acelera o desenvolvemento do SASP, característica que se ve reforzada se ademais se produce a perda de p53 (Coppé *et al*., 2008). Este traballo foi realizado en fibroblastos, un factor a ter en conta polas diferenzas no comportamento que hai entre este tipo celular e os astrocitos.

Estudos realizados en MEFs determinaron que a expresión do oncoxene *Ras* induce un nivel de estrés que acaba co aumento de proteínas anti-proliferativas, como p53 e $p16^{Ink4a}$, e co arresto permanente na fase G1 do ciclo celular, ou senescencia. Como consecuencia, $H\text{-}Ras^{V12}$ non é capaz por si só de inducir a transformación celular e require da cooperación doutros oncoxenes ou inactivación de supresores tumorais como é o caso de p53. A inactivación de *Rb* no contexto de RAS non axuda ao fenómeno da transformación pero si capacita á célula para evadir a senescencia prematura (Peeper *et al*., 2001; Serrano *et al*., 1997). O traballo de Seoane mostra que o comportamento descrito en MEFs non é aplicable para os astrocitos. Neste caso, a expresión de $H\text{-}Ras^{V12}$ é suficiente para inducir a transformación celular e evadir a senescencia, e o que se consegue coa falta de *Rb* é unha colaboración que reforza este carácter (Seoane *et al*., 2008; Seoane *et al*., 2017).

Para comprobar que sucede no modelo establecido a nivel de senescencia e apoptose ao eliminar a expresión de IL6, analizamos a actividade SA-β-Gal ao sexto día tras a semente e a morfoloxía dos núcleos tinguidos con Hoechst-33258 (bisbenzimida).

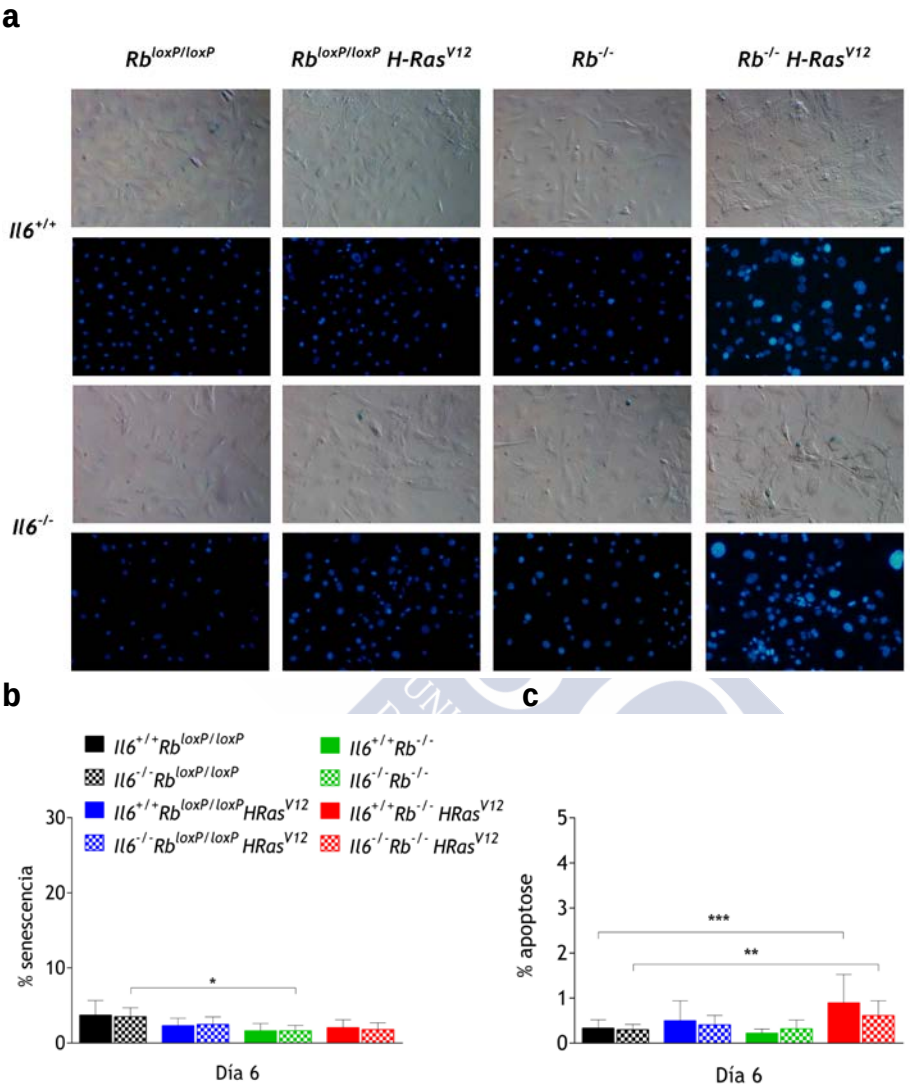


Figura 13|Efecto da falta de IL6 en presenza/ausencia do oncoxene *H-Ras^{V12}* e o supresor tumoral *Rb* sobre os mecanismos de senescencia e apoptose en astrocitos. a| Microfotografías da actividade SA-ß-Gal e tinguidura nuclear con Hoechst-33258 dos astrocitos ao sexto día tras a semente. **b|** Porcentaxe de células senescentes (media ± SD). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, n=5, * p < 0,05 respecto á condición control. **c|** Porcentaxe de células apoptóticas (media ± SD). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, n=13, * p < 0,05 respecto á condición control.

O resultado obtido mostra o mesmo comportamento descrito por Seoane: os niveis de senescencia nos astrocitos *Il6*$^{+/+}$ son moi baixos en xeral, incluso nos grupos que expresan *H-Ras*^{V12} (Figura 13a e 13b), o que vai na mesma dirección que os datos obtidos para a proliferación celular (Figura 10). A tinguidura dos núcleos con Hoechst-33258 permitiunos calcular a porcentaxe de células apoptóticas, e igual que en senescencia, os niveis de apoptose observados son baixos (Figura 13c). O análise da falta de IL6 nos astrocitos mostra que esta interleuquina tampouco ten un papel relevante en senescencia nin en apoptose. As porcentaxes obtidas para cada grupo de células *Il6*$^{-/-}$ non difiren dos grupos con xenotipo é *Il6*$^{+/+}$ en ningún dos dous mecanismos anti-tumorais (Figura 13). Con estes datos podemos concluír que, a pesar de que IL6 é o principal compoñente do SASP, tanto a senescencia como a apoptose desencadéanse e progresan a través de mecanismos non relacionados coa devandita interleuquina.

3.1.4 En condicións normais IL6 exerce un efecto protector fronte ao estrés oxidativo que non se produce durante a tumoroxénese

ROS son un grupo de especies químicas que inclúen, pero non está limitado, moléculas de osíxeno (O_2), radical anión superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidróxeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) e osíxeno singlete ($^1O_2$). As fontes principais de produción de ROS son, basicamente, dous procesos biolóxicos endóxenos: o metabolismo celular, como a fosforilación oxidativa en mitocondrias e a oxidación de ácidos graxos de cadea longa en peroxisomas, no que se libera ROS como residuo; e a resposta celular a xenobióticos, citoquinas e invasión bacteriana, no que a produción destas especies químicas é intencionada a modo de mecanismo de defensa celular. Por outra parte, tamén son fonte, neste caso exóxenas, as radiación ionizante, UV, quimioterápicos e axentes ambientais. Estes radicais libres de O_2 son altamente reactivos e posúen a capacidade de reaccionar e danar macromoléculas como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Por este motivo, a célula ideou mecanismos de defensa consistentes en antioxidantes e proteínas "secuestradoras" que levan a cabo a detoxificación de ROS. Non obstante, a xeración destas moléculas pode exceder a capacidade de

defensa dos antioxidantes e inducir estrés oxidativo, que se viu que está implicado nunha gran variedade de patoloxías, tales como o cancro, o avellentamento e a inflamación, entre outras (Yan *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2016).

Os niveis de ROS detectados en tumores son elevados e o seu papel na sinalización oncoxénica e transformación celular é indiscutible. A día de hoxe son ben coñecidos os seus efectos biolóxicos a nivel de senescencia prematura, xeración de inestabilidade xenómica e transformación maligna (Davalli *et al*., 2016; Hamanaka & Chandel, 2010; Naka *et al*., 2008; Shimura & Kunugita, 2016). Tamén actúa como segundo mensaxeiro alterando moitas vías de sinalización cruciais que, a súa vez, acaban influíndo nos seus niveis intracelulares. Na revisión realizada por Zhang e colaboradores, que se centra na xeración e homeostase de ROS, así como nas súas dianas e os mecanismos de actuación sobre proteínas de sinalización, hai un pequeno apartado dedicado a ROS e a vía de sinalización NF-κB. Os autores comentan que existe unha relación entre estas moléculas e NF-κB. Por unha parte, ROS inflúe na activación deste factor de transcrición principalmente a través da inhibición da actividade de IκBα, impedindo a súa fosforilación, e de IKKβ, por S-glutationilación; e por outro lado, NF-κB tamén afecta aos niveis de ROS coa expresión de proteínas antioxidantes (Zhang *et al*., 2016). A implicación das especies reactivas de O_2 na vía de sinalización de NF-κB lévanos a pensar que pode existir unha relación tamén con IL6. De feito, en células do músculo esquelético observouse a estimulación da expresión de *Il6* mediada por ROS a través da vía NF-κB (Kosmidou *et al*., 2002).

Para analizar o comportamento de ROS en ausencia do xene *Il6* empregamos o modelo de gliomaxénese establecido, coa expresión ou non dos xenes *H-Ras*^{V12} e *Rb*. Está estudado que o oncoxene *H-Ras*^{V12} induce a acumulación de ROS, e que esta propiedade está asociada coa capacidade de RAS de inducir a transformación maligna en astrocitos (Jinesh *et al*., 2018; Trachootham *et al*., 2006). Medimos os niveis de ROS a través da sonda fluorescente DHE.

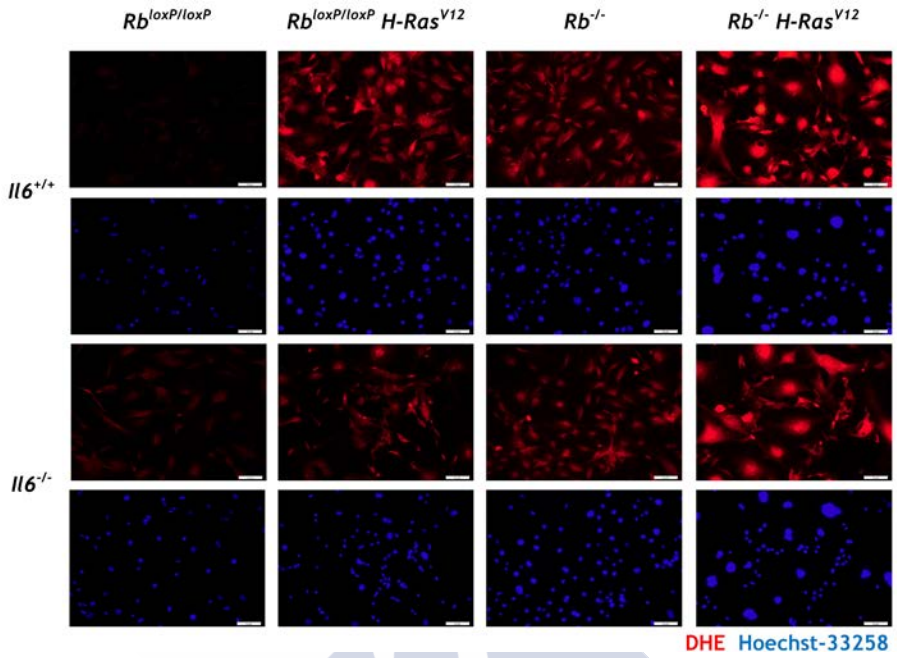


Figura 14| O papel de IL6 fronte á produción de ROS en condicións normais e tumoroxénicas. Microfotografías da fluorescencia emitida pola sonda DHE, ao oxidarse pola acción dos radicais O_2^-, e tinguidura nuclear con Hoechst-33258 en astrocitos ao sexto día tras a semente.

Os resultados obtidos (Figura 14) mostran que nos grupos *Il6*$^{+/+}$ repítese o patrón atopado por Seoane, no que os grupos de astrocitos que expresan *H-Ras*^{V12} presentan maiores niveis de ROS intracelular (Seoane *et al*., 2011). Tamén podemos observar que a ausencia de RB aumenta estas especies químicas respecto aos astrocitos control *Rb*$^{loxP/loxP}$. Está descrito que a deleción de *Rb* aumenta a actividade mitocondrial e, como consecuencia, tamén a produción de ROS (Kitajima *et al*., 2017).

Centrándonos no obxectivo do noso estudo, que é IL6, podemos observar que nun contexto oncoxénico, como a ausencia de *Rb*, a expresión de *H-Ras*^{V12} ou ambos eventos combinados, a ausencia da interleuquina non afecta á produción de ROS. Si podemos observar, pola contra, que se non se expresa en condicións normais, neste caso o grupo control *Rb*$^{loxP/loxP}$, prodúcese un aumento dos niveis de

O_2^- respecto aos astrocitos *Il6*$^{+/+}$ (Figura 14). Este fenómeno é reflexo do mecanismo de protección fronte ao estrés oxidativo mediado por IL6 (Wruck *et al*., 2011). A pesar de que durante moitos anos ROS só foi asociado á toxicidade e patoloxías, actualmente son varios os estudos que afirman un efecto beneficioso na regulación de cascadas de sinalización. Pero este beneficio só é posible cando os seus niveis son baixos (Di Meo *et al*., 2016). O exceso si resulta prexudicial e por ese motivo é importante a existencia de mecanismos capaces de manter unha correcta homeostase. A pesar de que IL6 non é nin un antioxidante nin un enzima detoxificante, o seu promotor contén o que se coñece como elementos de resposta antioxidante (ARE), cuxa expresión é estimulada por NRF2. Este factor de transcrición é sensible ao redox e é coñecido o seu papel como citoprotector fronte ao estrés oxidativo. Forma parte da vía de sinalización KEAP1-NRF2-ARE, unha vía imprescindible no mantemento do balance redox celular e do metabolismo, capaz de inducir unha resposta ante o estrés oxidativo. En condicións fisiolóxicas normais, NRF2 atópase asociada a KEAP1 no citoplasma pero, en condicións oxidativas, o aumento de ROS provoca a disociación dos dous elementos e NRF2 é transportado ao núcleo onde se asocia aos elementos ARE de xenes diana, como aqueles que codifican enzimas detoxificantes (glutation sintetasa e glutation reductasa, entre outros) e, sorprendentemente, tamén IL6 (Marasco *et al*., 2018; Wruck *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2016). Está descrito que IL6 interrompe a asociación entre KEAP1 e NRF2 e estimula o traslado desta última proteína á mitocondria, onde restaura os niveis de ROS prevendo o dano oxidativo. Polo tanto, a inhibición da vía de IL6 aumenta a susceptibilidade de sufrir dano oxidativo (Marasco *et al*., 2018).

Para reforzar os resultados de microscopía, sometemos os astrocitos a un análise por FACS. Os datos confirman o comentado: non hai diferenzas entre *Il6*$^{-/-}$ e *Il6*$^{+/+}$ cando hai un evento oncoxénico implicado, pero si se da un desprazamento do perfil cara unha maior intensidade de fluorescencia no grupo *Il6*$^{-/-}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ con respecto ao grupo *Il6*$^{+/+}$ *Rb*$^{loxP/loxP}$ (Figura 15).

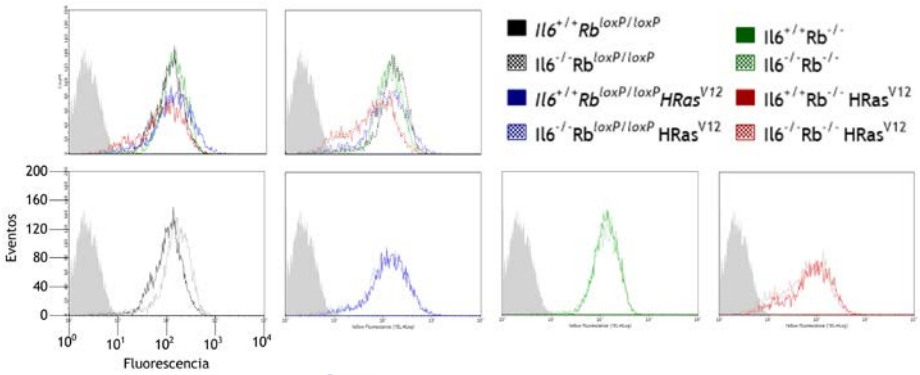


Figura 15| O papel de IL6 fronte á produción de ROS en condicións normais e tumoroxénicas. Análise por FACS dos astrocitos tratados con DHE ao sexto día tras a semente para coñecer o nivel de ROS producido en cada grupo de estudo (λ_{ex}=518; λ_{em}=605).

A partir dos resultados obtidos podemos concluír que en astrocitos normais existe un efecto protector do estrés oxidativo mediado por IL6, en consonancia con outros estudos que demostran as propiedades neuroprotectoras de IL6 e NRF2 contra o dano oxidativo (Wruck *et al*., 2011), pero esa defensa vese diluída cando os niveis de ROS se exceden como consecuencia de eventos oncoxénicos.

3.1.5 IL6 non afecta á distribución nin ao número de mitocondrias por célula

Como se mencionou anteriormente, a mitocondria supón a fonte máis importante de produción de ROS e a súa disfunción é unha característica frecuente en células cancerosas (Li *et al*., 2015). O estudo comparativo entre as mitocondrias de células normais e as de células transformadas abarca dende a microscopía ata o nivel molecular, bioquímico, metabólico e xenético. As mitocondrias son organelas dinámicas que cambian en número e morfoloxía segundo as condicións. Xeralmente forman una rede física interconectada que favorece unha eficiente produción de enerxía e intercambio de Ca^{+2} e xenomas. Esta conectividade descríbese en conxunto cunha estrutura organizada ao redor do núcleo, reflexo, todo elo, dun metabolismo centrado na produción de enerxía e síntese de proteínas e lípidos para a división

mitótica. En células transformadas, as modificacións morfolóxicas das mitocondrias, basicamente unha estrutura menos organizada e máis fragmentada, e a diminución da súa actividade están relacionada co cambio no mecanismo de produción de enerxía, de fosforilación oxidativa a glicólise, o que evidencia un aumento da porcentaxe de células en fase S do ciclo celular (Chiaradonna *et al*., 2006).

Despois de observar que IL6 pode exercer de protector contra o estrés oxidativo fronte a niveis basais de ROS, pero non así con niveis elevados, quixemos determinar se existía algunha relación coa cantidade e/ou distribución de mitocondrias na célula. Para realizar o análise empregamos a sonda selectiva MitoTracker Red CMXRos.

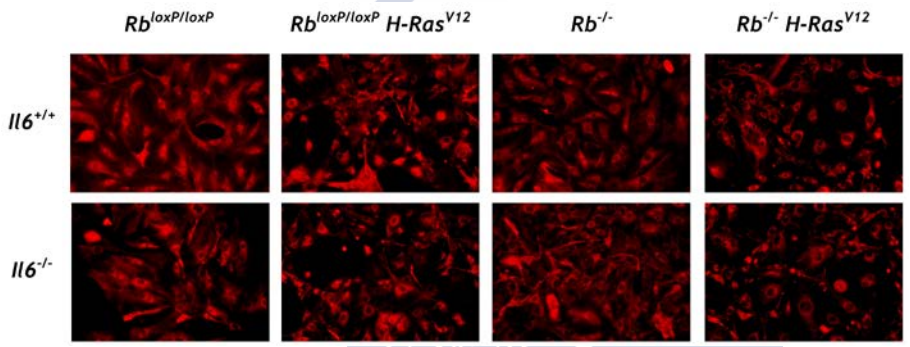


Figura 16| O papel de IL6 na distribución de mitocondrias na célula, en presenza ou non de eventos oncoxénicos. Microfotografías da fluorescencia emitida por MitoTracker Red CMXRos. Os astrocitos, ao sexto día tras a semente, foron incubados con esta sonda, que se difunde de forma pasiva a través da membrana plasmática e acumúlase en mitocondrias activas. Permite determinar a distribución e número de mitocondrias por célula.

Neste caso non detectamos un patrón de distribución das mitocondrias na célula distinto entre os astrocitos $Il6^{+/+}$ e os $Il6^{-/-}$ (Figura 16), tampouco no grupo control $Rb^{loxP/loxP}$ no que previamente observamos diferenzas na produción de ROS (Figura 14 e 15). Si podemos ver que se replica o resultado obtido por Seoane, no que a distribución das mitocondrias modifícase naquelas células que expresan $H\text{-}Ras^{V12}$ (Seoane *et al*., 2011). Como se mencionou anteriormente cando analizamos a morfoloxía celular, a poboación de astrocitos que expresan o oncoxene é moi heteroxénea, con algunhas células normais

entre outras moitas alteradas (Figura 12a). Iso tamén se reflexa no análise de mitocondrias. Independentemente de IL6, os grupos *Rb*$^{loxP/loxP}$ e *Rb*$^{-/-}$ teñen un patrón de distribución destas organelas ao redor do núcleo, mentres que nos grupos que expresan *H-Ras*^{V12} encontramos algunhas células que mostran esta organización fronte a outras que presentan a fluorescencia vermella máis repartida por todo o citoplasma, característica propia das células transformadas.

Ademais da morfoloxía, o que pode variar é o número de mitocondrias por célula. Para determinar este aspecto analizamos a intensidade de fluorescencia a través da citometría de fluxo.

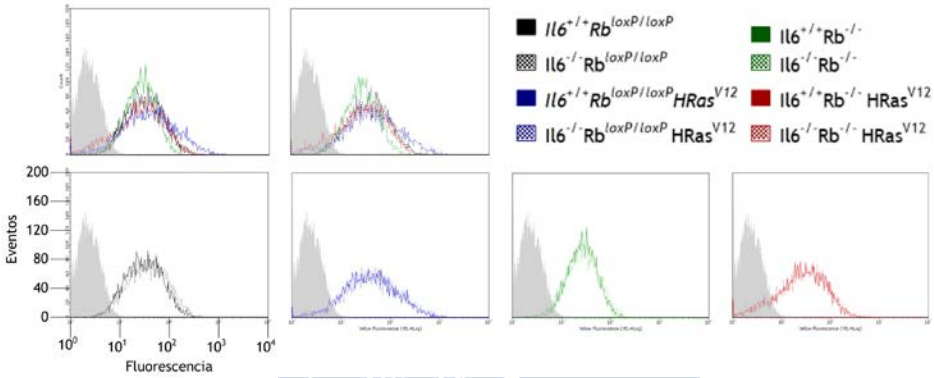


Figura 17| O papel de IL6 na distribución de mitocondrias na célula, en presenza ou non de eventos oncoxénicos. Análise por FACS dos astrocitos tratados con MitoTracker Red CMXRos ao sexto día tras a semente para determinar, a través da intensidade de fluorescencia, se varía o número de mitocondrias por célula coa expresión ou non do xene *Il6* nos distintos grupos de estudo (λ_{ex}=579; λ_{em}=599).

Os perfís obtidos por FACS revelan que a expresión ou non de IL6 non afectan ao número de mitocondrias por célula, como tampouco o modifica a presenza de RAS oncoxénico e/ou RB (Figura 17).

O conxunto destes datos mostran que é o oncoxene *H-Ras*^{V12} o que induce un cambio na distribución de mitocondrias nos astrocitos, sen variar o número, e que IL6 non ten unha participación neste efecto, a pesar de exercer un efecto protector fronte ao estrés oxidativo xerado por niveis basais de ROS.

3.1.6 IL6 participa no DDR

No seguinte paso adentrámonos na análise bioquímica de cada unha das poboacións de astrocitos incluídas no estudo, a través do *western blot*, para analizar se a ausencia de IL6 supón algún cambio nalgunha das vías de sinalización examinadas.

En primeiro lugar caracterizamos o modelo celular de glioma a través do análise dos niveis das proteínas RB e H-RAS^{V12}. Podemos comprobar como si hai expresión do oncoxene nos grupos correspondentes, *Rb$^{loxP/loxP}$ H-Ras^{V12}* e *Rb$^{-/-}$ H-Ras^{V12}*, e como a recombinasa CRE realizou adecuadamente a súa función de eliminar o xene *Rb* flanqueado polas secuencias *loxP* nos grupos *Rb$^{-/-}$* e *Rb$^{-/-}$ H-Ras^{V12}* (Figura 18). Destaca a diferenza na expresión de *H-Ras^{V12}* entre os dous xenotipos: a ausencia de IL6 diminúe a activación do oncoxene. O traballo de Ancrile, xa mencionado anteriormente, comenta que a segregación de IL6 é necesaria para a tumoroxénese (Ancrile *et al*. 2007), requisito que non se cumpre no noso modelo porque os astrocitos *Il6$^{-/-}$* proliferan igual que os *Il6$^{+/+}$* (Figura 10a e 11), pero si é certo que detectamos unha cooperación entre esta interleuquina e o oncoxene. Está descrito que IL6 induce a activación de *RAS* (Rowley & Van Ness, 2002) e, claramente, estamos ante esta situación: os niveis de H-RAS^{V12} están incrementados en presenza da devandita interleuquina e, en maior medida, cando se combina cun segundo evento oncoxénico como é a perda do supresor de tumores *Rb*. A comunicación entre o supresor tumoral e o oncoxene é bidireccional e a deleción de *Rb* favorece a activación do xene *Ras* a través do incremento da súa carga en GTP (Lee *et al*., 1999). Este resultado correlaciónase co observado no experimento de crecemento tumoral *in vivo*: as células da liña T731 (*Rb$^{-/-}$ H-Ras^{V12}*) mostran maior crecemento nun microambiente onde IL6 está presente e en niveis elevados (Figura 7).

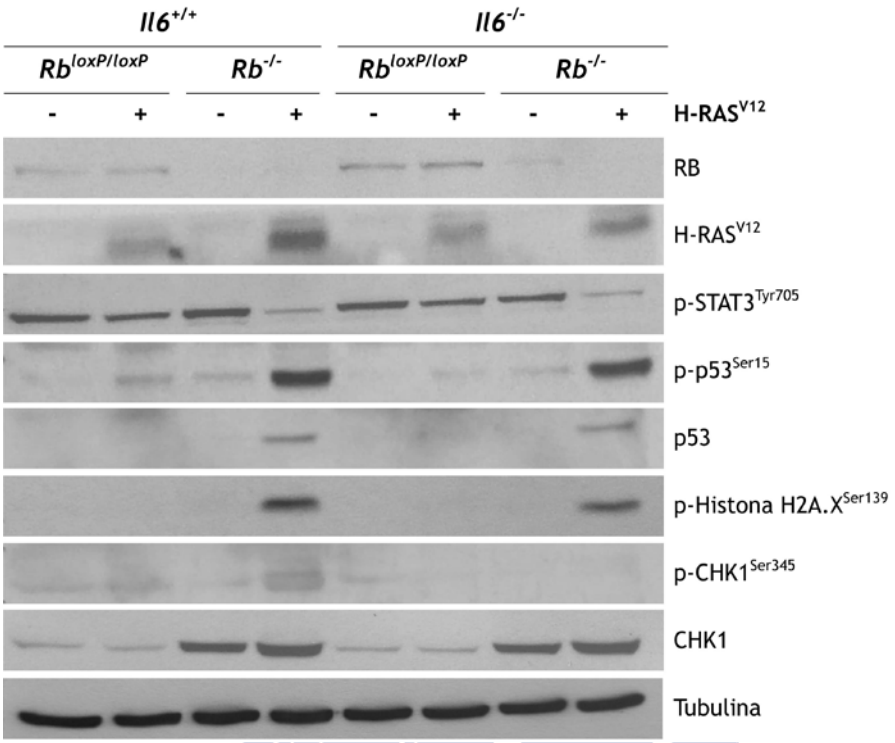


Figura 18| IL6 e a súa implicado no mecanismo de DDR. Análise por *western blot* dos niveis de distintas proteínas implicadas na resposta ao dano no ADN en cada un dos grupos de astrocitos de estudo. A extracción de proteína realizouse ao sexto día tras a semente.

Continuando coa caracterización do modelo e en relación a IL6, a non expresión do seu xene foi examinada por PCR previamente á realización do cultivo primario de astrocitos (véxase a Figura 1 do apartado de Material e Métodos) pero non se reflexa na expresión de STAT3, cuxos niveis diminúen sutilmente nos astrocitos *Il6*$^{-/-}$ respecto aos *Il6*$^{+/+}$. Isto é debido a que, a pesar de que esta interleuquina é a principal activadora de STAT3, son moitas outras as que desencadean este mesmo efecto, entre elas, por exemplo, todo o grupo de citoquinas que forman parte da 'familia de IL6': IL11, oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina 1 (CT1), factor inhibidor de leucemia (LIF), citoquina tipo cardiotrofina (CLC)

(Heinrich *et al*., 1998) e IL27 (Rose-John, 2018). Tamén activan STAT3 as citoquinas da 'familia de IL10', IL23, e os factores de crecemento e/ou os seus receptores (Huynh *et al*., 2017). No xenotipo $Il6^{+/+}$ podemos observar un pequeno incremento da intesidade no grupo $Rb^{-/-}$ con respecto aos demáis, e o efecto débese a que existe unha interrelación autocrina entre IL6 e RB. Como xa mencionamos anteriormente, a deleción de *Rb* aumenta a actividade mitocondrial e, como consecuencia, a produción de ROS (Figura 14). Este incremento do metabolismo oxidativo provoca a activación da vía de sinalización mediada por JNK e a subseguinte segregación de IL6. Esta interleuquina establece un bucle de retroalimentación positivo con STAT3 capaz de regular a función da cadea de transporte de electróns mitocondrial para axustar os niveis de superóxidos (Kitajima *et al*., 2017). Polo tanto, o aumento de IL6 provoca un aumento dos niveis de STAT3 fosforilado. No grupo $Il6^{-/-}$ $Rb^{-/-}$, como non se expresa o xene desta interleuquina, o incremento de fosforilación de STAT3 non é evidente e so se aprecia o nivel de activación resultante da actuación doutras citoquinas diferentes.

Destaca o efecto de $H\text{-}RAS^{V12}$ sobre STAT3. Non tanto no grupo $Rb^{loxP/loxP}$ $H\text{-}Ras^{V12}$, no que se pode apreciar unha pequena diminución con respecto aos grupos que non expresan o oncoxene, pero si é moi evidente no grupo que combina RAS coa perda de RB, independentemente do xenotipo dos astrocitos. Non é coñecido o mecanismo polo cal RAS oncoxénico exerce este efecto sobre STAT3 pero existe un estudo, realizado por D'Amico e colaboradores en adenocarcinoma ductal pancreático, que detectaron unha interacción negativa entre a fosforilación en tirosina 705 de STAT3 e K-RAS. Esta observación reprodúcese no noso modelo de astrocitos infectados con $H\text{-}Ras^{V12}$. Ademais, neste traballo tamén se comenta a existencia dunha correlación inversa entre os niveis de $p\text{-}STAT3^{Tyr705}$ e o grao de progresión tumoral. Partindo desta idea, e para explicar o noso resultado, realizamos unha pequena análise empregando os datos de expresión de STAT3 en glioma recollidos no Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/).

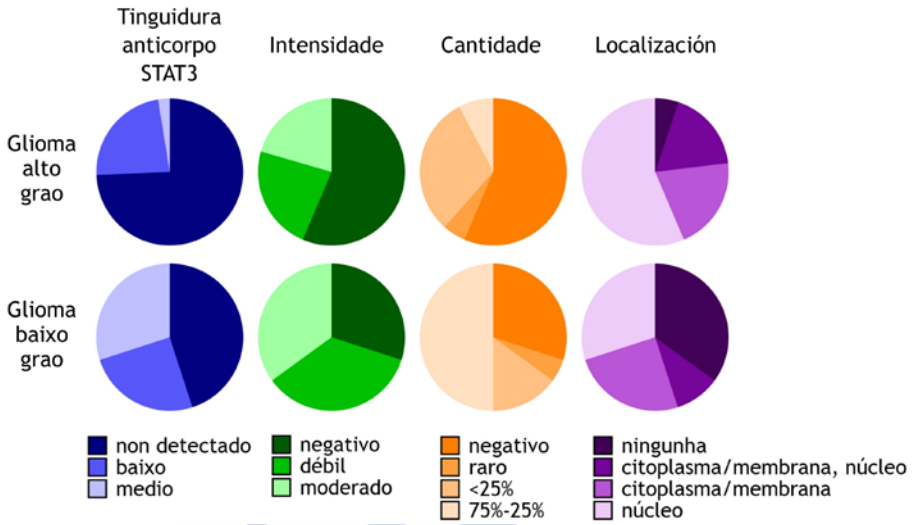


Figura 19| Expresión de STAT3 en mostras de glioma de alto e baixo grao. A partir de tinguiduras inmunohistoquímicas de STAT3 realizadas nos dous tipos de gliomas, e recollidas en Human Protein Atlas, calculamos as porcentaxes de cada categoría correspondente ao sinal do anticorpo, intensidade, cantidade e localización, para gliomas de alto grao (n=39) e gliomas de baixo grao (n=20).

Podemos comprobar que en glioma, igual que en adenocarcinoma ductal pancreático (D'amico *et al.*, 2018), a expresión de STAT3 é maior en lesións de baixo grao e a medida que evoluciona o cancro, a súa expresión diminúe (Figura 19). Isto suxire un efecto supresor tumoral nun estadio tardío do cancro (Baratta, 2018). Respecto ao noso modelo, a activación de STAT3 (p-STAT3^{Tyr705}) segue a mesma tendencia que a súa expresión: a combinación de dous eventos oncoxénicos, *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}, imita unha lesión de alto grao e podemos ver como os niveis de p-STAT3^{Tyr705} diminúen con respecto aos demais grupos. Un só evento, *Rb*$^{-/-}$ ou *H-Ras*^{V12}, sería comparable a un glioma de baixo grao e, en calquera dos dous casos, os niveis de p-STAT3^{Tyr705} non mostran gran diminución comparado co grupo control *Rb*$^{loxP/loxP}$.

Continuando coa investigación de D'amico sobre STAT3, describen que a perda desta proteína acelera a tumoroxénese inducida por K-RAS en pulmón (D'amico *et al.*, 2018). Podemos atopar un equivalente nos nosos resultados. O grupo *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12} mostra niveis reducidos de p-STAT3^{Tyr705} respecto ao grupo *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12}.

Estes fenotipos son os equivalentes ás liñas empregadas no experimento *in vivo*, T731 e T653 respectivamente. Como observamos no seu momento, as células T731 mostran un maior crecemento tumoral que as T653, un efecto que podería estar relacionado coa redución da expresión e activación de STAT3.

O análise de p53 e da histona H2AX revelounos que algo estaba sucedendo a nivel de dano no ADN e IL6, porque nos dous casos existe unha lixeira diferenza entre os grupos $Il6^{+/+}$ e $Il6^{-/-}$, sendo os niveis destas proteínas inferiores nos últimos. O exame da activación de CHK1 confirmou as sospeitas: IL6 está involucrado no mecanismo de resposta ao dano no ADN. No grupo $Il6^{+/+}$ $Rb^{-/-}$ $H\text{-}Ras^{V12}$ os niveis p-CHK1^{Ser345} están moi incrementados respecto ao mesmo grupo de $Il6^{-/-}$, onde non se detecta sinal. A cantidade de CHK1 non varía entre os xenotipos pero si é curioso observar como os grupos $Rb^{-/-}$, independentemente da expresión de $H\text{-}Ras^{V12}$, presentan niveis máis elevados desta proteína que os grupos que manteñen *Rb* intacto (Figura 18). En cancro de mama triplo negativo é frecuente a perda de *RB*, e asociado a este espectro tumoral está a sobre-expresión de xenes asociados coa replicación do ADN e mitose, entre eles, *CHK1*. Todos eles xogan un papel importante no sostemento da viabilidade celular tras a perda deste supresor tumoral (Witkiewicz *et al*., 2018). Podemos observar que no modelo de glioma que establecemos reprodúcese o descuberto en cancro de mama. Ademais, nos astrocitos deficientes en RB non detectamos dano no ADN porque non hai sinal de γ-H2AX, indicador específico da presenza de DSBs (Ohnishi *et al*., 2009), pero si se aprecian niveis baixos de activación de p53 (p-p53^{Ser15}; nos dous xenotipos) e de CHK1 (p-CHK1^{Ser345}; en $Il6^{+/+}$) indicando a activación da DDR independente de dano (Figura 18).

A combinación da expresión do oncoxene $H\text{-}Ras^{V12}$ xunto coa perda do xene supresor tumoral $Rb^{-/-}$ amplifica a contribución ao dano no ADN (Figura 18). Por unha parte temos unha hiperproliferación mediada por $H\text{-}Ras^{V12}$, que desencadea un estrés replicativo, e por outra banda aparece unha dose dobre de produción de ROS, unha por efecto do oncoxene e outra polo déficit en RB, como xa mencionamos anteriormente (Jinesh *et al*., 2018; Kitajima *et al*., 2017; Trachootham *et al*., 2006). O traballo de Ogrunc describe ROS como moléculas

mitoxénicas que sustenta a proliferación aberrante mediada por oncoxenes (Ogrunc *et al*., 2014). Tanto o estrés replicativo como o oxidativo xeran rotura da dobre cadea do ADN e, como consecuencia, a activación do mecanismo DDR (Hills & Diffley, 2014; Yan *et al*., 2014). A resposta ao dano DSBs iníciase coa unión do complexo sensor MRN (MRE11-RAD50-NBS1) ao foco do dano e o posterior recrutamento e activación de ATM, que en condicións normais atópase como dímeros (ou oligómeros) inactivos, pero tras a rotura do ADN autofosforílase e os dímeros disócianse en monómeros, converténdose nunha proteína completamente activa. ATM fosforila a serina 139 da histona H2AX, converténdoa na forma γ-H2AX. 53BP co-localiza coa histona na zona danada do ADN xunto co complexo MRN. MDC1 tamén é substrato de ATM e únese ao conxunto de proteínas a través da súa unión directa con γ-H2AX. Por último, son recrutadas por MDC1 a proteína RNF4 e a E3-ubiquitín-ligasa-dirixida a SUMO, responsables de promover a reparación do ADN. Aínda que nos estudos orixinais se describían as vías de ATM/CHK2 e ATR/CHK1 como dúas vías de sinalización independentes, cada unha delas activada por tipos de danos específicos, actualmente sábese que existe unha conexión e transición entre ambas as dúas. O estrés replicativo e o estrés oxidativo tamén activan a proteína quinasa ATR, pero para elo son necesarias ATM e o complexo MRN porque xeran a estrutura de ADN necesaria para a súa activación: o extremo 5' do ADN monocatenario cuberto con RPA interacciona con ATRIP que, a súa vez, recruta e activa ATR. Esta quinasa é responsable da fosforilación da serina 345 de CHK1 (importante tamén aquí o papel de ATM). Esta fosforilación activa CHK1 permitíndolle fosforilar os seus propios substratos, como Cdc25, que favorecen a detención do ciclo celular para permitir a reparación da molécula de ADN (Figura 20; Yan *et al*., 2014).

Nos grupos de xenotipo $Il6^{+/+}$ detectamos γ-H2AX, p-p53^{Ser15} e p-CHK1^{Ser345}. A primeira proteína só no grupo que combina os dous eventos oncoxénicos, $Rb^{-/-}$ $H\text{-}Ras^{V12}$, e as outras dúas, aínda que moito máis evidente no grupo mencionado, tamén se percibe unha lixeira activación nos demais grupos de estudo (Figura 18). No xenotipo $Il6^{-/-}$ o escenario para γ-H2AX e p-p53^{Ser15} é similar ao mencionado, aínda que os niveis son lixeiramente menores, pero respecto a p-CHK1^{Ser345} é

totalmente diferente. Neste caso non hai activación desta quinasa agás unha mínima no grupo control $Rb^{loxP/loxP}$. A presenza dun evento oncoxénico, ou a combinación dos dous, anula completamente esta activación (Figura 18). Como mencionamos previamente, o exceso de ROS ademais de producir estrés oxidativo tamén incrementa os niveis de IL6 e está descrito que esta citoquina regula a transcrición de ATM e CHK1 (Figura 20; Chen *et al*., 2015). A modulación transcricional de CHK1 non se produce no noso modelo posto que os niveis proteicos non varían entre os xenotipos; pero si se pode estar dando unha regulación transcricional de ATM, ou polo menos unha activación (Yan *et al*. 2014), mediada por IL6 porque o nivel de activación dos substratos desta quinasa, γ-H2AX e p-p53^{Ser15}, están diminuídos cando falta a devandita interleuquina (Figura 18). A falta de IL6 supón unha menor cantidade ou activación de ATM e, como consecuencia, unha menor activación das súas proteínas substrato. Agora ben, o feito de que a activación de CHK1 desapareza coa perda do xene *Il6* e que non se manteña un mínimo, como sucede coas dúas proteínas anteriores, fai sospeitar que existe tamén unha conexión de IL6 con ATR ou directamente con CHK1. Existen un par de traballos que nos permiten relacionar a activación de CHK1 por IL6 a través de c-MYC (Figura 20). O traballo de Shi e colaboradores demostra que en mieloma múltiple IL6 activa a tradución de c-MYC. A molécula clave no proceso é a proteína de unión ao ARN, hnRNP A1 (A1), cuxos niveis aumentan en citoplasma por efecto desta interleuquina. IL6 induce a fosforilación de serina no dominio C-terminal de A1, alterando a estrutura e estimulando a súa localización citoplasmática. Todo este proceso é dependente de p38MAPK (Shi *et al*., 2011). O proto-oncoxene *c-MYC*, a súa vez, activa a transcrición de CHK1 e CHK2 ao unirse directamente aos seus promotores (Wang *et al*., 2013). Deste xeito, se non hai IL6 non se activa a quinasa CHK1, tal como mostra o resultado do *western blot* (Figura 18), e complícase a detención do ciclo celular necesaria para que se repare o dano.

A partir destes datos podemos concluír que IL6 participa modulando de forma positiva a DDR e que a súa ausencia reduce dita activación.

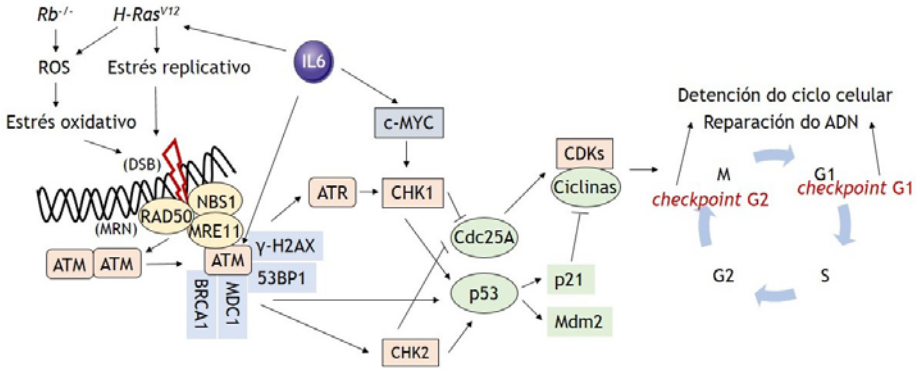


Figura 20| Vía de sinalización da DDR e implicación de IL6. Despois de producirse un dano no ADN, como consecuencia do estrés celular, actívase unha resposta de detección e reparación da lesión. A cascada comeza coa unión do complexo MRN ao lugar do dano e a posterior activación de ATM/CHK2 e ATR/CHK1. Estas quinasas median a inactivación das fosfatasas Cdc25s, responsables da activación das CDKs. Por outra parte, CHK1 e CHK2 activan a proteína p53 que, a través de p21, tamén inhibe a actividade ciclina/CDK. A finalidade da DDR é a detención do ciclo celular para reparar o dano no ADN e evitar, así, que a célula se divida en dúas fillas portadoras de mutacións. IL6 participa na DDR activando algúns dos seus compoñentes, tales como ATM e CHK1.

3.1.7 IL6 reduce a capacidade de desdiferenciación de astrocitos mentres que WIP1 é clave para activar o programa

O traballo de Mosteiro e colaboradores demostra unha correlación positiva entre dous procesos considerados opostos: a senescencia, asociada co avellentamento; e a reprogramación, relacionada co rexuvenecemento. Observaron que o tecido que carece da expresión de p16INK4a/ARF, que non activa o mecanismo de senescencia, mostra comprometida a súa capacidade de desdiferenciación; por outra parte, nun tecido que non expresa p53 e que, como consecuencia, mostra niveis elevados de dano, senescencia e produción de citoquinas, esta característica vese incrementada. Como o aumento dos niveis de citoquinas está relacionada con NF-κB, comprobaron que a súa inactivación farmacolóxica reducía a reprogramación *in vivo*, un resultado similar ao obtido co bloqueo de IL6, factor que se describiu como clave no mecanismo de desdiferenciación (Mosteiro *et al*. 2016;

Mosteiro *et al*. 2018). Un dato importante a mencionar é que parte do estudo foi realizado en MEFs.

No estudo de Mosteiro contan co factor senescencia e o SASP, do cal IL6 é a citoquina máis destacable. Para examinar cal é o papel que xoga a devandita interleuquina no modelo *in vitro* de glioma, onde non se activa o mecanismo de senescencia, comprobamos a expresión de dous marcadores de células nai proxenitoras/neuronais, SOX2 e Nestina, pola técnica da inmunofluorescencia.

O resultado obtido mostra que os niveis de expresión de SOX2 e Nestina son maiores nos grupos de astrocitos que expresan o oncoxene *H-Ras*^{V12}, independentemente do xenotipo (Figura 21). Este dato concorda co resultado conseguido no experimento de astrocitos *Sox2-TK*, no que observamos que existía unha correlación positiva entre a expresión deste oncoxene e *Sox2* (Figura 1). Os niveis son aínda maiores no grupo que ademais tamén perdeu *Rb*, o que demostra que a expresión de marcadores *stemness* aumenta a medida que o tumor progresa cara un estadio máis agresivo (Friedmann-Morvinski *et al*., 2012). Por outra parte, só a deleción do xene *Rb* aumenta a expresión destes marcadores comparado co grupo control *Rb*$^{loxP/loxP}$ (Figura 21). Está descrito que RB controla o proceso de diferenciación durante o desenvolvemento embrionario e en liñaxes celulares en adultos, e que a deleción do seu xene afecta ás modificacións epixenéticas do elemento regulador de *SOX2*, SRR2. Este elemento regulador impulsa a expresión de *SOX2* e *OCT3/4* durante a pluripotencialidade pero tras a diferenciación, *SOX2* e *OCT3/4* son suplidos de SRR2 polo complexo represor, formado por p27, SIN3A, ESF4 e p130, de forma permanente en células somáticas. A ausencia de RB prexudica a represión do xene *SOX2*, favorecendo a súa transcrición e tradución e, como resultado, tamén o proceso de reprogramación (Vilas *et al*., 2015).

Resulta curioso que, a pesar de que nos dous xenotipos se expresan SOX2 e Nestina, o nivel varía entre *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$, sendo maior nestes últimos posto que o sinal de fluorescencia, sobre todo de SOX2, é máis intenso que nos grupos *Il6*$^{+/+}$ (Figura 21).

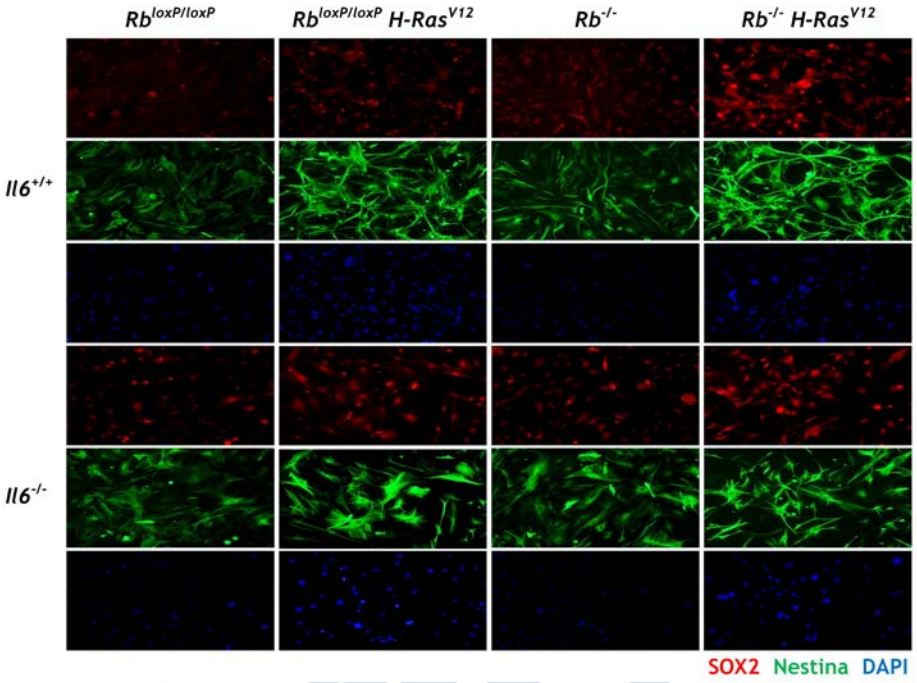


Figura 21| O papel de IL6 na expresión de dos dous marcadores *stemness*, SOX2 e Nestina. Microfotografías que mostran a inmunoreactividade a SOX2 e Nestina, e tinguidura nuclear con DAPI. As células infectadas foron sementadas en cubre-obxectos, tratados previamente con polilisina, e posteriormente fixadas con formalina tamponada durante 24h antes de proceder á realización da inmunofluorescencia.

O seguinte paso foi determinar a capacidade de todos estes grupos de astrocitos de formar neuroesferas. Para elo, simplemente recollemos as células que estaban a crecer nun cultivo en 2D e expuxémolas a un medio de cultivo rico en factores de crecemento que favorece a súa desdiferenciación e crecemento en 3D.

Detectamos que, a pesar de que todos os grupos de estudo expresaban SOX2 e Nestina, só os grupos con H-RAS^{V12} teñen a capacidade de formar neuroesferas, coincidindo coa maior expresión de *Sox2* (Figura 21 e 22a). O comportamento é o mesmo para os astrocitos *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$. O grupo *Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12} forma maior número de neuroesferas pero máis pequenas que o grupo *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12} que, co mesmo número de células e o mesmo tempo de exposición das células

ao medio condicionado, forma unhas estruturas máis grandes e, como consecuencia, un menor número (Figura 22a). O grupo control, *Rb*$^{loxP/loxP}$, e o grupo *Rb*$^{-/-}$ seguen mantendo un crecemento en 2D a pesar das condicións de cultivo. Neste caso, aínda que presentan marcadores *stemness*, o grao de desdiferenciación non é suficiente para formar neuroesferas (Figura 21 e 22a). Respecto a isto, o traballo de D'amico e colaboradores revelou un novo responsable no mantemento do estadio diferenciado das células: STAT3. En base á tumoroxénese inducida por K-RAS en cancro de pulmón e páncreas, explican que p-STAT3^{Tyr705} sustenta a identidade epitelial das células tumorais mentres que a súa perda favorece a adquisición do fenotipo mesenquimal asociado á metástase e resistencia aos fármacos terapéuticos (D'amico *et al*., 2018). Podemos comprobar que no modelo de glioma sucede o mesmo. Comparado cos grupos que non expresan *H-Ras*^{V12}, os que expresan o oncoxene mostran diminuídos os niveis de p-STAT3^{Tyr705} (Figura 18) e son precisamente estes os que, as súa vez, teñen a capacidade de formar neuroesferas (Figura 22a).

Xunto con SOX2, OCT3/4 é un factor de transcrición esencial para a auto-renovación e pluripotencialidade das células nai embrionarias e células iPS (Rizzino & Wuebben, 2016). Para analizar a súa expresión no noso modelo, transfectamos todos os grupos de estudo co plásmido PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP OCT4 para observar a expresión de *Oct3/4* a través da fluorescencia da proteína mCherry a medida que as células se desdiferenciaban. Sorprendentemente, as células xa expresaban o xene *Oct3/4* sen necesidade de engadir o medio condicionado. Os astrocitos mostraban ese grao de desdiferenciación que, posteriormente, corroboramos coa inmunofluorescencia de SOX2 e Nestina (Figura 21). Sometemos estas células ao ensaio de formación de neuroesferas e, posteriormente, estas neuroesferas (*Rb*$^{loxP/loxP}$ *H-Ras*^{V12} e *Rb*$^{-/-}$ *H-Ras*^{V12}) á microscopía confocal. Tamén analizamos a expresión de *Sox2* a través desta técnica (Figura 22b). Formadas as neuroesferas, non detectamos esa diferenza na expresión de *Sox2* que si atopamos en cultivo 2D en presenza/ausencia de *Rb* e tampouco hai cambios se se expresa ou non o xene de *Il6*.

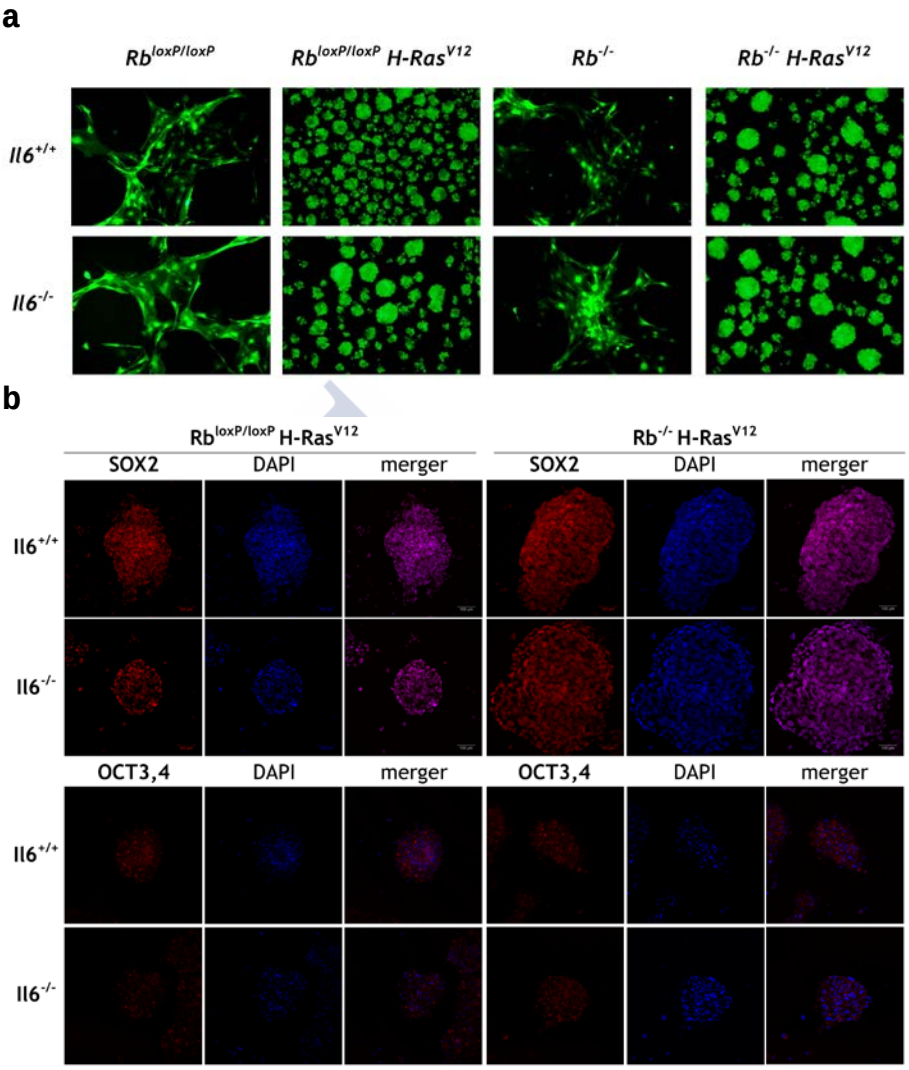


Figura 22| IL6 e a formación de neuroesferas a partir de astrocitos que expresan o oncoxene *H-Ras^{V12}*. a| Microfotografías de astrocitos en medio condicionado para a formación de neuroesferas. Detectamos a fluorescencia emitida pola proteína GFP, consecuencia da infección dos astrocitos cos plásmidos retrovirais PIG e PIG-CRE. Só as células que expresan *H-Ras^{V12}* adquiren a capacidade de diferenciarse ata o grao de formar neuroesferas. **b|** Fotografías de microscopía confocal de neuroesferas formadas pola expresión de *H-Ras^{V12}*. Analizamos a inmunoreactividade a SOX2 e a transfección do plásmido OCT3/4, dous marcadores de stemness; tinguidura do núcleo con DAPI.

Como experimento adicional ao análise da expresión de *Oct3/4*, sometemos a todos os grupos de células do estudo, tras a transfección co plásmido PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP OCT4, á citometría de fluxo para comprobar se existían ou non diferenzas na intensidade de fluorescencia.

O resultado obtido foi o mesmo perfil para $Il6^{+/+}$ e $Il6^{-/-}$ en todos os grupos agás no control $Rb^{loxP/loxP}$, onde os astrocitos $Il6^{-/-}$ mostran unha maior intensidade de fluorescencia en comparación ao grupo $Il6^{+/+}$, o que indica unha maior expresión de *Oct3/4* neste xenotipo e, a súa vez, un maior grao de desdiferenciación (Figura 23). Este dato recorda ao resultado da medición de ROS, onde o grupo control $Rb^{loxP/loxP}$ de $Il6^{-/-}$ tamén mostraba maior produción destas moléculas que o seu equivalente $Il6^{+/+}$ (Figura 15). Podemos intuír unha correlación entre a produción de ROS, o papel protector fronte ao estrés oxidativo de IL6 e o proceso de desdiferenciación.

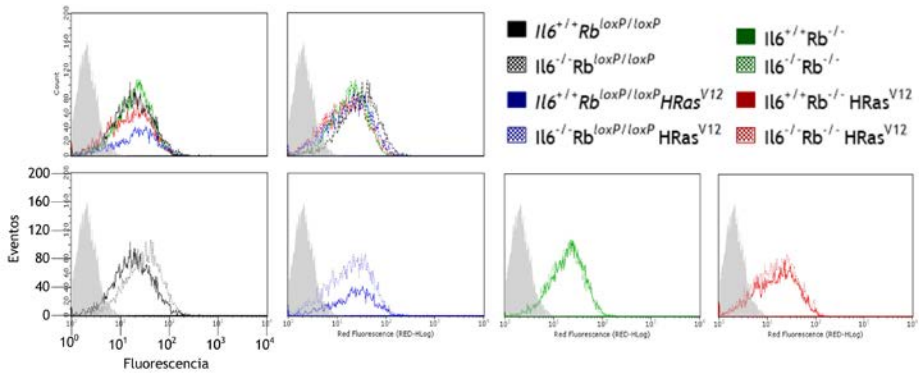


Figura 23| A expresión de *Il6* sobre o grao de desdiferenciación de astrocitos. Análise por FACS de todos os grupos de astrocitos de estudo transfectados co plásmido PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP OCT4. Medición da intensidade de fluorescencia da proteína mCherry, equivalente á expresión do xene *Oct3/4* (λ_{ex}=587; λ_{em}=610).

En base a esta idea exposta e un par de estudos publicados puidemos establecer unha relación ente WIP1, fosfatasa asociada á regulación da resposta ao estrés celular, e a reprogramación a través de NF-κB. WIP1 actúa como regulador negativo dos *checkpoints* de dano no ADN, posto que moitas moléculas do DDR son dianas directas desta

fosfatasa: p38MAPK, ATM, p53, CHK2, CHK1 e γ-H2AX. Moitos cancros contan coa sobre-expresión de WIP1, o que manifesta o seu papel na regulación tumoroxénica, pero non actuando como oncoxene iniciador do cancro por si mesmo, senón a través da concesión de vantaxes para o desenvolvemento tumoral por medio da súa función sobre o conxunto de moléculas diana (Lu *et al*., 2005; Seoane *et al*., 2008; Shen *et al*., 2017; Wang *et al*., 2015). Está descrito que WIP1 coopera con RAS na transformación de fibroblastos primarios de rato, e que a súa sobre-expresión anula a senescencia inducida por RAS en células primarias (Wang *et al*., 2015). O traballo realizado por Chew e colaboradores identificou a WIP1 como fosfatasa de NF-κB e, polo tanto, como regulador negativo da súa sinalización. Esta regulación pode ser indirecta, a través da redución da actividade de p38MAPK; ou directa, na que WIP1 defosforila a serina 536 da subunidade p65 de NF-κB e impide, así, o recrutamento de coactivadores transcricionais, como p300, ao seu promotor. Sen esta asociación diminúe a transcrición dos seus xenes diana (Figura 24; Chew *et al*., 2009). Un destes xenes diana é *DOT1L*, unha histona H3-lisina 79-metiltrasferasa que emerxeu como principal barreira contra a reprogramación celular. O equipo formado por Soria-Valles e cooperantes decatouse de que a activación de NF-κB bloquea a formación de células iPS e que actúa a modo de barreira contra a reprogramación. A diminución da activación deste factor de transcrición supón a diminución da expresión de xenes relacionados coa diferenciación e, pola contra, un aumento daqueles relacionados coa pluripotencialidade. Comprobaron que a subunidade p65 de NF-κB é a responsable da unión ao promotor de *DOT1L* e que existe unha regulación directa deste xene: a inhibición de NF-κB supón a diminución da expresión de *DOT1L* o que, a súa vez, favorece o mecanismo de reprogramación (Figura 24; Soria-Valles *et al*., 2015). As metiltransferasas, igual que outros enzimas modificadores da cromatina, xogan un papel importante na remodelación epixenética, a través da reactivación de *loci* silenciados e/ou restablecemento de dominios de heterocromatina, que ten lugar durante a transición dun estado diferenciado cara a pluripotencialidade. Estes enzimas actúa, polo tanto, facilitando ou dificultando dita transición. Como mencionamos previamente, DOT1L é unha barreira e é necesaria a súa

inhibición para que diminúa H3K79me2 de xenes cuxo silenciamento é necesario para a reprogramación (Onder *et al*., 2012).

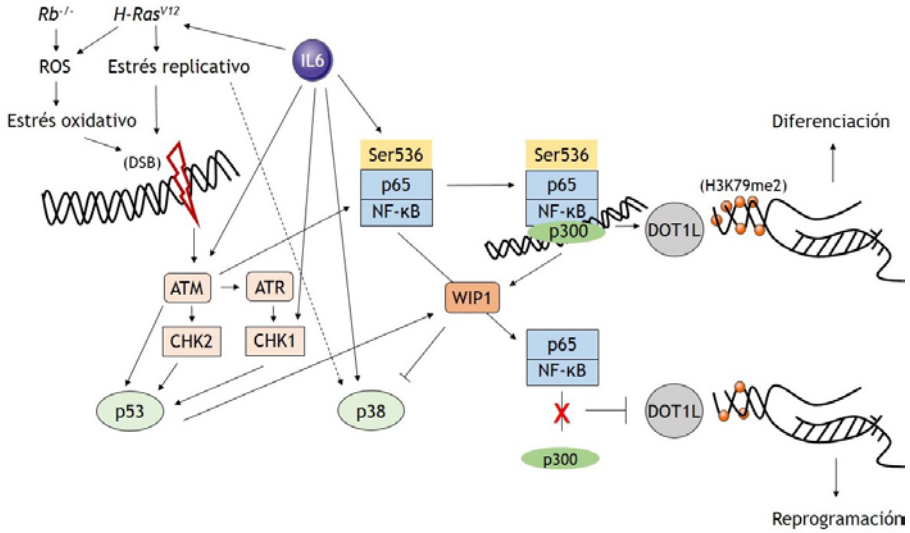


Figura 24| Reprogramación celular medada por WIP1, a través de NF-κB, e implicación de IL6. O factor de transcrición NF-κB é branco de activación de ATM, quinasa que forma parte da DDR. Unha vez activa, NF-κB leva a cabo a transcrición de xenes diana, entre eles a metiltransferasa DOT1L. O marcaxe H3K79me2, responsabilidade de DOT1L, favorece a transcrición de xenes de diferenciación. O estrés oxidativo incrementa os niveis de WIP1, fosfatasa coñecida de p38 pero tamén de NF-κB. A desfosforilación deste último impide o recrutamento do coactivador p300, imprescindible para exercer a súa función transcricional. Diminúen os niveis de DOT1 e, como consecuencia, tamén as metilacións nos xenes cuxo silenciamento é necesario para a reprogramación. IL6 intervén na desdiferenciación celular a través da activación de ATM. Ademais, tamén participa na activación de NF-κB.

Para comprobar se existía esta relación de WIP1 e a desdiferenciación no modelo de glioma establecido, empregamos os extractos proteicos dos astrocitos de estudo para realizar un *western blot* e analizar os niveis e a activación dalgunhas das proteínas clave (Figura 25).

A partir dos datos anteriores concluímos que a produción de ROS xeraba a activación da resposta ao dano no ADN. O primeiro paso desta resposta é a activación da quinasa ATM, responsable da fosforilación e mobilización de multitude de substratos, entre eles p53 e NF-κB, ambas

as dúas proteínas actúan como factores de transcrición do xene *PPM1D* que codifica WIP1 (Shen *et al*., 2017). Podemos observar que no noso modelo, os grupos que expresan o oncoxene *H-Ras*^{V12} mostran niveis elevados de WIP1 respecto ao resto de grupos. No grupo *Rb*$^{-/-}$ tamén existe esta proteína posto que, como mencionamos en apartados anteriores, a deleción deste xene supresor tumoral provoca produción de ROS, co subseguinte dano no ADN e activación de DDR. Respecto ao xenotipo, non hai diferenzas evidentes entre *Il6*$^{+/+}$ e *Il6*$^{-/-}$ (Figura 25). A diminución dos niveis de p-p38$^{Thr180/Tyr182}$ e p-p65^{Ser536} coinciden co incremento de WIP1, corroborando o dato de que estas dúas proteínas son dianas desta fosfatasa e que as regula dun xeito negativo. Ao contrario do que sucede cos niveis totais de p38, que non varían entre xenotipos, a súa activación si parece ser dependente de IL6, e o mesmo sucede con p-p65^{Ser536}, cuxos niveis, en xeral, son menores en astrocitos *Il6*$^{-/-}$ (Figura 25). O motivo é porque esta interleuquina activa tanto á quinasa p38 como a NF-κB (Shen *et al*., 2017; Wang *et al*., 2003).

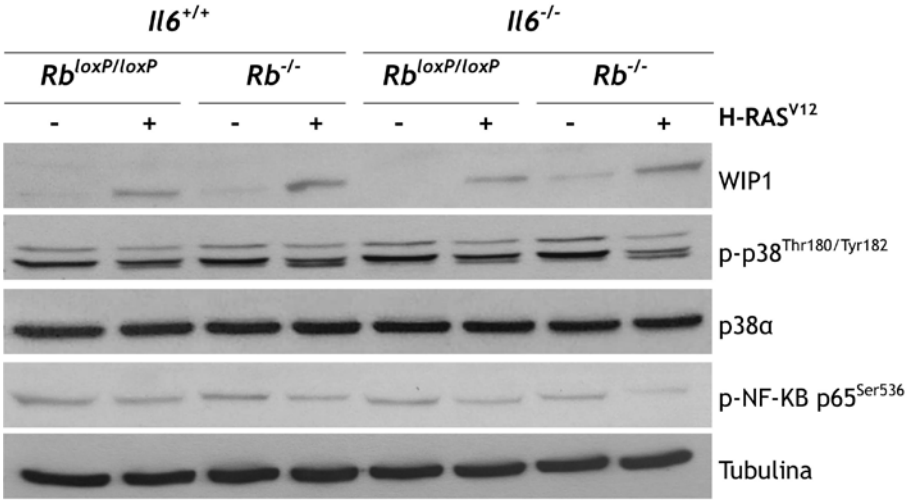


Figura 25| A implicación de IL6 e WIP1 no proceso de desdiferenciación de astrocitos. Análise por *western blot* dos niveis dalgunhas das proteínas implicadas na desdiferenciación en cada un dos grupos de astrocitos de estudo. A extracción de proteína realizouse ao sexto día tras a semente.

Con todos estes datos de desdiferenciación podemos concluír que WIP1 ten un papel clave neste proceso e que IL6 reduce a capacidade de reprogramación.

3.2 CARACTERIZACIÓN DA AUSENCIA DE IL6 EN MEFS *Rb*$^{-/-}$ E/OU *H-Ras*^{V12}: DIMINÚE A PROLIFERACIÓN CELULAR PERO NON AFECTA AOS MECANISMO DE SENESCENCIA E APOPTOSE

O comportamento de fibroblastos fronte á expresión de oncoxenes é diferente ao que exhiben os astrocitos (Seoane *et al*., 2017).

Está descrito que a expresión de *Ras* en fibroblastos desencadea o mecanismo de senescencia a través de p53 e p16^{INK4a}, e que é necesaria a colaboración dun segundo evento oncoxénico, como a activación doutro oncoxene ou a inactivación dun supresor tumoral, para que as células primarias se transformen (Serrano *et al*., 1997). No caso dos astrocitos, Seoane e colaboradores comprobaron que a expresión deste oncoxene é suficiente para conferir un fenotipo transformado e evadir a senescencia (Seoane *et al*., 2008). A activación da senescencia mediada por *H-Ras*^{V12} é consecuencia da sinalización desencadeada polo DDR e xurde como mecanismo de defensa fronte a transformación celular (Di Micco *et al*., 2006). Non obstante, actualmente é ben coñecida a outra faceta da senescencia, a tumoroxénica, e que este rol o exerce a través do SASP, do cal IL6 é un dos factores máis importante (Coppé *et al*. 2008). Son varios os estudos que demostraron o aumento da segregación desta interleuquina por fibroblastos sometidos a OIS. A causa radica nunha activación persistente da resposta ao dano no ADN, principalmente a través da quinasa ATM. Esta activación resulta importante para a segregación de IL6 durante a senescencia (Coppé *et al*., 2010; Rodier *et al*., 2009), citoquina que favorece a proliferación e desdiferenciación celular. O seu bloqueo xurde como barreira fronte ao crecemento tumoral inducido por *Ras* (Ancrile *et al*., 2007; Davalos *et al*., 2010).

Moitos dos traballos dedicados ao estudo de IL6 empregan como modelo celular os fibroblastos, e os resultados obtidos extrapólanse a outros tipos celulares, por exemplo, aos astrocitos. Agora ben, hai que ter en conta que o comportamento dos dous tipos celulares é diferente,

como mencionamos previamente (Seoane *et al*., 2017), o que pode afectar ás conclusións que se extraen.

Como control á nosa investigación sobre o papel de IL6 en astrocitos, quixemos reproducir algúns dos ensaios en MEFs usando as mesmas técnicas e condicións.

O primeiro paso foi a obtención de MEFs a partir do cultivo primario de embrións de rato de 13.5 días. Cada rato foi procesado de maneira independente para proceder, posteriormente, á selección dos $Il6^{-/-}$ e $Il6^{+/+}$ a través do xenotipado por PCR. Igual que con astrocitos, estes MEFs foron infectados cos plásmidos retrovirais que codifican H-RAS^{V12} e CRE e poder conseguir así os oitos grupos de estudo:

$Il6^{+/+}$ $Rb^{loxP/loxP}$	$Il6^{-/-}$ $Rb^{loxP/loxP}$
$Il6^{+/+}$ $Rb^{loxP/loxP}$ $H\text{-}Ras^{V12}$	$Il6^{-/-}$ $Rb^{loxP/loxP}$ $H\text{-}Ras^{V12}$
$Il6^{+/+}$ $Rb^{-/-}$	$Il6^{-/-}$ $Rb^{-/-}$
$Il6^{+/+}$ $Rb^{-/-}$ $H\text{-}Ras^{V12}$	$Il6^{-/-}$ $Rb^{-/-}$ $H\text{-}Ras^{V12}$

O análise de proliferación celular realizouse coa técnica de tinguidura con cristal violeta, pero para iso foi necesario fixar previamente os MEFs con metanol:acético aos días 1, 3, 5 e 7 despois da semente. A tinguidura con cristal violeta tamén permitiu comparar a morfoloxía entres os grupos de fibroblastos de estudo. O ensaio de proliferación, en sintonía co descrito en literatura, demostra que IL6 inflúe positivamente na proliferación celular en condicións tumoroxénicas. O grupo $Il6^{-/-}$ $Rb^{-/-}$ $H\text{-}Ras^{V12}$ mostra un crecemento significativamente menor respecto ao seu control $Il6^{+/+}$ (Figura 26a). Este dato reflexa un dos resultados do estudo de Ancrile e colaboradores: o bloqueo de *IL6* con shARN, en fibroblastos e mioblastos humanos tumoroxénicos pola expresión de RAS^{G12V}, diminúe o tamaño do tumor ata nun 97% respecto ao control (Ancrile *et al*., 2007). Pero é diferente ao que obtivemos no modelo de astrocitos, onde a proliferación dos grupos que expresan o oncoxene non difire entre un xenotipo e outro (Figura 11). Podemos concluír que IL6 exerce un comportamento diferente sobre a proliferación dependendo do contexto celular no que se atopa.

Igual que sucede en astrocitos (Figura 12), en MEFs tampouco hai diferenzas entre $Il6^{+/+}$ e $Il6^{-/-}$ respecto á morfoloxía celular ou á

confluencia que alcanzan as células en cultivo (Figura 26b e 26c). A interleuquina non xoga un papel importante nestes aspectos en ningún dos dous tipos celulares.

O ensaio de senescencia efectuouse a través da medición da actividade SA-β-Gal ao sexta o día tras a semente, e o de apoptose, co análise da morfoloxía dos núcleos tinguidos con Hoechst 33258 (Figura 27a). Respecto á senescencia e á apoptose, a análise non mostrou cambios significativos entre MEFs *Il6*$^{-/-}$ e *Il6*$^{+/+}$ (Figura 27b e 27c). Neste contexto, IL6 si se comporta igual en fibroblastos e astrocitos (Figura 13b e 13c): non ten efectos sobre estes mecanismos de defensa anti-tumoral. Con estes ensaios puidemos detectar, ademais, esa diferenza na porcentaxe de senescencia e apoptose que existe entre os dous tipos celulares. Mentres que os astrocitos evaden estes procesos, os MEFs son máis sensibles á activación dos mesmos. Como consecuencia deste incremento na taxa de senescencia, é probable que os niveis de SASP sexan maiores en fibroblastos que en astrocitos e, por coherencia, tamén os de IL6. Pero aínda sendo o compoñente principal deste tipo de secretoma (Freund *et al*., 2010) esta citoquina non ten efecto sobre a senescencia.

Con todos estes datos, e a comparación cos seus equivalentes en astrocitos, podemos concluír que a participación de IL6 nun ou noutro proceso depende do tipo celular.

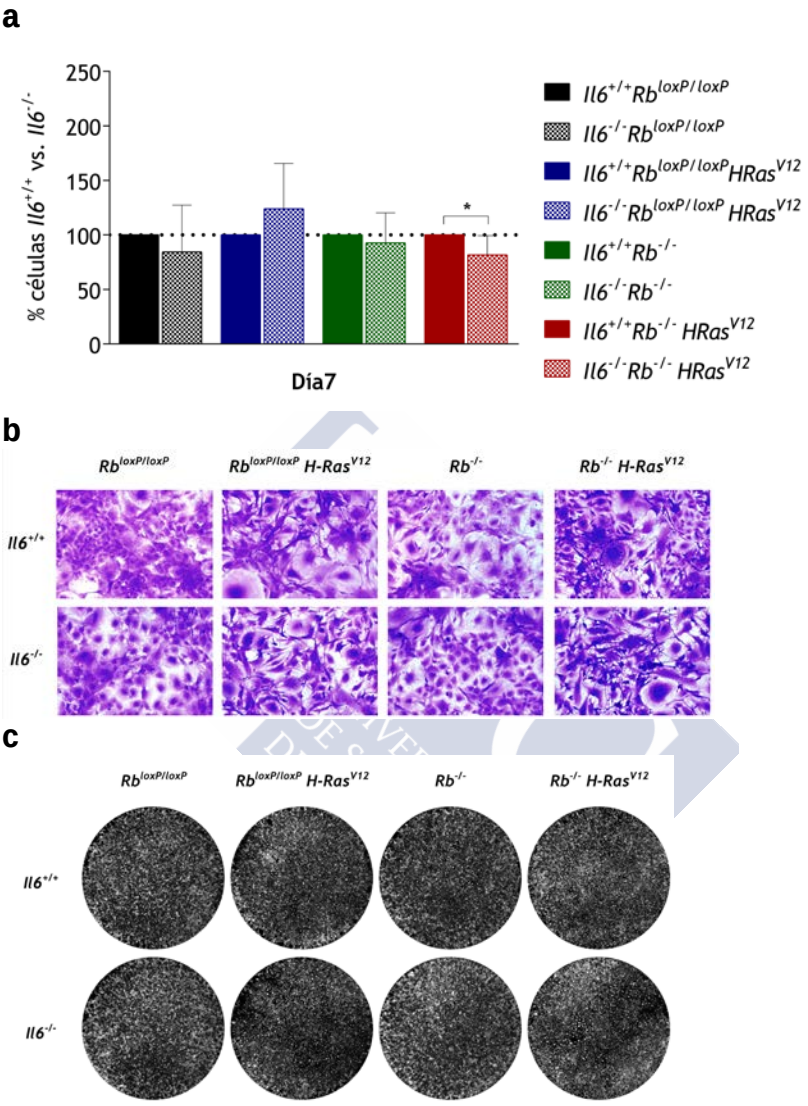


Figura 26| O papel de IL6 na proliferación de MEFs e na adquisición do fenotipo transformado, en presenza de *H-Ras^{V12}* e/ou *Rb*. Para os ensaios empregáronse MEFs fixados ao sétimo día tras a semente e tinguidos con cristal violeta. **a|** Representación da porcentaxe normalizada de células *Il6$^{-/-}$* fronte a *Il6$^{+/+}$* (media ± SD). Os datos analizáronse co test de Mann-Whitney, n=7, * $p < 0,05$ respecto á condición control. **b|** Morfoloxía dos fibroblastos. **c|** Confluencia dos MEFs en placa. Para apreciar mellor as diferenzas realizouse o contraste co programa de procesamento de imaxe dixital *ImageJ*.

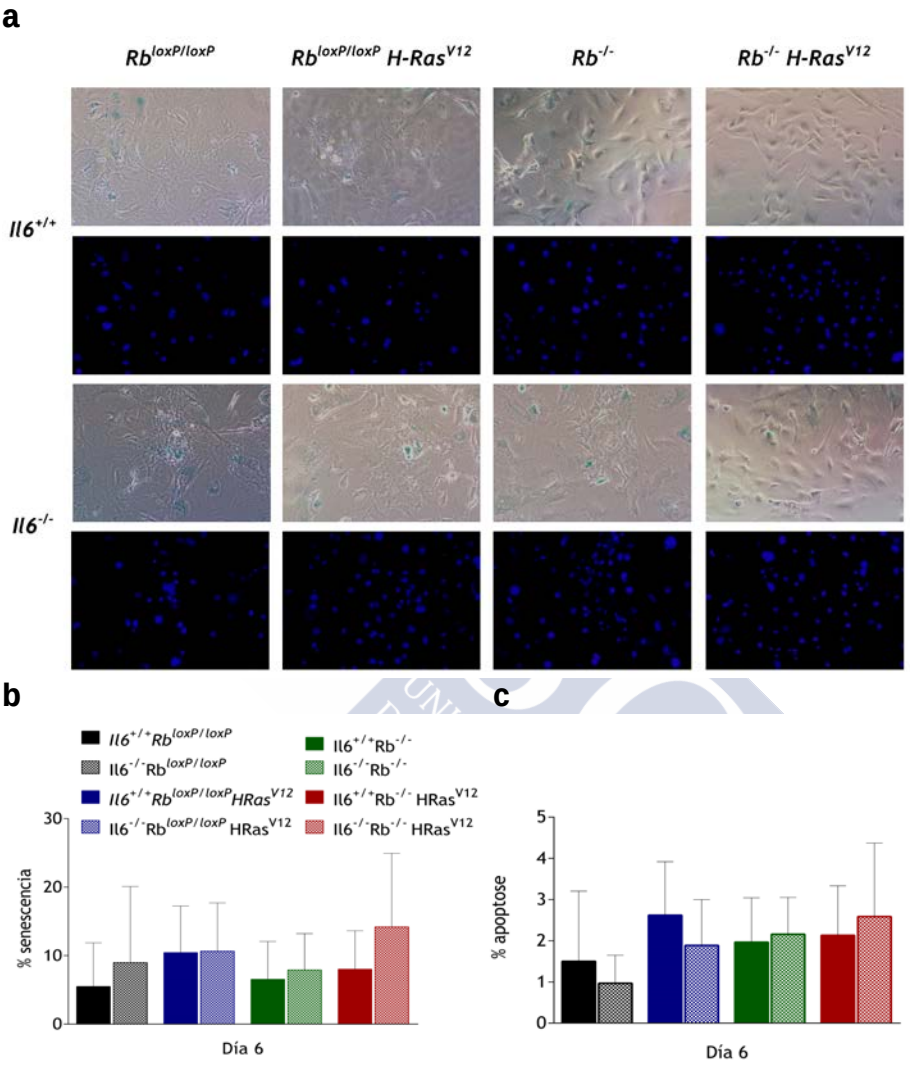


Figura 27| O papel de IL6 nos mecanismos de senescencia e apoptose en MEFs. a| Microfotografías da actividade SA-β-Gal e tinguidura nuclear con Hoechst-33258 dos MEFs ao sexto día tras a semente. **b|** Porcentaxe de células senescentes (media ± SD). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, n=3, * $p < 0,05$ respecto á condición control. **c|** Porcentaxe de células apoptóticas (media ± SD). Os datos foron analizados co test de Mann-Whitney, n=3, * $p < 0,05$ respecto á condición control.

4 VISIÓN XERAL

4.1 TRANSFORMACIÓN CELULAR MEDIADA POR ONCOXENES: DENDE O ESTRÉS CELULAR ATA A DESDIFERENCIACIÓN

En condicións fisiolóxicas normais, os niveis de ROS atópanse estables, manténdose nun equilibrio dinámico modulado por procesos celulares que os producen e que os eliminan (Zhang *et al*., 2016). Está descrito que concentracións baixas de ROS teñen un efecto beneficioso sobre o organismo a través da regulación das vías de sinalización. A fosforilación de proteínas, a activación de factores de transcrición, a apoptose, a inmunidade e a diferenciación celular, son procesos que dependen da súa produción adecuada (Di Meo *et al*. 2016).

A activación de oncoxenes é un paso necesario na transformación celular e no mantemento do cancro. Traballos realizados en fibroblastos mostraron que despois da activación de oncoxenes síguelle unha fase de hiper-replicación transitoria que remata cedéndolle o paso á senescencia (Ogrunc *et al*., 2014). Existen excepcións á regra. Kohsaka e demais membros do equipo atoparon unha pequena poboación de fibroblastos humanos de prepucio (células BJ) coa capacidade de evadir a senescencia inducida por H-RAS (Kohsaka *et al*., 2011), e o traballo de Seoane e colaboradores tamén demostrou que os astrocitos non son sensibles á OIS (Seoane *et al*., 2008). Polo tanto, aínda que a senescencia xurde como mecanismo de defensa fronte á transformación, en ocasións, as células desenvolven estratexias para evitar a súa activación. Por outra parte, a expresión de oncoxenes tamén estimula un aumento da produción de ROS, que actúan como moléculas de sinalización mitoxénica estimulando a proliferación celular (Ogrunc *et al*., 2014). Neste contexto, no que se incrementa a taxa de proliferación e os niveis de ROS, a célula acaba sufrindo un estrés replicativo e un estrés oxidativo. En relación a este último, comentamos que se trata dunha consecuencia da activación de oncoxenes pero é necesario mencionar que, entre os dous fenómenos existe unha relación de *feedback* positivo: o estrés oxidativo tamén pode favorecer a activación de oncoxenes (Pizzino *et al*., 2017).

O estrés oxidativo é, polo tanto, o resultado dun exceso de ROS xurdido polo desaxuste entre a súa formación e a capacidade da célula

para eliminalos. O incremento destas moléculas ten consecuencias deleterias para o organismo, afectando negativamente a varias estruturas celulares, como lípidos, e como consecuencia tamén membranas, proteínas, lipoproteínas e ácidos nucleicos. É responsable dunha gran variedade de modificacións na estrutura no ADN, que teñen como base o dano da molécula a través da oxidación directa das súas bases nitroxenadas e esqueleto de azucre, a alteración do entrecruzamento do ADN coas proteínas e a rotura da cadea deixando ocos libres de bases nitroxenadas (Ogrunc *et al*., 2014; Pizzino *et al*., 2017).

O estrés replicativo pode xurdir por distintos motivos. Por un lado temos o efecto de ROS, que ao danar o ADN, e este ser empregado na fase de replicación como molde para a síntese da nova cadea complementaria, pode desencadear o estrés. E por outro, a propia activación do oncoxene pode interferir no mecanismo de replicación de diversas maneiras: aumentando ou diminuíndo a actividade da CDK2, ou desaxustando as vías de sinalización de p53 e/ou RB/E2F. A consecuencia final é o estrés replicativo, ben porque se produce un uso excesivo da orixe de replicación, un uso insuficiente ou unha re-utilización do mesmo. Estas alteracións impiden a ligazón do ADN mediada pola ADN topoisomerasa I, formando un complexo de escisión que atrapa o enzima. A forcada de replicación, que vén avanzando por detrás da topoisomerasa, colisiona co enzima, que está unida covalentemente ao ADN, e paralízase a extensión da cadea principal no extremo 5’ da cadea molde. Cando a maquinaria de replicación atopa a lesión que bloquea o proceso de replicación, a ADN polimerasa detense. A molécula de ADN forma unha estrutura en Y que é recoñecida por endonucleasas específicas, responsables de xerar un corte na cadea molde e inducir un DSB cerca da lesión que bloquea a replicación (Hills & Diffley, 2014; Ohnishi *et al*., 2009).

Como puidemos comprobar ata o momento, tanto o estrés oxidativo como o replicativo son causas de DSBs (Hills & Diffley, 2014; Pizzino *et al*., 2017). Unha lesión citotóxica que é necesario reparar exercendo o mínimo impacto sobre a estabilidade do xenoma. Xurde así unha complexa resposta de dano no ADN, que comeza coa reorganización espacial de proteínas de reparación e sinalización nunha

estrutura coñecida como foco inducido por radiación ionizante (IR), que rodea o lugar da DSB. Este concepto, foco inducido por IR, fai referencia á asociación destas proteínas no sitio DSB aínda que a rotura sexa provocada por estímulos distintos á radiación ionizante. A formación destes focos dependen fundamentalmente da fosforilación de H2AX mediada por ATM e outras proteínas quinasas dependentes de ADN (ADN-PK). A proteína γ-H2AX actúa como plataforma de unión para a proteína MDC1 e doutras como 53BP1, NBS1 e BRCA1. O complexo MRN tamén co-localiza no foco de dano e serve para recrutar a quinasa ATM, que en condicións normais atópase formando dímeros/oligómeros inactivos pero tras unha DSB, adopta a capacidade de autofosforilarse e disociarse en monómeros para alcanza a súa máxima activación. Ademais da activación da quinasa CHK2, ATM, en conxunto co complexo MRN, media a resección da DSB formándose, como resultado, unha estrutura intermedia de reparación consistente nunha cadea sinxela de ADN capaz de activar a quinasa ATR. Deste xeito, ATM/CHK2 e ATR/CHK1 son as principais vías de DDR responsables de coordinar o proceso de reparación do ADN e a progresión a través do ciclo celular (Dai & Grant, 2010; Ohnishi *et al*., 2009; Yan *et al*., 2014). CHK1 e CHK2 son os autores das fosforilacións de proteínas efectoras involucradas en *checkpoints*, outros mecanismos de DDR, reparación do ADN, apoptose e remodelación da cromatina. Dúas destas proteínas efectoras son p53 e Cdc25. CHK1 e CHK2 fosforilan tanto p53 como a E3-ubiquitín-ligase MDM2, e en ambos casos o resultado final é o mesmo: a estabilización da proteína supresora tumoral. No caso das Cdc25s (A, B e C), que son fosfatasas especializadas que activan a CDK1 e CDK2 a través da eliminación dos grupos fosfato do sitio inhibidor, cando son fosforiladas degrádanse. Esta inactivación, en conxunto coa acumulación de p53, deteñen a progresión do ciclo celular (Dai & Grant, 2010). A partir de aquí comeza a reparación da DSB, que pode levarse a cabo a través de dúas vías diferentes: a recombinación homóloga (HR) e a unión non-homóloga (NHEJ; Ohnishi *et al*. 2009).

Cabe mencionar que a quinasa ATM tamén media a fosforilación de NF-κB (Centurione & Aiello, 2016).

O estrés oxidativo tamén promove a activación de p38MAPK, proteína mediadora da morte celular. A quinasa p38 mantense recrutada no citosol a través dunha forte asociación con MAPKAP-quinasa 2 (MAPKAPK2). Cando se produce a rotura da dobre cadea xérase un estímulo que fosforila p38MAPK provocando un cambio na súa conformación. Esta modificación rompe a súa interacción con MAPKAPK2 e favorece o seu traslado ao núcleo, onde media a fosforilación de dianas, como p53 e Cdc25, involucradas na indución de *checkpoints* da fase G2/M do ciclo celular e promover, así, a reparación do ADN. Está descrito que este traslado ao núcleo prodúcese especificamente como resposta ao estímulo xurdido por unha DSB, e que calquera outro estímulo capaz de activar p38MAPK non ten ese potencial. É importante mencionar tamén aquí que está descrito que a activación de p38MAPK favorece a diferenciación celular (Wood *et al*., 2009).

Outra proteína asociada coa regulación do estrés oxidativo é a serina/treonina fosfatasa WIP1, membro da familia de proteínas fosfatasas de tipo 2C (PP2C). É a responsable da defosforilación e, como consecuencia, da inactivación das proteínas p53, p38MAPK, ATM, CHK1 e CHK2. Debido a súa implicación con proteínas da DDR, a súa función garda unha correlación coa abolición dos *checkpoints* do ciclo celular. No caso de p53 xoga un dobre papel. Non só elimina o grupo fosfato da serina 15 desta proteína, senón que tamén media a súa degradación a través de MDM2. WIP1 interacciona e defosforila MDM2, mecanismo polo que esta E3-ubiquitín-ligase aumenta a súa estabilidade e afinidade por p53. MDM2 ubiquitina a p53 comprometendo o destino desta proteína á degradación proteosomal (Lu *et al*., 2007). Outra proteína diana de WIP1 é NF-κB, sobre a cal actúa como regulador negativo da súa sinalización a través de dúas vías. Unha vía indirecta a través de p38MAPK, activador de NF-κB: ao inhibir a función de p38 tamén o fai coa de NF-κB; e unha vía directa (independente de p38MAPK) por medio da súa capacidade de eliminar directamente o grupo fosfato da serina 536 da subunidade p65. Esta fosforilación resulta esencial para que NF-κB poida realizar a súa función de transactivación pois é, a través dela, que se recrutan factores modificadores de cromatina, como p300, ao promotor de NF-κB e se

favorece a transcrición de xenes diana (Chew *et al*., 2009). Entre os xenes diana de NF-κB atopamos a DOT1L, un enzima responsable de engadir grupos metilo á lisina 79 da histona H3. Estas modificacións epixenéticas son importantes durante a transición dunha célula dende o seu estado diferenciado de volta cara a pluripotencialidade. A inhibición de DOT1L favorece a desdiferenciación, porque diminúe os niveis da marcaxe H3K79me2 daqueles xenes cuxo silenciamento é necesario para a reprogramación (Onder *et al*. 2012; Soria-Valles *et al*. 2015).

En resumo: A expresión do oncoxene *H-Ras*^{V12} implica, por un lado, un incremento da expresión de ROS e, como consecuencia, un estrés oxidativo; e por outro, unha hiper-proliferación celular que deriva nun estrés replicativo. Ambas consecuencias desencadean a activación do DDR e, como parte desta resposta, tamén a activación de p53. Este supresor tumoral é responsable da activación de WIP1 que, a súa vez, diminúe a activación de NF-κB, tanto a través da inhibición de p38MAPK como directamente por defosforilación de p65. O bloqueo deste factor de transcrición diminúe a expresión do xene DOT1, resultando na redución do marcaxe H3K79me2 daqueles xenes que deben permanecer silenciados durante a reprogramación, e favorecendo o proceso de desdiferenciación celular (Figura 28).

É importante ter en conta en todo momento que cando estamos a falar de activación ou inhibición dunha vía, no conxunto da célula, non estamos a falar dun 'todo ou nada' senón que é unha cuestión de niveis. Por exemplo, WIP1 defosforila (inactiva) p65 pero ao mesmo tempo existe fosforilación (activación) desta subunidade de NF-κB por parte de ATM. Segundo cal dos procesos pese máis, nun contexto ou noutro, predominará máis p65 ou p-p65^{Ser536} e, en base a isto, darase unha maior ou menor expresión de DOT1L e, como consecuencia, un maior ou menor grao de reprogramación. Será importante ter en mente isto cando se explique os efectos da ausencia de IL6 no entorno.

O proceso de desdiferenciación durante a transformación celular favorece o desenvolvemento e a progresión tumoral. É posible observar, na masa tumoral, como a medida que evoluciona vai aumentando a expresión de marcadores propios de células nai/proxenitoras, como SOX2 ou Nestina, en detrimento de marcadores de diferenciación.

Nesta fase é importante destacar o papel que exerce o microambiente. Este debe ser permisivo para soster, por un lado, células tumorais diferenciadas e, por outro, células en estado *stemness*. A capacidade de reprogramación que adquiren as células cancerosas ten un forte impacto negativo en clínica no caso de gliomas, onde a taxa de recorrencia tras un tratamento inicial é moi elevada; e é que calquera célula tumoral non erradicada pode continuar proliferando e inducir a formación dun novo tumor.

4.1.1 A implicación de IL6

En toda a historia relatada ata o momento, vai implícito os efectos que IL6 exerce sobre determinadas moléculas ou vías de sinalización (Figura 28).

O promotor do xene de *IL6* contén múltiples elementos reguladores e entre eles está ARE, elemento de resposta antioxidante. É normal atopar ARE en rexións promotoras de xenes involucrados na detoxificación en fase II, así como naqueles que codifican enzimas antioxidantes. Pero a presenza deste elemento no promotor dun xene que codifica unha proteína que non é nin antioxidante nin un enzima detoxificante, levou a contemplar a IL6 como molécula protectora fronte ao estrés oxidativo (Wruck *et al*., 2011). Incluso como factor neuroprotector (Penkowa, et al., 2000). O activador máis potente da transcrición dependente de ARE é NRF2. Este factor de transcrición é sensible ao redox e descríbese tamén como axente citoprotector fronte ao estrés oxidativo, unha función que se lle atribúe, en parte, por IL6, posto que NRF2 activa a transcrición desta interleuquina (Wruck *et al*., 2011). En condicións fisiolóxicas normais, NRF2 atópase maioritariamente no citoplasma celular, asociado ao seu inhibidor KEAP1. Esta proteína tamén recruta e interacciona con cullin-3 E3-ubiquitin ligase (CUL3), responsable da ubiquitinización de NRF2 e a súa posterior degradación proteosomal. En condicións oxidativas, cando os niveis de ROS intracelulares se incrementan, prodúcese a disociación entre KEAP1 e NRF2 a través de dous posibles mecanismos, que poden cooperar de forma conxunta: por un lado, residuos específicos de cisteína de KEAP1, importantes para a súa activación, son oxidados; por outra parte, prodúcese a activación de

quinasas que fosforilan NRF2, entre elas PKC, MAPK (ERK, JNK e p38), PI3K e PERK. A liberación do factor de transcrición permite o seu traslado ao núcleo onde dimeriza coa proteína MAF, asóciase ao ARE presente en promotores de determinados xenes, entre eles *IL6*, e activa a súa tradución (Keum *et al*., 2003; Wruck *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2016). Polo tanto, o incremento de ROS provoca un aumento dos niveis de IL6 para contrarrestar o estrés oxidativo, posto que esta interleuquina, a través da vía de STAT3, é capaz de regular a función da cadea de transporte de electróns das mitocondrias e axustar os niveis de ROS (Kitajima *et al*., 2017). Nun contexto oncoxénico no que se disparan os niveis de ROS, debido á expresión de oncoxenes e/ou a perda de supresores tumorais, IL6 deixa de ser un factor protector fronte ao estrés oxidativo (Figura 14 e 15) para cooperar na activación do oncoxene (Figura 18; Rowley & Van Ness 2002).

Esta interleuquina tamén participa na DDR. Colabora na regulación das principais moléculas de reparación do ADN, como son ATM e CHK1 (Figura 18). Respecto a ATM, o efecto de IL6 é dobre porque modula directamente a transcrición desta quinasa, aumentando a súa expresión, como tamén pode influír sobre as vías de sinalización que activan ATM, como son as vías de AKT e ERK (Centurione & Aiello, 2016; Chen *et al*., 2015; Hein *et al*., 2014). Existen traballos que relacionan a activación da vía AKT (Nishikai-Yan Shen *et al*., 2017) e a sinalización MAPK/ERK (Yun *et al*., 2018) con IL6. No caso de CHK1, a interleuquina pode mediar a activación desta quinasa transductora a través de c-MYC. IL6 estimula a tradución de c-MYC (Shi *et al*., 2011) que, a súa vez, activa a transcrición de CHK1 ao unirse directamente ao seu promotor (Wang *et al*., 2013).

IL6 tamén participa na activación de p38MAPK (Nishikai-Yan Shen *et al*., 2017) e NF-κB (Figura 25; Wang *et al*. 2003).

A nivel de microambiente, a devandita interleuquina estimula o crecemento tumoral (Ancrile *et al*., 2007; Weissenberger *et al*., 2004). Un efecto que se fai moito máis evidente en individuos machos debido aos elevados niveis de IL6 que mostran con respecto aos individuos femias (Figura 7; Naugler *et al*. 2007; Caetano *et al*. 2018; Mosteiro *et al*. 2018). Esta diferenza nos niveis da interleuquina debidas ao sexo veñen determinadas polos niveis de estróxenos. Estas hormonas

sexuais, fundamentalmente femininas, exercen a súa función a través dos seus receptores intracelulares específicos. A interacción entre a hormona e o receptor provoca un cambio na conformación deste último, o que promove a súa dimerización e traslado ao núcleo. É nesta organela onde se establece a relación estróxenos-IL6, porque ER bloquea directamente a unión de NF-κB ao promotor de IL6 inhibindo, deste xeito, a expresión da interleuquina (Kalaitzidis & Gilmore, 2005).

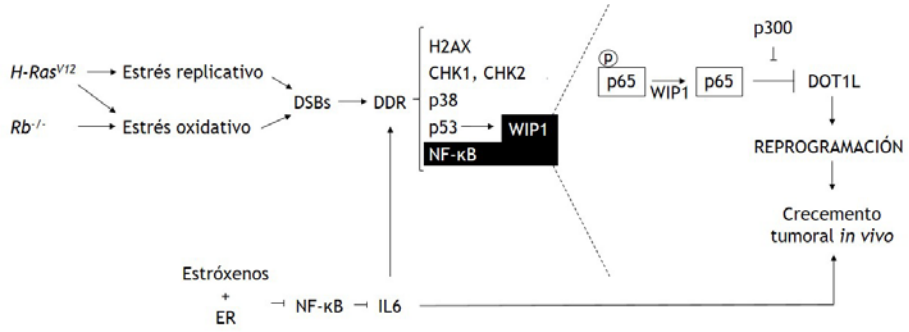


Figura 28| Visión xeral da tumoroxénese no modelo de glioma. Eventos oncoxénicos provocan estrés celular, que causa danos no ADN e activa a DDR. O estrés tamén incrementa os niveis de WIP1, fosfatasa responsable da inactivación de NF-κB. A redución deste factor de transcrición diminúe os niveis de DOT1L e, como consecuencia, actívase o programa de reprogramación. Isto favorece o crecemento tumoral *in vivo*. IL6 participa neste crecemento tumoral, así como na cooperación da activación da DDR e a moderación do proceso de desdiferenciación. Os estróxenos, a través da unión ao seu receptor específico, bloquean a expresión de IL6 e, con elo, frea a progresión do cancro.

4.1.2 Cal é a consecuencia de eliminar IL6 da ecuación

En primeiro lugar, en condicións fisiolóxicas normais, a célula perde a protección fronte ao estrés oxidativo. A regulación da cadea de transporte electrónico de mitocondrias mediado por IL6 para re-axustar os niveis de ROS, non existe (Figura 14 e 15). En condicións tumoroxénicas, os niveis de activación de H-RAS^{V12} e, como consecuencia, tamén o seu impacto sobre a célula (menos DSBs, detectado a través de γ-H2AX) diminúen pola falta de cooperación da interleuquina (Figura 18).

Ao non existir IL6, a activación do DDR decrece. Reduciríanse os niveis de expresión da quinasa ATM. Os niveis da proteína c-MYC

tamén decaerían e, como consecuencia, aparece reducida a activación de CHK1 (Figura 18).

Os niveis de activación de p38MAPK vense afectados negativamente pola ausencia de IL6. Igual que os de NF-κB, pero neste caso por unha dobre vía: a través da redución da expresión de ATM, e pola falta do efecto directo que exerce a interleuquina sobre o factor de transcrición (Figura 25).

Os niveis de p53 redúcense lixeiramente e a activación de WIP1 non se ve afectada pola ausencia de IL6 (Figura 18 e 25). Que os niveis desta fosfatasa non se vexan reducidos significa que a súa actuación sobre as proteínas diana segue a ser a mesma, a pesar de que, por outra parte, a activación das mesmas si se vexa afectada (como xa vimos, restrinxida). Respecto ao eixe WIP1/NF-κB/Reprogramación, e retomando de novo a idea do balance de p-p65^{Ser536}/p65, a falta de IL6 implica unha diminución dos niveis de p-p65^{Ser536} *per se*, consecuencia á que hai que sumarlle o efecto de WIP1, que continúa eliminando o grupo fosfato da serina 536 aumentando a cantidade de p65. Neste contexto, no que os niveis de p65 respecto a p-p65^{Ser536} son maiores do que eran en presenza de IL6, a expresión de DOT1L redúcese aínda máis o que, a súa vez, supón unha maior caída da marcaxe H3K79me2 e un aumento do grao de desdiferenciación (Figura 21).

A nivel de microambiente, a ausencia de IL6 diminúe o crecemento tumoral. En machos *Il6*$^{-/-}$ o crecemento do tumor é comparable ao que sucede en femias *Il6*$^{+/+}$ que, como xa mencionamos previamente, presentan niveis máis baixos desta interleuquina. Nelas, a carencia de IL6 non ten un impacto tan forte na redución da progresión do cancro (Figura 7).

4.2 POSIBLE ABORDAXE TERAPÉUTICA

Despois deste estudo podemos demostrar que o comportamento célula-autónomo de IL6 se contradí co seu efecto a nivel de microambiente. Podemos observar como a ausencia de IL6 desencadea unhas serie de eventos que acaban nun maior grao de reprogramación celular respecto ao que sucede na súa presenza. Unha maior desdiferenciación é sinónimo dunha maior capacidade tumoroxénica da

célula. Pola contra, a súa falta no microambiente ten un efecto oposto ao tumoroxénico: mitiga o crecemento tumoral.

Se temos en conta este estudo para unha posible futura terapia contra o GB, a estratexia máis adecuada a empregar sería un tratamento combinado que bloquease IL6 do microambiente e STAT3 en células tumorais. Existen anticorpos contra IL6 e IL6R aprobados pola FDA, siltuximab e tocilizumab, que se están empregando no tratamento da enfermidade de Castelman e a artrite reumatoide, e que actualmente están sometidos a unha avaliación clínica para o seu uso contra cancros sólidos e hematolóxicos (Johnson *et al*., 2018). Se temos en conta os resultados arroxados polo experimento *in vivo* (Figura 7), este tratamento sería efectivo nun estadio avanzado do tumor, posto que é o momento no que IL6 parece contribuír positivamente á progresión tumoral. Nun contexto de glioma de baixo grao, a interleuquina non exerce un papel activo no crecemento tumoral, polo que o seu bloqueo resultaría pouco efectivo.

A proteína STAT3 é a mediadora dos efectos de IL6. Pero non só dela, senón dunha variedade máis de moléculas, entre as que hai outras citoquinas e tamén factores de crecemento. Polo tanto, o bloqueo de IL6 non supón a inactivación total de STAT3 porque hai máis factores implicados, motivo polo que unha mellor abordaxe terapéutica sería un ataque directo a esta proteína. Facer fronte ao bloqueo de STAT3 parece ser unha tarefa complexa por tratarse dun factor de transcrición sen actividade enzimática, no entanto, existen xa algúns axentes específicos na fase temperá de ensaios clínicos (Johnson *et al*., 2018). Non obstante, resulta fundamental definir adecuadamente a intervención terapéutica porque, en termos de funcións de STAT3, existe disparidade de resultados. Hai traballos que mostran a necesidade desta proteína para o desenvolvemento temperá do cancro de pel, fígado e páncreas, entre outros; mentres que outras investigacións, entre elas en cerebro, mama ou pulmón, van encamiñadas cara unha acción de supresor tumoral. Isto suxire que existen mecanismos dependentes do contexto (tecido, oncoxene activado e/ou estadio do cancro) escondidos baixo os diferentes papeis que interpreta STAT3 en oncoxénese. É importante definir os parámetros específicos do contexto para sacar o máximo proveito da terapia (D'amico *et al*., 2018). En base aos nosos resultados

(Figura 18), o emprego destes axentes terapéuticos en GB parece máis recomendable en fase temperá do desenvolvemento tumoral, cando os niveis de proteína STAT3 e a súa activación son maiores; e desaconsellables nun estadio tardío, porque a diminución da activación de STAT3 vai en relación cunha maior capacidade de reprogramación celular e, como consecuencia, cunha maior malignidade.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIÓNS

IL6 exerce un importante papel a nivel do microambiente, promovendo o crecemento tumoral. O seu bloqueo reduce a progresión do cancro.

IL6 participa na estimulación da DDR a través da activación de compoñentes da vía, como CHK1 e p53.

A expresión de *H-Ras*^{V12} en astrocitos favorece a súa desdiferenciación. Neste contexto, WIP1 xurde como mediador da reprogramación celular mentres que IL6, a través de STAT3, modera dito proceso**.**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., *et al*. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*, *502*(7471), 340–345.

Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., *et al*. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, *15*(8), 978–990.

Aiello, N. M., & Stanger, B. Z. (2016). Echoes of the embryo: using the developmental biology toolkit to study cancer. *Disease Models & Mechanisms*, *9*(2), 105–114.

Alonso, M. M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., *et al*. (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS ONE*, *6*(11), e26740.

Ancrile, B., Lim, K. H., & Counter, C. M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes and Development*, *21*(14), 1714–1719.

Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G., & Schiffer, D. (2011). SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics & Proteomics*, *8*(3), 139–47.

Aredia, F., Guamán Ortiz, L. M., Giansanti, V., & Scovassi, A. I. (2012). Autophagy and Cancer. *Cells*, *1*(3), 520–534.

Armstrong, C. A., Murray, N., Kennedy, M., Koppula, S. V., Tara, D., & Ansel, J. C. (1994). Melanoma-derived interleukin 6 inhibits in vivo melanoma growth. *Journal of Investigative Dermatology*, *102*(3), 278–284.

Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R., Sengupta, S., *et al*. (2011). $Sox2^{+}$ adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, *9*(4), 317–329.

Asslaber, M., Schauer, S., Gogg-Kamerer, M., Bernhart, E., Quehenberger, F., & Haybaeck, J. (2017). Native oligodendrocytes in astrocytomas might inhibit tumor proliferation by wif1 expression. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *76*(1), 16–26.

Backes, C. S., Friedmann, K. S., Mang, S., Knörck, A., Hoth, M., & Kummerow, C. (2018). Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(42), 16348–16363.

Baker, D. J., Alimirah, F., van Deursen, J. M., Campisi, J., & Hildesheim, J. (2017). Oncogenic senescence: a multi-functional perspective. *Oncotarget*, *8*(16), 27661–27672.

Baratta, M. G. (2018). STAT3's true colours. *Nature Reviews Cancer*, *18*(11), 664–665.

Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., & Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence : roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO Journal*, *22*(16), 4212–4222.

Ben-Neriah, Y., & Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nature Immunology*, *12*(8), 715–723.

Bhaumik, D., Scott, G. K., Schokrpur, S., Patil, C. K., Orjalo, A. V., Rodier, F., *et al*. (2009). MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging*, *1*(4), 402–411.

Bian, S., Repic, M., Guo, Z., Kavirayani, A., Burkard, T., Bagley, J. A., *et al*. (2018). Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nature Methods*, *15*(8), 631–639.

Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J. S., Davis, F. G., Il'yasova, D., *et al*. (2008). Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, *113*(7), 1953–1968.

Boulanger, M. J. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 -Receptor/gp130 Complex. *Science*, *300*(5628), 2101–2104.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–54.

Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., & Toder, V. (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *16*(10), 512–519.

Broekman, M. L., Maas, S. L. N., Abels, E. R., Mempel, T. R., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nature Reviews Neurology*, *14*(8), 482–495.

Burger, R. (2013). Impact of Interleukin-6 in hematological malignancies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *40*(5), 336–343.

Byun, J. S., & Gardner, K. (2013). Wounds that will not heal: Pervasive cellular reprogramming in cancer. *American Journal of Pathology*, *182*(4), 1055–1064.

Caetano, M. S., Hassane, M., Van, H. T., Bugarin, E., Cumpian, A. M., McDowell, C. L., *et al*. (2018). Sex specific function of epithelial STAT3 signaling in pathogenesis of K-ras mutant lung cancer. *Nature Communications*, *9*(1), 4589.

Caetano, M. S., Van, H., Bugarin, E., Cumpian, A., Mcdowell, C. L., Zhang, H., *et al*. (2017). Gender specific function of epithelial IL-6-STAT3 pathway in K-ras mutant lung cancer. In *American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017* (Vol. 77, p. 3974). Washington, DC. Philadelphia.

Caetano, M. S., Zhang, H., Cumpian, A. M., Gong, L., Unver, N., Ostrin, E. J., *et al*. (2016). IL6 blockade reprograms the lung tumor microenvironment to limit the development and progression of K-ras-mutant lung cancer. *Cancer Research*, *76*(11), 3189–3199.

Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, *380*(6569), 64–66.

Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., & Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, *132*(5), 885–896.

Centurione, L., & Aiello, F. B. (2016). DNA repair and cytokines: TGF-β, IL-6, and Thrombopoietin as different biomarkers of radioresistance. *Frontiers in Oncology*, *6*, 175.

Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R., & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*, *6*(1), 15–25.

Che, Q., Liu, B. Y., Wang, F. Y., He, Y. Y., Lu, W., Liao, Y., *et al*. (2014). Interleukin 6 promotes endometrial cancer growth through an autocrine feedback loop involving ERK-NF-κB signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *446*(1), 167–172.

Chen, L., Wang, S., Wang, Y., Zhang, W., Ma, K., Hu, C., *et al*. (2018). IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*, *9*(25), 17443–17454.

Chen, Y. T., & Bradley, A. (2000). A new positive/negative selectable marker, puDeltatk, for use in embryonic stem cells. *Genesis*, *28*(1), 31–36.

Chen, Y., Zhang, F., Tsai, Y., Yang, X., Yang, L., Duan, S., *et al*. (2015). IL-6 signaling promotes DNA repair and prevents apoptosis in CD133+ stem-like cells of lung cancer after radiation. *Radiation Oncology*, *10*(1), 227.

Chew, J., Biswas, S., Shreeram, S., Humaidi, M., Wong, E. T., Dhillion, M. K., *et al*. (2009). WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-κB signalling. *Nature Cell Biology*, *11*(5), 659–666.

Chiaradonna, F., Gaglio, D., Vanoni, M., & Alberghina, L. (2006). Expression of transforming K-Ras oncogene affects mitochondrial function and morphology in mouse fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1757*(9–10), 1338–1356.

Choudhary, M. M., France, T. J., Teknos, T. N., & Kumar, P. (2016). Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. *World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, *2*(2), 90–97.

Cofre, J., & Abdelhay, E. (2017). Cancer is to embryology as mutation is to genetics: Hypothesis of the cancer as embryological phenomenon. *The Scientific World Journal*, *2017*, 1–17.

Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology*, *5*(1), 99–118.

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., *et al*. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12), 2853–68.

Culig, Z. (2014). Proinflammatory cytokine interleukin-6 in prostate carcinogenesis. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, *2*(3), 231–8.

Culig, Z., & Puhr, M. (2018). Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *462*, 25–30.

D'amico, S., Shi, J., Martin, B. L., Crawford, H. C., Petrenko, O., & Reich, N. C. (2018). STAT3 is a master regulator of epithelial identity and KRAS-driven tumorigenesis. *Genes and Development*, *32*(17–18), 1175–1187.

Dai, Y., & Grant, S. (2010). New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clinical Cancer Research*, *16*(2), 376–83.

Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–18.

Davalos, A. R., Coppe, J. P., Campisi, J., & Desprez, P. Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, *29*(2), 273–283.

Davis, M. (2016). Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, *20*(5), S2–S8.

De Kumar, B., Parker, H. J., Parrish, M. E., Lange, J. J., Slaughter, B. D., Unruh, J. R., *et al*. (2017). Dynamic regulation of Nanog and stem cell-signaling pathways by Hoxa1 during early neuro-ectodermal differentiation of ES cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(23), 5838–5845.

de Visser, K. E., & Coussens, L. M. (2006). The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. In *Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis* (Vol. 13, pp. 118–137).

Degeorges, A., Tatoud, R., Fauvel-Lafeve, F., Podgorniak, M. P., Millot, G., de Cremoux, P., & Calvo, F. (1996). Stromal cells from human benign prostate hyperplasia produce a growth-inhibitory factor for LNCaP prostate cancer cells, identified as interleukin-6. *International Journal of Cancer*, *68*(2), 207–14.

Dezonne, R. S., Sartore, R. C., Nascimento, J. M., Saia-Cereda, V. M., Romão, L. F., Alves-Leon, S. V., *et al*. (2017). Derivation of functional human astrocytes from cerebral organoids. *Scientific Reports*, *7*(1), 45091.

Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Harmful and beneficial role of ROS. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., *et al*. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, *444*(7119), 638–642.

Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(5), 297–306.

Dunn, G. P., Rinne, M. L., Wykosky, J., Genovese, G., Quayle, S. N., Dunn, I. F., *et al*. (2012). Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes and Development*, *26*(8), 756–784.

Dvorak, H. F. (1986). Tumors: Wounds that do not heal. *The New England Journal of Medicine*, *315*(26), 1650–1659.

Dvorak, H. F. (2015). Tumors : Wounds that do not heal--Redux. *Cancer Immunology Research*, *3*(1), 1–11.

Eulenfeld, R., Dittrich, A., Khouri, C., Müller, P. J., Mütze, B., Wolf, A., & Schaper, F. (2012). Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *European Journal of Cell Biology*, 91(6-7), 486-495.

Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, *7*(5), 1016–1036.

Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., De Hoon, M., Anelli, V., *et al*. (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*, *488*(7410), 231–235.

Frattini, V., Trifonov, V., Chan, J. M., Castano, A., Lia, M., Abate, F., *et al*. (2013). The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nature Genetics*, *45*(10), 1141–1149.

Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: Causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(5), 238–246.

Freund, A., Patil, C. K., & Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO Journal*, *30*(8), 1536–1548.

Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., *et al*. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, *338*(6110), 1080–1084.

Friedmann-Morvinski, D., & Verma, I. M. (2014). Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells. *EMBO Reports*, *15*(3), 244–253.

Fu, X. L., Duan, W., Su, C. Y., Mao, F. Y., Lv, Y. P., Teng, Y. S., *et al*. (2017). Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression. *Cancer Immunology Immunotherapy*, *66*(12), 1597–1608.

Gabrusiewicz, K., Hossain, M. B., Cortes-Santiago, N., Fan, X., Kaminska, B., Marini, F. C., *et al*. (2015). Macrophage ablation reduces M2-like populations and jeopardizes tumor growth in a MAFIA-based glioma model. *Neoplasia*, *17*(4), 374–384.

Galvão, R. P., & Zong, H. (2013). Inflammation and gliomagenesis: Bi-directional communication at early and late stages of tumor progression. *Current Pathobiology Reports*, *1*(1), 19–28.

Garbers, C., Heink, S., Korn, T., & Rose-John, S. (2018). Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(6), 395–412.

Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell*, *128*(4), 635–638.

Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, *481*(7381), 306–313.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899.

Guan, X., Hasan, M. N., Maniar, S., Jia, W., & Sun, D. (2018). Reactive astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Molecular Neurobiology*, *55*(8), 6927–6938.

Gurdon, J. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal Embryology and Experimental Morphology*, *10*, 622–640.

Gyamfi, J., Eom, M., Koo, J. S., & Choi, J. (2018). Multifaceted roles of interleukin-6 in adipocyte–breast cancer cell interaction. *Translational Oncology*, *11*(2), 275–285.

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(9), 505–513.

Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, *21*(3), 309–322.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–74.

Hein, A. L., Ouellette, M. M., & Yan, Y. (2014). Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival. *International Journal of Oncology*, *45*(5), 1813–1819.

Heink, S., Yogev, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., *et al*. (2017). Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T_H 17 cells. *Nature Immunology*, *18*(1), 74–85.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, *374*(1), 1–20.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical Journal*, *334*, 297–314.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of cellular senescence. *Trends in Cell Biology*, *28*(6), 436–453.

Hide, T., Komohara, Y., Miyasato, Y., Nakamura, H., Makino, K., Takeya, M., *et al*. (2018). Oligodendrocyte progenitor cells and macrophages/microglia produce glioma stem cell niches at the tumor border. *EBioMedicine*, *30*, 94–104.

Hills, S. A., & Diffley, J. F. X. (2014). DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Current Biology*, *24*(10), 435–444.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., *et al*. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, *324*(6092), 73–76.

Hug, N., & Lingner, J. (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma*, *115*(6), 413–425.

Huynh, J., Etemadi, N., Hollande, F., Ernst, M., & Buchert, M. (2017). The JAK/STAT3 axis: A comprehensive drug target for solid malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, *45*, 13–22.

Jain, A. K., & Barton, M. C. (2018). P53: Emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development*, *145*(8), dev158360

Janssen, L. M. E., Ramsay, E. E., Logsdon, C. D., & Overwijk, W. W. (2017). The immune system in cancer metastasis: friend or foe? *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *5*(1), 79.

Jeggo, P. A., Pearl, L. H., & Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, *16*(1), 35–42.

Jessen, K. R., Mirsky, R., & Arthur-Farraj, P. (2015). The role of cell plasticity in tissue repair: Adaptive cellular reprogramming. *Developmental Cell*, *34*(6), 613–620.

Jinesh, G. G., Sambandam, V., Vijayaraghavan, S., Balaji, K., & Mukherjee, S. (2018). Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis. *Oncogene*, *37*(7), 839–846.

Johnson, D. E., O'Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(4), 234–248.

Jopling, C., Boue, S., & Belmonte, J. C. I. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(2), 79–89.

Kabat, G. C., Etgen, A. M., & Rohan, T. E. (2010). Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *19*(10), 2421–2427.

Kalaitzidis, D., & Gilmore, T. D. (2005). Transcription factor cross-talk: The estrogen receptor and NF-κB. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *16*(2), 46–52.

Kalman, D., Gomperts, S. N., Hardy, S., Kitamura, M., & Bishop, J. M. (1999). Ras family GTPases control growth of astrocyte processes. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(5), 1665–1683.

Kamińska, K., Czarnecka, A. M., Escudier, B., Lian, F., & Szczylik, C. (2015). Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer. *Urologic Oncology*, *33*(11), 476–485.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., & Li, Z. (2002). NF-κB in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 301–310.

Keum, Y. S., Owuor, E. D., Kim, B. R., Hu, R., & Kong, A. N. T. (2003). Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharmaceutical Research*, *20*(9), 1351–1356.

Khan, A. Q., Kuttikrishnan, S., Siveen, K. S., Prabhu, K. S., Shanmugakonar, M., Al-Naemi, H. A., *et al*. (2018). RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, S1044–579X

Kirson, E. D., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., *et al*. (2004). Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Research*, *64*(9), 3288–3295.

Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6 : From basic science to medicine–40 years in immunology. *Annual Review of Immunology*, *23*, 1–21.

Kitajima, S., Yoshida, A., Kohno, S., Li, F., Suzuki, S., Nagatani, N., *et al*. (2017). The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene*, *36*(36), 5145–5157.

Kmiecik, J., Poli, A., Brons, N. H. C., Waha, A., Eide, G. E., Enger, P. Ø., *et al*. (2013). Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *Journal of Neuroimmunology*, *264*(1–2), 71–83.

Kohsaka, S., Sasai, K., Takahashi, K., Akagi, T., Tanino, M., Kimura, T., *et al*. (2011). A population of BJ fibroblasts escaped from Ras-induced senescence susceptible to transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *410*(4), 878–884.

Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., *et al*. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, *368*(6469), 339–342.

Kosmidou, I., Vassilakopoulos, T., Xagorari, A., Zakynthinos, S., Papapetropoulos, A., & Roussos, C. (2002). Production of interleukin-6 by skeletal myotubes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *26*(5), 587–593.

Kretzschmar, K., & Watt, F. M. (2014). Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(10), a013631.

Kristensen, D. M., Kalisz, M., & Nielsen, J. H. (2005). Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS*, *113*(11–12), 756–772.

Kucera, R., Topolcan, O., Treskova, I., Kinkorova, J., Windrichova, J., Fuchsova, R., *et al*. (2015). Evaluation of IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 in malignant melanoma diagnostics. *Anticancer Research*, *35*(6), 3537–3541.

Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, *9*(2), 81–94.

Kumar, J., & Ward, A. C. (2014). Role of the interleukin 6 receptor family in epithelial ovarian cancer and its clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1845*(2), 117–125.

Kuo, C. J., & Curtis, C. (2018). Organoids reveal cancer dynamics. *Nature*, *556*(7702), 441–442.

Ladeira, K., Macedo, F., Longatto-Filho, A., & Martins, S. F. (2017). Angiogenic factors: role in esophageal cancer, a brief review. *Esophagus*, *15*(2), 53–58.

Lan, Y. L., Zou, S., Wang, X., Lou, J. C., Xing, J. S., Yu, M., & Zhang, B. (2017). Update on the therapeutic significance of estrogen receptor beta in malignant gliomas. *Oncotarget*, *8*(46), 81686–81696.

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *9*(10), 2329–2340.

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., *et al*. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*(7467), 373–379.

Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer*, *128*(11), 2527–2535.

Lasry, A., & Ben-Neriah, Y. (2015). Senescence-associated inflammatory responses: Aging and cancer perspectives. *Trends in Immunology*, *36*(4), 217–228.

Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P., Campisi, J., & Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *British Journal of Cancer*, *114*(11), 1180–1184.

Lee, K. Y., Ladha, M. H., McMahon, C., & Ewen, M. E. (1999). The retinoblastoma protein is linked to the activation of Ras. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(11), 7724–7732.

Lee, S. J., Kang, W. Y., Yoon, Y., Jin, J. Y., Song, H. J., Her, J. H., *et al*. (2015). Natural killer (NK) cells inhibit systemic metastasis of glioblastoma cells and have therapeutic effects against glioblastomas in the brain. *BMC Cancer*, *15*, 1011.

Li, C., Zhang, G., Zhao, L., Ma, Z., & Chen, H. (2015). Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, *14*(1), 15

Liu, Z., Wang, Z., Xiao, Y., Lu, Y., & Lu, Y. (2015). Association between the interleukin-6 gene polymorphisms and renal cancer risk. *Immunology Letters*, *164*(2), 125–8.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., *et al*. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97–109.

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., *et al*. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820.

Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. *Trends Immunology*, *36*(10), 569–577.

Lu, X., Ma, O., Nguyen, T. A., Jones, S. N., Oren, M., & Donehower, L. A. (2007). The Wip1 phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell*, *12*(4), 342–354.

Lu, X., Nannenga, B., & Donehower, L. A. (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes & Development*, *19*(10), 1162–74.

Lust, J., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A., & Maihle, N. J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*, *4*(2), 96–100.

Ma, Y., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Yang, Z., & Qin, H. (2010). The relationship between early embryo development and tumourigenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(12), 2697–2701.

Macdonald, F., Ford, C. H., & Casson, A. (2004). *Molecular Biology of Cancer* (2nd ed.). London and New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.

Mager, L. F., Wasmer, M. H., Rau, T. T., & Krebs, P. (2016). Cytokine-induced modulation of colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, *6*, 96

Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R., & Hadjipanayis, C. (2018). Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: A review of the therapy's history, efficacy and application in humans. *International Journal of Hyperthermia*, *34*(8), 1316–1328.

Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M., & Rodier, F. (2015). DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Frontiers in Genetics, 6*, 94.

Malik, A., & Kanneganti, T. D. (2018). Function and regulation of IL-1α in inflammatory diseases and cancer. *Immunological Reviews, 281*(1), 124–137.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer, 9*(3), 153–166.

Mansour, A. A., Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., *et al*. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nature Biotechnology, 36*(5), 432–441.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature, 454*(7203), 436–444.

Marasco, M. R., Conteh, A. M., Reissaus, C. A., Cupit, J. E., Appleman, E. M., Mirmira, R. G., & Linnemann, A. K. (2018). Interleukin-6 reduces β-cell oxidative stress by linking autophagy with the antioxidant response. *Diabetes, 67*(8), 1576–1588.

Marino, S., Vooijs, M., Van Der Gulden, H., Jonkers, J., & Berns, A. (2000). Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes and Development, 14*(8), 994–1004.

Martens, A. S., Bode, J. G., Heinrich, P. C., & Graeve, L. (2000). The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *Journal of Cell Science, 113,* 3593–3602.

Mawrin, C., & Seidenbecher, C. (2014). Glioma and extracellular matrix. In A. Sedo & R. Mentlein (Eds.), *Glioma Cell Biology* (pp. 271–292). Vienna: Springer.

McCool, K. W., & Miyamoto, S. (2012). DNA damage-dependent NF-κB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunological Reviews, 246*(1), 311–326.

McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M., *et al*. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, *455*(7216), 1061–1068.

Milagre, C. S., Gopinathan, G., Everitt, G., Thompson, R. G., Kulbe, H., Zhong, H., *et al*. (2015). Adaptive upregulation of EGFR limits attenuation of tumor growth by neutralizing IL6 antibodies, with implications for combined therapy in ovarian cancer. *Cancer Research*, *75*(7), 1255–1264.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., *et al*. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631–642.

Mori, S., Murakami-Mori, K., & Bonavida, B. (1999). Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *257*(2), 609–614.

Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., *et al*. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*, *354*(6315), aaf4445.

Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A., & Serrano, M. (2018). Senescence promotes in vivo reprogramming through p16INK4a and IL-6. *Aging Cell*, *17*(2), 1–11.

Müllberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., *et al*. (1994). The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *Journal of Immunology*, *152*(10), 4958–4968.

Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(7), 482–96.

Münst, B., Thier, M. C., Winnemöller, D., Helfen, M., Thummer, R. P., & Edenhofer, F. (2016). Nanog induces suppression of senescence through downregulation of p27 KIP1 expression. *Journal of Cell Science*, *129*(5), 912–920.

Nacarelli, T., Liu, P., & Zhang, R. (2017). Epigenetic basis of cellular senescence and its implications in aging. *Genes*, *8*(12), 1–12.

Naka, K., Muraguchi, T., Hoshii, T., & Hirao, A. (2008). Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(11), 1883–1894.

Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., & Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, *317*(5834), 121–124.

Newman, J. R. S. (2003). Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science*, *300*(5628), 2097–2101.

Nguyen, D. P., Li, J., & Tewari, A. K. (2014). Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). *BJU International*, *113*(6), 986–992.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, *2*(3), 213–219.

Nishikai-Yan Shen, T., Kanazawa, S., Kado, M., Okada, K., Luo, L., Hayashi, A., *et al*. (2017). Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PloS One*, *12*(5), e0178232.

Nishimoto, N., & Kishimoto, T. (2006). Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature Clinical Practice.Rheumatology*, *2*(11), 619–626.

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23–28.

Ogrunc, M., Di Micco, R., Liontos, M., Bombardelli, L., Mione, M., Fumagalli, M., *et al*. (2014). Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death and Differentiation*, *21*(6), 998–1012.

Ohnishi, T., Mori, E., & Takahashi, A. (2009). DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research*, *669*(1–2), 8–12.

Olson, M. F., & Marais, R. (2000). Ras protein signalling. *Seminars in Immunology*, *12*(1), 63–73.

Onder, T. T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A. U., Zhu, N., Bernt, K. M., *et al*. (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, *483*(7391), 598–602.

Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., & Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(40), 17031–17036.

Ozdemir-Kaynak, E., Qutub, A., & Yesil-Celiktas, O. (2018). Advances in Glioblastoma Multiforme treatment: New models for nanoparticle therapy. *Frontiers in Physiology*, *9*, 170.

Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, *133*(3421), 571–573.

Parsons, D. W., Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., *et al*. (2008). An integrated genomic analysis of human Glioblastoma Multiforme. *Science*, *321*, 1807–1812.

Paterson, M. R., & Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiological Genomics*, *49*(4), 243–252.

Pawlowska, E., Szczepanska, J., Szatkowska, M., & Blasiak, J. (2018). An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme – role in pathogenesis and therapeutic perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), E889.

Peeper, D. S., Dannenberg, J. H., Douma, S., Te Riele, H., & Bernards, R. (2001). Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by ras. *Nature Cell Biology*, *3*(2), 198–203.

Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., *et al*. (2017). Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer*, *17*(5), 302–317.

Penkowa, M., Giralt, M., Carrasco, J., Hadberg, H., & Hidalgo, J. (2000). Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*, *32*(3), 271–285.

Pereira, V., Moura, V., & Mentlein, R. (2018). Glioma infiltration and extracellular matrix: Key players and modulators. *Glia*, 1–24.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., *et al*. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–13.

Plantone, D., Renna, R., Sbardella, E., & Koudriavtseva, T. (2015). Concurrence of multiple sclerosis and brain tumors. *Frontiers in Neurology*, *6*, 40.

Pop, V. V., Seicean, A., Lupan, I., Samasca, G., & Burz, C. C. (2017). IL-6 roles – molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer – A systemic review. *Immunology Letters*, *181*, 45–50.

Qiao, Y., Zhang, C., Li, A., Wang, D., Luo, Z., Ping, Y., *et al*. (2018). IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, *37*(7), 873–883.

Qu, Z., Sun, F., Zhou, J., Li, L., Shapiro, S. D., & Xiao, G. (2015). Interleukin-6 prevents the initiation but enhances the progression of lung cancer. *Cancer Research*, *75*(16), 3209–3215.

Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, *19*(11), 1423–1437.

Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2017). The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell*, *31*(3), 326–341.

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(8), 1177–1195.

Rayess, H., Wang, M., & Srivatsan, E. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, *130*(8), 1715–1725.

Reik, W., & Surani, M. A. (2015). Germline and pluripotent stem cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(11), a019422.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., *et al*. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, *468*(7325), 824–828.

Rick, J., Chandra, A., & Aghi, M. K. (2018). Tumor treating fields: A new approach to glioblastoma therapy. *Journal of Neuro-Oncology*, *137*(3), 447–453.

Riethmueller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C. W., Flynn, C. M., Lokau, J., *et al*. (2017). Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-Glycosylation. *PLoS Biology*, *15*(1), e2000080.

Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., *et al*. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes and Development*, *31*(2), 172–183.

Rizzino, A. (2009). Sox2 and Oct-3/4: A versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *1*(2), 228–236.

Rizzino, A., & Wuebben, E. L. (2016). Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochimica et Biophysica*, *1859*(6), 780–791.

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., *et al*. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, *11*(8), 973–979.

Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(2), 1–18. http://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415

Rowley, M., & Van Ness, B. (2002). Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response. *Oncogene*, *21*(57), 8769–8775.

Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, *32*(43), 5129–5143.

Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(7), 2415–2420.

Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF-κB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, *24*(4), 835–845.

Sandoval, S., Torres, C., García, M., & Aldana, M. (2014). Criticality in gene networks. In M. Benítez, O. Miramontes, & A. Valiente-Banuet (Eds.), *Frontiers in Ecology, Evolution and Complexity* (pp. 159–181). CoPit Arxives.

Schaper, F., & Rose-John, S. (2015). Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *26*(5), 475–487.

Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology*, *64*(6), 1403–1415.

Schosserer, M., Grillari, J., & Breitenbach, M. (2017). The dual role of cellular senescence in developing tumors and their response to cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, *7*, 278.

Seoane, M., Costoya, J. A., & Arce, V. M. (2017). Uncoupling Oncogene-Induced Senescence (OIS) and DNA Damage Response (DDR) triggered by DNA hyper-replication: Lessons from primary mouse embryo astrocytes (MEA). *Scientific Reports*, *7*(1), 12991.

Seoane, M., Iglesias, P., Gonzalez, T., Dominguez, F., Fraga, M., Aliste, C., *et al*. (2008). Retinoblastoma loss modulates DNA damage response favoring tumor progression. *PloS One*, *3*(11), e3632.

Seoane, M., Mosquera-Miguel, A., Gonzalez, T., Fraga, M., Salas, A., & Costoya, J. A. (2011). The mitochondrial genome is a "genetic sanctuary" during the oncogenic process. *PloS One*, *6*(8), e23327.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, *88*(5), 593–602.

Shah, K., Patel, S., Mirza, S., & Rawal, R. M. (2018). Unravelling the link between embryogenesis and cancer metastasis. *Gene*, *642*, 447–452.

Shan, Y., He, X., Song, W., Han, D., Niu, J., & Wang, J. (2015). Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *International Journal Clinical Expperimental Medicine*, *8*(6), 9114–9120.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFNγ, and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107–1111.

Shen, X. F., Zhao, Y., Jiang, J. P., Guan, W. X., & Du, J. F. (2017). Phosphatase Wip1 in immunity: An overview and update. *Frontiers in Immunology*, *8*, 8.

Shi, Y., Frost, P., Hoang, B., Benavides, A., Gera, J., & Lichtenstein, A. (2011). IL-6-induced enhancement of c-Myc translation in multiple myeloma cells. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(1), 67–78.

Shimozaki, K., Nakashima, K., Niwa, H., & Taga, T. (2003). Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development*, *130*(11), 2505–2512.

Shimura, T., & Kunugita, N. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1. *Cell Cycle*, *15*(11), 1410–1414.

Smith, Z. D., Sindhu, C., & Meissner, A. (2016). Molecular features of cellular reprogramming and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 139–154.

Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., *et al*. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(11), 4274–4280.

Somers, W. (1997). 1.9 A crystal structure of interleukin 6: Implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *The EMBO Journal*, *16*(5), 989–997.

Soria-Valles, C., Osorio, F. G., Gutiérrez-Fernández, A., De Los Angeles, A., Bueno, C., Menéndez, P., *et al*. (2015). NF-κB activation impairs somatic cell reprogramming in ageing. *Nature Cell Biology*, *17*(8), 1004–1013.

Stadler, J., & Richly, H. (2017). Regulation of DNA repair mechanisms: How the chromatin environment regulates the DNA damage response. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8), E1715.

Stilmann, M., Hinz, M., Arslan, S. Ç., Zimmer, A., Schreiber, V., & Scheidereit, C. (2009). A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IκB kinase activation. *Molecular Cell*, *36*(3), 365–378.

Sun, S. C. (2017). The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *17*(9), 545–558.

Sundaram, G. M., Quah, S., & Sampath, P. (2018). Cancer: the dark side of wound healing. *The FEBS Journal*, *285*(24), 4516–4534.

Swift, S., Lorens, J., Achacoso, P., & Nolan, G. P. (2001). Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Current Protocols in Immunology*, *31*(1), 10.17.14–10.17.29.

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., *et al*. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, *58*(3), 573–581.

Taguchi, J., & Yamada, Y. (2017). Unveiling the role of senescence-induced cellular plasticity. *Cell Stem Cell*, *20*(3), 293–294.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–676.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 183–193.

Tanabe, O., Akira, S., Kamiya, T., Wong, G. G., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1988). Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *Journal of Immunology*, *141*(11), 3875–3881.

Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2014). The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunology Research*, *2*(4), 288–294.

Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(2), 131–142.

Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., *et al*. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, *10*(3), 241–252.

Van Der Zee, M., Sacchetti, A., Cansoy, M., Joosten, R., Teeuwssen, M., Heijmans-Antonissen, C., *et al*. (2015). IL6/JAK1/STAT3 signaling blockade in endometrial cancer affects the ALDHhi/CD126+stem-like component and reduces tumor burden. *Cancer Research*, *75*(17), 3608–3622.

Varlakhanova, N. V., Cotterman, R. F., DeVries, W. N., Morgan, J., Donahue, L. R., Murray, S., *et al*. (2010). myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *80*(1), 9–19.

Veverka, V., Baker, T., Redpath, N. T., Carrington, B., Muskett, F. W., Taylor, R. J., *et al*. (2012). Conservation of functional sites on interleukin-6 and implications for evolution of signaling complex assembly and therapeutic intervention. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 40043–40050.

Vilas, J. M., Ferreirós, A., Carneiro, C., Morey, L., Da Silva-Álvarez, S., Fernandes, T., *et al*. (2015). Transcriptional regulation of Sox2 by the retinoblastoma family of pocket proteins. *Oncotarget*, *6*(5), 2992–3002.

Waddington, C. H. (1957). The strategy of the genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology, London, United Kingdom: George Allen & Unwin LTD

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science*, *296*(5573), 1635–1636.

Waldner, M. J., Foersch, S., & Neurath, M. F. (2012). Interleukin-6 - A key regulator of colorectal cancer development. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(9), 1248–1253.

Wang, H., Zhang, X., Teng, L., & Legerski, R. J. (2015). DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Experimental Cell Research*, *334*(2), 350–358.

Wang, L., Walia, B., Evans, J., Gewirtz, A. T., Merlin, D., & Sitaraman, S. V. (2003). IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *Journal of Immunology*, *171*(6), 3194–3201.

Wang, S., & El-Deiry, W. S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, *22*(53), 8628–8633.

Wang, W. J., Wu, S. P., Liu, J. B., Shi, Y. S., Huang, X., Zhang, Q. B., & Yao, K. T. (2013). MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Research*, *73*(3), 1219–1231.

Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Lai, K. B., Lee, C. N., & Hsieh, C. Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, *22*(10), 1517–1527.

Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., *et al*. (2009). Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells*, *27*(12), 2969–2978.

Weinberg, R. A. (2007). Moving out: Invasion and metastasis. In *The Biology of Cancer* (Vol. 1, pp. 587–654). London and New York: Gerland Science.

Weissenberger, J., Loeffler, S., Kappeler, A., Kopf, M., Lukes, A., Afanasieva, T. A., *et al*. (2004). IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene*, *23*(19), 3308–3316.

Wen, W., Liang, W., Wu, J., Kowolik, C. M., Buettner, R., Scuto, A., *et al*. (2014). Targeting JAK1/STAT3 signaling suppresses tumor progression and metastasis in a peritoneal model of human ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(12), 3037–3048.

West, A. J., Tsui, V., Stylli, S. S., Nguyen, H. P. T., Morokoff, A. P., Kaye, A. H., & Luwor, R. B. (2018). The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. *Oncology Letters*, *16*(4), 4095–4104.

Wirsching, H., & Galanis, E. (2016). Gliomas: Glioblastoma. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 134, pp. 381–397).

Witkiewicz, A. K., Chung, S., Brough, R., Vail, P., Franco, J., Lord, C. J., & Knudsen, E. S. (2018). Targeting the vulnerability of RB tumor suppressor loss in triple-negative breast cancer. *Cell Reports*, *22*(5), 1185–1199.

Wood, C. D., Thornton, T. M., Sabio, G., Davis, R. A., & Rincon, M. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *International Journal of Biological Sciences*, *5*(5), 428–437.

Woroniecka, K. I., Rhodin, K. E., Chongsathidkiet, P., Keith, K. A., & Fecci, P. E. (2018). T-Cell dysfunction in glioblastoma: Applying a new framework. *Clinical Cancer Research*, *24*(16), 3792–3802.

Wruck, C. J., Streetz, K., Pavic, G., Götz, M. E., Tohidnezhad, M., Brandenburg, L. O., *et al*. (2011). Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4493–4499.

Wu, X., Tao, P., Zhou, Q., Li, J., Yu, Z., & Wang, X. (2017). IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2 / STAT3 signaling pathway, *8*(13), 20741–20750.

Wu, Y., & Zhou, B. P. (2009). Inflammation: A driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle*, *8*(20), 3267–3273.

Wuebben, E. L., & Rizzino, A. (2017). The dark side of SOX2: Cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*, *8*(27), 44917–44943.

Wurmser, A. E., Nakashima, K., Summers, R. G., Toni, N., D'Amour, K. A., Lie, D. C., & Cage, F. H. (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*, *430*(6997), 350–356.

Xue, H., Yuan, G., Guo, X., Liu, Q., Zhang, J., Gao, X., *et al*. (2016). A novel tumor-promoting mechanism of IL6 and the therapeutic efficacy of tocilizumab: Hypoxia-induced IL6 is a potent autophagy initiator in glioblastoma via the p-STAT3-MIR155-3p-CREBRF pathway. *Autophagy*, *12*(7), 1129–1152.

Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T. N., & Kumar, P. (2011). IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Molecular Cancer Research*, *9*(12), 1658–1667.

Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., *et al*. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*, *241*(4867), 825–828.

Yan, H. Q., Huang, X. B., Ke, S. Z., Jiang, Y. N., Zhang, Y. H., Wang, Y. N., *et al*. (2014). Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Science*, *105*(9), 1220–1227.

Yan, S., Sorrell, M., & Berman, Z. (2014). Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(20), 3951–3967.

Yang, W., Warrington, N. M., Taylor, S. J., Whitmire, P., Carrasco, E., Singleton, K. W., *et al*. (2019). Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Science Translational Medicine*, *11*(473), eaao5253.

Yeung, Y., McDonald, K., Grewal, T., & Munoz, L. (2013). Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *British Journal of Pharmacology*, *168*(3), 591–606.

Yin, Z., Ma, T., Lin, Y., Lu, X., Zhang, C., Chen, S., & Jian, Z. (2018). IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(11), 9419–9432.

Yoon, C. H., Hyun, K. H., Kim, R. K., Lee, H., Lim, E. J., Chung, H. Y., *et al*. (2011). The small GTPase Rac1 is involved in the maintenance of stemness and malignancies in glioma stem-like cells. *FEBS Letters*, *585*(14), 2331–2338.

Young, H. L., Rowling, E. J., Bugatti, M., Giurisato, E., Luheshi, N., Arozarena, I., *et al*. (2017). An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(6), 1691–1710.

Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, *7*(1), 41–51.

Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, *9*(11), 798–809.

Yun, M. R., Choi, H. M., Kang, H. N., Lee, Y., Joo, H. S., Kim, D. H., *et al*. (2018). ERK-dependent IL-6 autocrine signaling mediates adaptive resistance to pan-PI3K inhibitor BKM120 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, *37*(3), 377–388.

Zhang, H., Song, Y., Yang, H., Liu, Z., Gao, L., Liang, X., & Ma, C. (2018). Tumor cell-intrinsic Tim-3 promotes liver cancer via NF-κB/IL-6/STAT3 axis. *Oncogene*, *37*(18), 2456–2468.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 4350965

Zhang, L., Hu, J., & Athanasiou, K. A. (2009). The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, *37*(1–2), 1–57.

Zhang, P., Andrianakos, R., Yang, Y., Liu, C., & Lu, W. (2010). Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 9180–9189.

Zhang, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, *6*(3), 305–311.

Zhao, Z. F., Li, J. X., Ye, R., Wu, X., Gao, L. L., & Niu, B. L. (2016). Interleukin-6 as a potential molecular target in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, *11*(2), 925–932.

Zheng, W., Li, Q., Zhao, C., Da, Y., Zhang, H. L., & Chen, Z. (2018). Differentiation of glial cells from hiPSCs: Potential applications in neurological diseases and cell replacement therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*,239.

Zhu, L., Oh, J. M., Gangadaran, P., Kalimuthu, S., Baek, S. H., Jeong, S. Y., *et al.* (2018). Targeting and therapy of glioblastoma in a mouse model using exosomes derived from Natural Killer cells. *Frontiers in Immunology*, *9*, 824.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

“- O deserto é fermoso – engadiu.

E era certo: A min sempre me gustou o deserto. Senta un sobre unha duna e non se ve nada, non se escoita nada... Sen embargo, hai algo que brilla no silencio...

- O que fai fermoso o deserto é que esconde un pozo en calquera parte...

Quedei sorprendido ao comprender de repente o significado daquel misterioso brillar da area (...)”

Antoine de Saint Exupéry. *O principiño*, 1943

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA