



TESE DE DOUTORAMENTO

**A INACTIVACIÓN DE P53
INCREMENTA A RESPOSTA AO
DANO NO DNA(DDR) INDUCIDA
POR RAS ONCOXÉNICO E
FAVORECE A
DESDIFERENCIACIÓN CELULAR**

Catarina González López del Castillo

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2021









AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR DA TESE

A inactivación de p53 incrementa a resposta ao dano no DNA (DDR) inducida por RAS oncoxénico e favorece a desdiferenciación celular

D. José Antonio Costoya Puente

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D^a Catarina González López del Castillo, 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 incorren nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 10 de Febreiro de 2021

Asdo. José Antonio Costoya Puente



AUTORIZACIÓN DO TITOR DA TESE

**A inactivación de p53 incrementa a resposta ao dano no DNA (DDR)
inducida por RAS oncoxénico e favorece a desdiferenciación celular**

D. Victor M. Arce Vázquez

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. Catarina González López del Castillo, baixo a miña titoría, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como titor desta non incorren nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 10 de Febreiro de 2021

Asdo. Victor M. Arce Vázquez





DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

A inactivación de p53 incrementa a resposta ao dano no DNA (DDR) inducida por RAS oncoxénico e favorece a desdiferenciación celular

D^a. Catarina González López del Castillo

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

- 1) A tese abrangue 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 derradeira versión presentada para a súa defensa e coincide ca 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, 10 de Febreiro de 2021

Asdo. Catarina González
López del Castillo



Eu, Catarina González López del Castillo, declaro non ter ningún conflito de interese en relación coa tese de doutoramento.







Adicado a Roque



Agradecementos:

Ao meu director de tese, José Antonio, por guiarme e axudarme en todos estes anos de traballo no laboratorio.

Aos compañeiros do departamento, por estar sempre dispostos a botar unha man. A Sus, a Samu, a Efi...por tantas horas compartidas, tanto dentro como fóra do traballo.

Aos compañeiros do meu grupo, pola colaboración e os consellos que me deron cando o precisei, especialmente a Lydia e a Marcos por todo o que me ensinaron e me axudaron cando empecei no labo.

A Pachy, Fran, David e MariCris, por seguir compartindo *días de gloria*.

Aos amigos de aquí e de alá, Verónica, Isa, Eva, Nuria, Óscar e, sobre todo, Susi. Por estar nos bos momentos, pero sobre todo por estar nos malos.

A César, polos seus azos, a súa paciencia e porque *sempre estás aí*

A toda a miña familia, que son o meu meirande apoio. Especialmente, ao meu irmán, que me axuda, me aconsella e me coida sempre, e aos meus pais, que sempre nolo ofreceron todo, sen importarlles o esforzo que supuxera para eles. Moitas grazas.



TÁBOA DE CONTIDOS

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS	5
RESUMO	13
INTRODUCCIÓN	15
1.- OS GLIOBLASTOMAS COMO MODELOS TUMORAIS...	17
2.- O CICLO CELULAR.....	22
2.1.- Sistemas de control do ciclo celular.....	24
2.2.- Cdk's.....	25
2.3.- Fase G1-M.....	28
2.4.- Fase G2-S.....	31
2.5.- Papel biolóxico doutras Cdk's.....	33
3.- A SUPERFAMILIA RAS.....	35
3.1.- A familia Ras.....	37
4.- P53.....	39
4.1.- Estrutura de p53.....	40
4.2.- Estabilización de p53.....	41
4.3.- Activación da ruta de p53.....	45
4.4.- Consecuencias da activación da ruta de p53..	46
5.- RB.....	49
5.1.- <i>Pocket proteins</i>	49
5.2.- Estrutura de RB.....	50
5.3.- Activación e inactivación de RB. Consecuencias no control do ciclo.....	52
5.4.- Outras funcións de Rb.....	56
OBXECTIVOS	59

MATERIAL E METODOLOGÍA.....	61
1.- RATOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE. CONDICIONES DE ESTABILIZACIÓN	61
2.- CULTIVO DE ASTROCITOS PRIMARIOS.....	61
3.- INFECCIÓN RETROVIRAL.....	62
4.- ENSAÍOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	63
5.- ENSAÍOS DE SENESCENCIA E APOPTOSE.....	63
6.- TRANSFORMACIÓN CELULAR.....	64
7.- ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.....	64
8.- ENSAÍOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	65
9.- ENSAÍOS DE INMUNOCITOQUÍMICA.....	65
10.- ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	67
1.- AUMENTO DA PROLIFERACIÓN DOS ASTROCITOS NEONATAIS <i>KNOCK-OUT</i> CONDICIONAIS PARA P53 E P53/RB RESPECTO AOS GRUPOS CONTROL.....	67
2.- AUSENCIA DE INDUCCIÓN DE APOPTOSE E SENESCENCIA NOS GRUPOS QUE PRESENTAN DELECIÓN DOS XENES SUPRESORES DE TUMORES RB E P53.....	72
3.- APARICIÓN DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS A NIVEL MORFOLÓXICO TRALA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE HRAS ^{V12} , EN ESPECIAL NO GRUPO EN QUE DITA EXPRESIÓN SE COMBINA COA SUPRESIÓN DE P53 E RB.....	78
4.- ACTIVACIÓN DOS <i>CHECKPOINTS</i> DO CICLO CELULAR, ESPECIALMENTE NOS GRUPOS QUE PRESENTAN UN DOBRE EVENTO ONCOXÉNICO.....	81
5.- ENSAIO DE TUMOROXENICIDADE POSITIVO PARA CÉLULAS P53 ^{-/-} / RB ^{-/-} / HRAS ^{V12}	85
6.- CARACTERIZACIÓN DOS CORTES HISTOLÓXICOS TUMORAIS.....	88
7.- PRESENZA DE DESDIFERENCIACIÓN NAS CÉLULAS	

TUMORAIS.....	90
CONCLUSIÓNS.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	99



ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

A

Abl1: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
ADP: *Adenosine diphosphate*
AIP1: *Actin-interacting protein 1*
AKT/PKB: *Protein kinase B*
Amp: *Amplificación*
ALS: *Anti lymphocyte serum*
APC: *Anaphase Promoting Complex*
ARF: *ADP ribosylation factor*
ATG: *Anti thymocyte globulin*
ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*
ATP: *Adenosine triphosphate*
ATR: *Ataxia Telangiectasia Related*
ATRX: *Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*
ATS: *Anti thymocyte serum*

B

B23/NPM1: *Nuclophosmin 1*
BAI1: *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*
BARD1: *BRCA1 associated RING domain 1*
BAX: *Bcl-a associated X protein*
Bcl-2: *B cell Lymphoma 2*
b-Myb (MYBL2): *Myeloblastosis proto-oncogene like 2*
bp: *Base pair*
BRCA1: *Breast cancer 1*
BRCA2: *Breast cancer 2*
BRG1: *Brahma-related gene-1*

c-Abl: *Abelson tyrosine kinase*
CAK: *Cyclin-dependent kinase Activating Kinase*
CBP/p300: *CREB binding protein*
CCND2: *G1/S-specific cyclin D2*
Cdc: *Cell division control protein*
Cdc2: *Cell division control protein 2*
Cdc6: *Cell division control protein 6*
Cdc7: *Cell division control protein 7*
Cdc20: *Cell division control protein 20*
Cdc25: *Cell division control protein 25*
Cdh1: *Cadherin-1*
Cdk: *Cyclin-dependent protein kinase*
Cdk1: *Cyclin-dependent protein kinase 1*
Cdk2: *Cyclin-dependent protein kinase 2*
Cdk3: *Cyclin-dependent protein kinase 3*
Cdk4: *Cyclin-dependent protein kinase 4*
Cdk6: *Cyclin-dependent protein kinase 6*
Cdk7: *Cyclin-dependent protein kinase 7*
Cdk8: *Cyclin-dependent protein kinase 8*
Cdk10: *Cyclin-dependent protein kinase 10*
Cdk11: *Cyclin-dependent protein kinase 11*
CDKN: *Cyclin-dependent kinase inhibitor*
CDKN2A: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
CDKN2B: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*
CDKN2C: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*
Cdt1: *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*
Chk2: *Checkpoint kinase 2*
Cip (CDKN1A/ p21): *Cyclin-dependent kinase inhibitor*
CKI: *Cyclin-dependent kinase inhibitor protein*
CP110: *Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa*
CTD: *Carboxy terminal domain*

D

DAB: 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride

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

DDR: DNA damage response

Del: Delección

DMBT1: Deleted in malignant brain tumors 1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoxyribonucleic acid

DSB: Double strands breaks

DUBs: Deubiquitinating enzymes

E

E2F4: E2 transcription factor 4

E2F5: E2 transcription factor 5

EF1: Elongation factor 1-alpha

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ERK 1/2 kinase: Extracellular Regulated Kinase 1/2

ERBB2: Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2

Ets: E26 transformation-specific

F

Fas: FS-7 associated surface antigen

FBS: Fetal Bovine Serum

Fgf4: Fibroblast growth factor 4

FOXO1: Forkhead box protein 1

FOXO3: Forkhead box protein 3

G

GADD45: Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45

GAP: GTPase-activating protein

GDP: Guanosine diphosphate

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

γ -H2AX: *Gamma H2A histone family member X*

GM130: *Golgi matrix protein*

GRASP65: *Golgi reassembly-stacking protein of 65 kDa*

Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*

GSC: *Glioma stem cells*

GTP: *Guanosine triphosphate*

GTPasa: *Guanosine triphosphatase*

H

hBRM: *Human Brahma-related protein*

HDAC1: *Histone deacetylase 1*

HDM2: *Human Double Minute 2*

HDMX: *Human Double Minute X*

HIF-1: *Hypoxia inducible factor 1*

HIRA: *Histone Cell Cycle Regulator*

HMG-I: *High --mobility group protein*

HOXA: *Homeobox A Cluster*

I

IDH: *Isocitrate dehydrogenase*

IGF-BP3: *Insulin-like growth factor binding protein 3*

INK4: *Inhibidor of Kinasa 4*

iPS: *Induced pluripotential stem cells*

J

JAMM: *Jab1/MPN/Mov34 metalloprotease*

K

Kb: *Kilobases*

Kip (CDKN1B/p27): *Cyclin-dependent kinase unhibitor*

Ku70: *Lupus Ku antigen protein p70*

L

Lats1: *Large tumor suppressor kinase 1*

M

MAP: *Mitogen-activated protein*

MAP1B: *Microtubule Associated 1B*

MAP4: *Microtubule Associated 4*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MARCKS: *Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*

MAT1: *Menage a trois*

MCMs: *Minichromosome maintenance proteins*

MCM2: *Minichromosome maintenance protein 2*

MCM4: *Minichromosome maintenance protein 4*

MDM2: *Mouse Double-Minute 2*

MDM4: *Mouse Double-Minute 4*

MEA: *Mouse Embryo Astrocytes*

MEK 1/2 Kinase: *Mitogen-activated Kinase 1/2*

MJD: *Machado-Joseph disease proteins*

MMHCC: *Mouse Model of Human Cancer Consortium*

Mps1/TTK: *Monopolar spindle 1 kinase*

mRNA: *Messenger ribonucleic acid*

mSds3: *mSin3-associated protein*

Munc18a: *Mammalian uncoordinated 18a*

Mut: *Mutación*

N

NCI: *National Cancer Institute*

NF1: *Neurofibromin 1*

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa-beta*

NIR2/PITPNM1: *Phosphatidylinositol transfer protein membrane associated 1*

NK: *Natural killer*

NLS: *Nuclear Localization Signal*

NOS: *Not otherwise specified*

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

NOXA: *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

NP-40: *Nonidet™ p 40*

NPAT: *Nuclear protein ataxia-telactasia*

NSC: *Neural stem cells*

Nudel: *Nuclear distribution protein like*

O

OMS: *Organización Mundial de la Salud*

OTU: *Ovarian Tumour proteases*

OTUD5: *Ovarian Tumour proteases deubiquitinase 5*

P

PBS: *Phosphate buffered saline*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PDGFRA: *Platelet-derived growth factor receptor alpha*

PDK2: *3-Phosphoinositide-Dependent Kinase*

Perp: *p53 apoptosis effector related to PMP22*

PI3K: *Phosphoinositol-3-kinase*

PI3KCA: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PIK3R1: *Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 1*

PML: *Promyelocytic leukemia protein*

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

PP1: *Protein Phosphatase type 1*

P-TEFb: *Positive-Transcription Elongation Factor b*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

Puma *p53 upregulated modulator of apoptosis*

R

R2/RRM2: *Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2*

RIIα/PKA: *Protein kinase A*

Rab: *Ras brain*

Raf: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

Ran: *Ras-related nuclear protein*
Rap: *Ras proximate 1*
Ras: *Ras sarcoma*
Rb: *Retinoblastoma gene*
Rerg: *Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor*
Rheb: *Ras homolog enriched in brain*
Rho: *Ras homologous protein*
RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RNA: *Ribonucleic acid*
RNPS1: *RNA-binding protein with serine-rich domain 1*
ROS: *Reactive Oxygen Species*
RTK: *Receptor tyrosine kinase*
R-Ras: *Ras-related protein*

S

SCF-Fbxw7: *Skp1-Cull1-F-box protein*
SCID: *Severe combined immunodeficiency*
SD: *Standard deviation*
SDS: *Sodium dodecyl sulfate*
Shc: *Src homology 2 domain containing*
Skp2: *S-phase kinase-associated protein 2*
Smad: *Sma and mad protein*
SNC: *Sistema nervioso central*
SOS: *Son of Sevenless*
Sox2: *Sex determining region Y-box 2*
SPF: *Specific Pathogen Free*
SPRY2: *Sprouty RTK Signaling Antagonis 2*
Src: *Sarc (sarcoma)*
Stat: *Signal Transducer and Activator of Transcription*
SUMO: *Small ubiquitin-like modifier Protein*
SUV39H1: *Suppressor of Variegation 3-9- homolog 1*
SV40T: *Simian Vacuolating Virus 40 Tag*

T

TAP: *Tumor angiogenesis factor*

TBS-T: *Tris-buffered saline, 0,1% Tween 20TM*

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TERT: *Telomerase reverse transcriptase*

TFH II: *Transcription initiation Factor II H*

TGF-beta: *Transforming Growth Factor beta*

TICs: *Tumor initiating cells*

TNF: *Tumor necrosis factor*

Tsp1: *Thrombospondin 1*

U

Ub: *Ubiquitina*

UCHs: *Ubiquitin-C terminal Hydrolases*

USPs: *Ubiquitin-Specific Proteases*

W

WAF1(CDKN1A/ p21): *Cyclin-dependent kinase unhibitor*

RESUMO

Segundo a clasificación da OMS o glioblastoma multiforme está incluído no grao IV sendo o máis agresivo e o máis frecuente dos que afectan ao SNC, con resultado fatal e tendo unha esperanza de vida media, aproximada, de 15 meses. Sábese que tanto neste tipo de tumores como nos de baixo grao, a vía dependente do supresor de tumores p53 atópase a miúdo alterada, suxerindo que a inactivación de p53 é un evento temperán na gliomaxénese.

Neste estudo determinouse o papel que tanto p53 coma retinoblastoma (Rb) desenvolven na evolución de astrocitomas de baixo grao a glioblastomas. Para iso, avalíouse tanto a desregulación do ciclo celular coma a dos mecanismos de reparación do dano no DNA, fenómenos que derivan na transformación celular.

A ausencia de p53 impide a activación da resposta ao dano ao DNA (DDR) e a indución de apoptose dependente de p53, polo que as células manterán dito dano ao DNA. Combinando esta falta de p53 coa ausencia de Rb, prodúcese un crecemento descontrolado das células, que presentan unha taxa de crecemento moi elevada, inducendo a súa transformación e a tumoroxénese. Así mesmo, observouse a presenza da activación do programa de desdiferenciación asociado a hiperactivación dunha ruta oncoxénica, semellante ao que se observa ao longo dos programas de reprogramación de células diferenciadas a células indiferenciadas.



INTRODUCCIÓN

O control da evolución do ciclo celular e a súa regulación ven do equilibrio que existe entre a acción dos xenes que codifican proteínas que regulan a replicación, o crecemento celular e aqueloutros que inhiben o crecemento. Ao primeiro grupo pertencen os denominados proto-oncoxenes, na súa forma normal (oncoxenes cando perden o control da súa activación por mutación) e poden clasificarse en familias ou grupos, atendendo á ruta ou ao receptor sobre o que actúan. O segundo grupo son os chamados xenes supresores de tumores e codifican proteínas que inhiben o crecemento celular.

As mutacións no grupo dos oncoxenes provocan a inestabilidade xenómica e a perda de control no crecemento celular que atopamos nas distintas etapas dos procesos tumorais. Dentro deles, hai dúas familias que destacan pola súa elevada taxa de mutación nos distintos tipos tumorais humanos. Por unha banda, a familia ras, cuxos membros participan nos sinais de transdución celular. A activación de ras desencadea crecemento, proliferación, diferenciación e supervivencia celular e unha sobreexpresión cando actúa como oncoxene leva á senescencia celular por estrés oncoxénico. Por outro lado, a familia myc, que codifica o factor de transcrición Myc, que promove a proliferación celular. Ademais, asóciase coa inmortalización das células por indución dunha subunidade catalítica da telomerasa. Tal e como acontecía con ras, myc oncoxénico provoca a apoptose celular como control de proliferación.

En contraposición aos oncoxenes, actúan os xenes supresores de tumores. Posto que codifican proteínas que inhiben o crecemento celular, de presentar algunha mutación, poden perder a súa función podendo chegar a colaborar cos oncoxenes no desenvolvemento do proceso tumoral. Dentro deste grupo de xenes protectores, compre destacar algún deles como RB, que codifica pRb quen controla a

entrada da célula na fase S do ciclo de división, ou p53, encargado de deter o ciclo no caso de detectar danos non reparados no DNA. Salientar tamén BRCA1 e BRCA2 que colaboran coa reparación do DNA, PTEN, que regula a ruta Akt/PI3K ou PML que regula a senescencia celular, colaborando con p53.

O estudo dos xenes supresores de tumores iniciouse co retinoblastoma, tumor que aparece a unha idade moi nova, e que permitiu observa-la distribución dese tipo de tumores segundo sexan hereditarios ou non hereditarios. Da mesma maneira, observouse que en ámbolos dous casos precisaba da presenza dun segundo evento oncoxénico para que ditos tumores trocaran a malignos. Estes estudos iniciais fixeron do retinoblastoma un paradigma para o estudo deste tipo de xenes supresores de tumores (Knudson A.G., 1985).

Por outra banda, o xene p53 atópase mutado en máis do 50% dos tumores humanos (Levine A.J., 1997). Segundo a base de datos feita por Hollstein e colaboradores en 1994, as mutacións de p53 aparecen en máis de 50 tipos celulares e tisulares. Ademais, estas alteracións adoitan ir asociadas a unha maior agresividade tumoral, o que non é de estrañar polo grande número de puntos de control sobre os que p53 actúa directamente. Comprobouse tamén que estes tumores poden presentar resistencia á quimioterapia, dificultando o seu tratamento farmacolóxico (Buttitta F. *et al.*, 1997; Levine A.J. and Oren M., 2009). A miúdo, a mutación ou perda de p53 vai acompañada doutras lesión oncoxénicas coas que cooperará no desenrolo tumoral (Eischen C.M. *et al.*, 1999; Chen Z. *et al.*, 2005).

Segundo estudos recentes del TCGA publicados a través do seu portal de datos, a ruta de p53 presenta alteracións nun 33% (172/517) dos tumores cerebrais de grao baixo estudados, mentres que no caso dos glioblastomas multiformes a porcentaxe sube ata o 73% (420/574) das análises realizadas (Gao *et al.*, 2013; Cerami *et al.*, 2012; Brennan C.W. *et al.* (TCGA), 2013).

1.- OS GLIOBLASTOMAS COMO MODELOS TUMORAIS

Historicamente, segundo a clasificación da OMS (Kleihues P. *et al.*, 2002), os tumores cerebrais catalogáanse segundo o tipo celular do que proceden (astrocitos, oligodendrocitos ou células endimais) e en catro grupos (en escala de I a IV) segundo o seu grao de malignidade tendo en conta criterios histolóxicos. Desta maneira, os tumores de tipo I, son de carácter benigno e poden ser tratados con cirurxía. Os tumores de tipo II son de grao de malignidade baixo e poden levar a diferentes situacións clínicas pero non son resecables. Os tumores de tipo III son de carácter maligno e provocan a morte en poucos anos. Os de grao IV son tumores altamente malignos, xeralmente resistentes á quimioterapia e letais en 9-12 meses. Ademais, o 70% dos tumores de grao II convértense en grao III ou IV en 5-10 anos, adquirindo as características histolóxicas dos tumores de máis alto grao (táboa 1).

Novos criterios tentan completar esta clasificación tendo en conta parámetros xenotípicos de forma que os distintos grupos antes considerados poden chegar a ter máis similitudes do que nun principio se cría. Desta maneira, os glioblastomas clasifícanse segundo o estado no que se atope o xene IDH atopándose claras diferencias que poden determinar desde a orixe ata o pronóstico da enfermidade, destacando a importancia de ter en conta estes parámetros xenéticos (Louis, D. *et al.*, 2016)

Esta catalogación non ten que empezar necesariamente polos criterios histolóxicos (Figura 1)

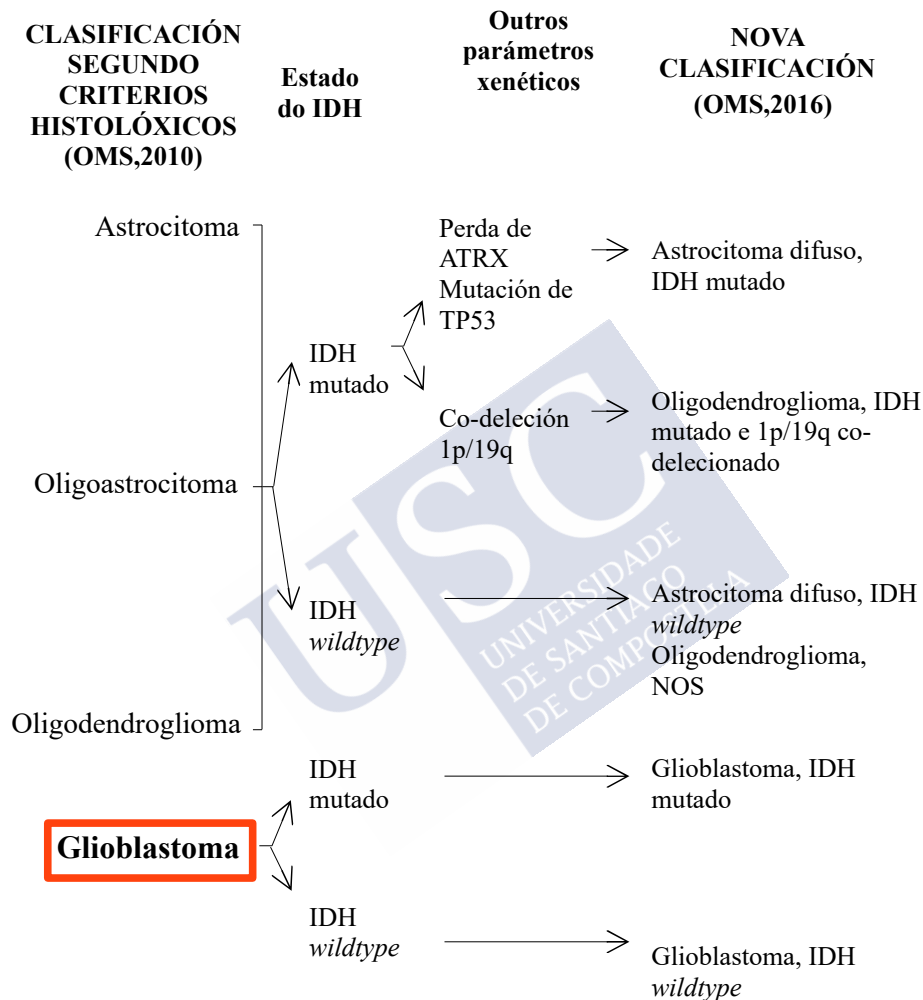


Figura 1.- Diferencias entre a clasificación baseada unicamente en criterios histolóxicos e a que integra criterios de xenotipado celular. Hai tamén unha serie de casos que, ben porque non se fixeron as probas xénicas, ou ben porque non foron concluíntes que se catalogan como “non especificadas doutra maneira” (NOS) e poden ser Astrocitomas difusos, Oligodendrogliomas, Oligoastrocitomas ou Glioblastomas.

En calquera caso, e fronte ao que acontece con outros xenes supresores de tumores que fican mutados nos astrocitomas de alto grao, a mutación ou perda da función de p53 viuse tanto nos tipos de grao máis baixo coma nos glioblastomas, con independencia do estado de IDH, suxerindo que a inactivación de p53 é un evento que acontece cedo no proceso de gliomaxénese.

Táboa 1.- Relación entre supervivencia, características histolóxicas e lesións xenéticas entre os distintos graos de tumores cerebrais

	Astrocitomas de grao baixo	Astrocitomas anaplásicos	Glioblastomas
Supervivencia	5-10 anos	3-4 anos	9-12 meses
Proliferación	+/-	++	+++
Invasión	++	++	+++
Anxioxénese	-	-	+++
Necrose	-	-	+++
Lesións xenéticas máis frecuentes	Mut. TP53 Amp. y Mut. EGFR Del. CDKN2A y CDKN2B Mut. IDH1 Mut. ATRX Mut. PTEN Mut. PI3KCA Mut. NF1	Mut. Rb Amp. CDK4 Del. CDKN2A y CDKN2B Del. PTEN Mut. TERT Amp. SOX2 Mut. IDH1	Mut. TP53 Amp. y Mut. EGFR Mut. y Del. PTEN Mut. PI3K Mut. RB1 Amp. SOX2 Del. CDKN2A y CDKN2

Na táboa Mut:mutación, Del:delección e Amp:amplificación (Resume actualizado con datos provisionais do TCGA, www.cbioportal.org).

Pode ocorrer que a inestabilidade xenética que vai asociada á perda de p53 sexa a responsable da transformación a tumores de grao máis alto

(Maher E.A. *et al.*,2001) e p53 pode ter un papel fundamental nese aumento de malignidade como semella mostrar a presenza de subpoboacións de tumores de grao baixo nos glioblastomas de grao IV (Sindransky D. *et al.*, 1992).

Dentro dos glioblastomas, e en función da situación de IDH, víronse diferencias importantes na evolución do tumor e as características do mesmo (táboa 2).

Táboa 2.- Características diferenciais que presentan os glioblastomas clasificados segundo teñan IDH mutado ou non. Non inclúe os glioblastomas NOS

	Glioblastoma, IDH mutado (Primario)	Glioblastoma, IDH <i>wildtype</i> (Secundario)
Lesión precursora	Non identificada <i>De novo</i>	Astrocitoma difuso Astrocitoma anaplásico
Porcentaxe de casos	90%	10%
Idade media do paciente	62 anos	44 anos
Vida media	4 meses	15 meses
Necrose	Estendida	Limitada
Mutacións máis habituais	Promotor de TERT (72%) TP53 (27%) ATRX (Excepcional) PTEN (24%)	Promotor de TERT (26%) TP53 (81%) ATRX (71%) PTEN (Excepcional)
Amplificacións máis frecuentes	EGFR (35%)	EGFR(Excepcional)

No estudo levado a cabo polo *Cancer Genome Atlas Research Network* (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) mapeáronse as alteracións xenéticas máis frecuentes no xenoma do glioblastoma, detectándose substitucións de nucleótidos, deleccións e amplificacións focais nas principais rutas.

Identificáronse importantes eventos xenéticos en glioblastomas humanos que inclúen:

- desregulación do ciclo celular e proliferación aumentada das células do glioblastoma. As mutacións frecuentes nos xenes reguladores do ciclo, especialmente nos que controlan a transición da fase G1 á fase S, converten ás células tumorais en especialmente susceptibles a unha división celular inapropiada.
- alteración da ruta de Rb. Por estimulación mitoxénica da cascada das MAPK fórmanse complexos Ciclina-Cdk activados que levan a unha fosforilación de Rb, favorecendo a entrada na fase S e a perda de control do ciclo celular (Weinberg R.A., 1995). Un 74% dos glioblastomas presentan algunha alteración nesta ruta (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).
- alteración da ruta de p53. A súa actividade funcional pode estar anulada pola hiperactivación mitoxénica das rutas PI3K e MAPK (Furnari F.B., Fenton T. and Bachoo R.M., 2007). A perda de p53 prodúcese tamén por mutacións puntuais ou por perda do cromosoma 17p na progresión de glioblastomas secundarios (Louis D.N., 1994).
- alteracións nas rutas de sinalización mitoxénicas, incluíndo MAPK e PI3K/PTEN/AKT. Mentres que as células normais precisan a activación das rutas mitoxénicas, como MAPK y PI3K, as células tumorais reducen a dependencia da estimulación exóxena de sinais de crecemento, levando a cabo a división celular a través dunha activación constitutiva destas vías (Furnari F.B., Fenton T. and Bachoo R.M., 2007).

- alteración da vía de sinalización do factor de crecemento por amplificación ou activación mutacional do xene do receptor da tirosina quinasa, así como EGFR, PDGF e a cooperación e coactivación de RTKs. Nas células tumorais atópanse activadas as rutas mediadas por receptor pola sobreexpresión tanto de ligandos coma de receptores, amplificación xenómica e/ou a mutación do receptor podendo estar constitutivamente activada, inclusive en ausencia de ligando (Furnari F.B., Fenton T. and Bachoo R.M., 2007).

2.- O CICLO CELULAR

A división celular é o mecanismo esencial polo que unha célula xa existente chega a dividirse. En organismos unicelulares dita división supón a xeración dun novo individuo. Con todo, en organismos pluricelulares, estas divisións permiten a supervivencia dos tecidos renovables.

As células eucariotas desenvolveron un complexo armazón de regulación proteica, chamado sistema de control do ciclo celular, que permite guiar a progresión a través do ciclo celular. O núcleo deste sistema é unha ordenada serie de interruptores que inician os eventos principais do ciclo, incluíndo a duplicación cromosómica e a segregación (Alberts B. *et al.*, 2014).

A función básica do ciclo celular é a de duplicar de forma exacta o contido de DNA dos cromosomas e segregalo en copias precisas en dúas células fillas xeneticamente iguais. A duplicación dos cromosomas ocorre durante a fase S, que ocupa aproximadamente a metade da duración do ciclo celular en células eucariotas. A segregación dos cromosomas e a división celular ocorre na fase M.

Durante a devandita fase, teñen lugar dous procesos importantes: a división nuclear ou mitose, durante a cal os cromosomas copiados anteriormente son separados nun par de núcleos fillos, e a división

citoplasmática ou citocinese, na que a célula divídese a si mesma en dúas. No final da fase S, as moléculas de DNA de cada par de cromosomas son entrelazadas e mantéñense fortemente unidas por ligazóns proteicas específicas. Na mitose temperá, existe unha fase chamada **profase** na que as dúas moléculas de DNA son gradualmente desligadas e condensadas nun par de unidades chamadas cromátidas irmás.

Moitas células requiren máis tempo para crecer e dobrar a súa cantidade de proteínas e organelas do que precisan para duplicar os seus cromosomas e dividirse. Para permitir ese crecemento, estas células dispoñen das chamadas fases *gap*. Existe unha primeira fase *gap*, chamada G1, entre as fases M e S, e unha segunda, denominada G2, entre a fase S e a mitose. Deste xeito, o ciclo habitual das células eucariotas divídese de catro fases secuenciais: G1, S, G2 e M. G1, S e G2 tomadas xuntas denomínanse **interfase**. As fases *gap* son máis que simples fases de crecemento celular. Proporcionan á célula o tempo necesario para analizar a contorna asegurándose que as condicións son as adecuadas para iniciar a entrada na fase S e a mitose. A fase G1 é especialmente importante neste sentido, a súa duración pode variar segundo as condicións externas e os sinais extracelulares doutras células. Se as condicións externas son desfavorables, as células poden atrasar a súa evolución na fase G1 e entrar nun estado de parada chamado G0, no cal pode permanecer mesmo anos antes de continuar coa proliferación. Se as condicións externas son favorables, as células en fase G1 temperá ou en G0, progresan ata un punto próximo ao final da fase G1 chamado punto de restrición. A partir deste punto, as células están comprometidas na replicación do DNA, aínda que os sinais extracelulares que estimulan o crecemento celular e a división desaparezan.

2.1.- Sistema de control do ciclo celular

O sistema de control do ciclo celular funciona como un temporizador programado de forma estrita, de maneira que controla que cada fase do ciclo teña lugar nun tempo determinado. A pesar de que inicialmente se estudou en células embrionarias e nese caso, o devandito sistema é independente dos eventos que controla, de maneira que continúa operando aínda no caso que estes eventos ocorran de maneira incorrecta, na maioría das células, con todo, no caso de que determinados sensores detecten algún erro nestes procesos emiten sinais polas que o sistema de control atrasa a progresión do ciclo. Este sistema funciona como unha serie de interruptores bioquímicos, cada un dos cales inicia un evento específico do ciclo celular. Na maioría dos casos, funcionan cun sistema binario (aceso/apagado) e de modo irreversible. Ademais, dispón de sistemas de control que lle permiten operar baixo gran cantidade de condicións, sendo un sistema que se pode adaptar especificamente a calquera tipo celular e responder tanto a sinais intracelulares como extracelulares. Na maior parte das células eucariotas, o sistema de control do ciclo celular desencadea a progresión en tres puntos de transición principais tamén chamados *checkpoints*.

-o primeiro deles é **Start** (ou punto de restrición) na última parte da fase G1, onde as células inician a entrada no ciclo celular e o duplicado cromosómico

-o segundo é o chamado **checkpoint G2/M** no que o sistema de control desencadea os eventos mitóticos temperáns

-o terceiro é a **transición metafase-anafase** na que se estimula a separación das cromátidas irmás o que leva á finalización da mitose e a citocinese.

O sistema de control bloquea a progresión en cada un destes puntos de control no caso de detectar problemas tanto no interior como no

exterior celular.

2.2.- Cdks

O tempo e a orde dos procesos de replicación cromosómica, segregación e división celular en eucariotas está controlado polas quinasas dependentes de Ciclinas e contrarrestado polas fosfatasas. As Cdks (familia de proteína-quinasas) en complexo coas súas subunidades activadoras fosforilan as súas proteínas diana en residuos aminoácidos específicos mentres que as fosfatasas reverten estas modificacións (Morgan D.O., 2007).

A actividade destas Cdks ten lugar mediante cambios cíclicos na fosforilación de proteínas intracelulares que inician ou regulan a maior parte dos eventos do ciclo celular. Estes cambios cíclicos na actividade das Cdks están controlados por unha serie de enzimas e outras proteínas, entre as que destacan as Ciclinas, que deben o seu nome a que se observou en moitos casos unha secuencia de síntese e degradación ao longo do ciclo celular. As subunidades Cdk están xeralmente presentes en altas concentracións na célula e esta modula a dispoñibilidade das subunidades de Ciclina como un modo de controlar a actividade Cdk (Kapuy O. *et al.*, 2009). Estes cambios nos niveis de Ciclinas son o resultado da ensamblaxe e activación dos complexos Ciclina-Cdks. Os niveis de Ciclina están regulados por controis tanto na súa síntese como na súa degradación. As taxas de síntese están reguladas por factores de transcrición mentres que a degradación iníciase mediante ubiquitinación das unidades de Ciclina polo APC tamén chamado **ciclosoma**. Os cocientes de ubiquitinación poden estar modulados pola fosforilación ou defosforilación do APC e as súas proteínas asociadas Cdc20 e Cdh1 (Peters J.M., 2006). Con todo, a pesar de que o APC, cuxa misión é degradar Ciclinas e outras proteínas durante a anafase, é un compoñente esencial na maquinaria do ciclo celular, o seu requirimento pode ser obviado (Thornton B.R. and Toczyski D.P., 2003). A degradación da Ciclina non é imprescindible nin tampouco suficiente para a saída irreversible da

mitose. A unidireccionalidade da saída da mitose é consecuencia da proteólise pero requirense uns niveis na retroalimentación do sistema para manter o ciclo celular nun novo estado estable (López Avilés S. *et al.*, 2009).

As Ciclinas clasifícanse en catro tipos, dependendo do paso do ciclo na que se une a Cdks e a súa función. Todas as células eucariotas necesitan tres destes catro tipos (figura 2):

- **Ciclinas G1/S** activan Cdks na G1 tardía e axudan na progresión a través de *Start* resultando unha concomitancia na entrada do ciclo celular. Os seus niveis caen na fase S.
- **Ciclinas S** únense a Cdks na progresión a través de *Start* e axudan estimulando a duplicación cromosómica.
- **Ciclinas M** activan Cdks que estimulan a entrada en mitose no *checkpoint G2/M*.
- Na maioría das células, hai un cuarto tipo de Ciclinas, as Ciclinas G1, que axudan na actividade das Ciclinas G1/S mediante o control da progresión a través de *Start* na fase G1 tardía (Alberts B. *et al.*, 2014).

En principio, as células en mamíferos requiren a activación secuencial de, polo menos, catro das quinases dependentes de Ciclina (Cdk2, Cdk3, Cdk4 e Cdk6) para conducir o seu paso pola interfase, así como Cdk1 procedente da mitose. Este modelo variouse por evidencias recentes que mostran que a maioría das células proliferan en ausencia das Cdks de interfase. Obtivéronse resultados similares coa eliminación das unidades activadoras das Cdks, como as Ciclinas de tipo D e as de tipo E. Desta maneira, Cdk1 únese a tódalas Ciclinas dando como resultado a fosforilación da proteína de retinoblastoma pRb e a expresión de xenes regulados polo factor de transcripción E2F (Santamaria D. *et al.*, 2007).

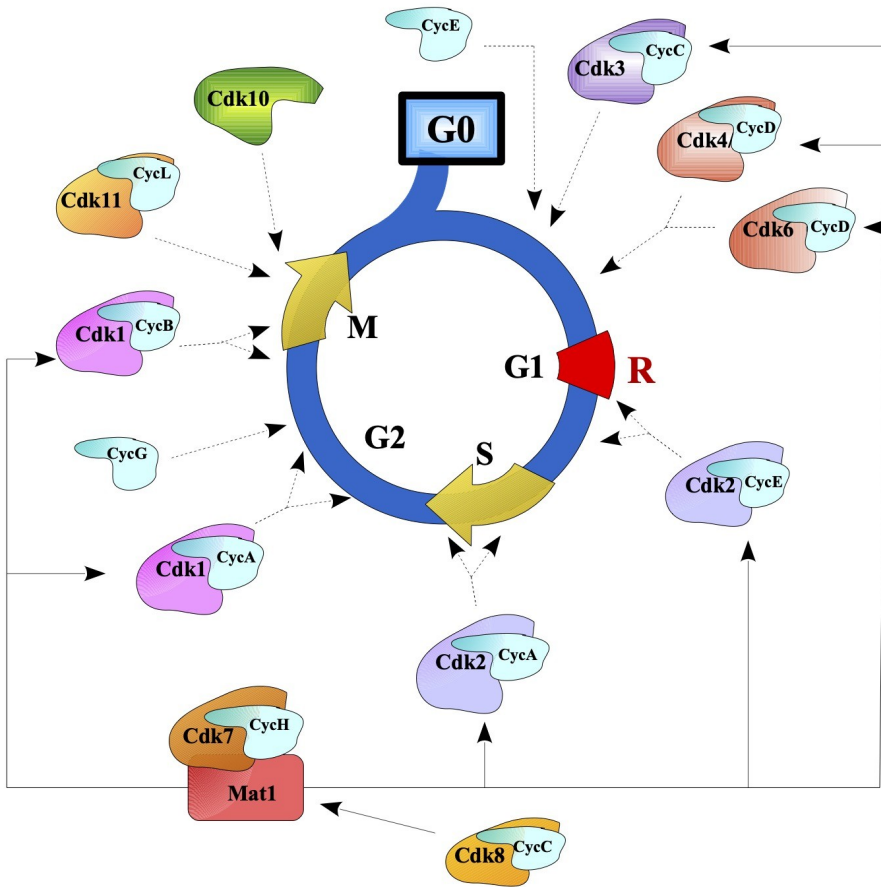


Figura 2. Representación esquemática do papel dos distintos complexos Ciclina-Cdk ao longo do ciclo.

Cdks son as subunidades catalíticas dunha gran familia de proteína-quinases heterodiméricas serina/treonina cuxos membros mellor caracterizados participan no control da progresión do ciclo celular. Hai 11 xenes que codifican Cdks e outros 9 que codifican proteínas

similares a Cdk's cunha estrutura primaria cuxas proteínas activadoras das Cdk's no ciclo celular son moléculas que son sintetizadas e degradadas durante cada ciclo e que se denominan Ciclinas (táboa 3). Con todo, a pesar de utilizar esta denominación para designar a esta familia de quinases, non todos os activadores de Cdk's son sintetizados e destruídos dunha forma cíclica.

Táboa 3.- Complexos Ciclina-Cdk.

Complexo Ciclina-Cdk	Ciclina	Cdk
G1 Cdk	Ciclina D (D1,D2 y D3)	Cdk4, Cdk6
G1/S Cdk	Ciclina E	Cdk2
S Cdk	Ciclina A	Cdk2, Cdk1 (Cdc2)
M Cdk	Ciclina B	Cdk1 (Cdc2)

2.3.- Fase G1-S

A progresión en G1 está regulada por un complexo mecanismo que depende, polo menos, de tres Cdk's (Cdk4, Cdk6 e Cdk2) e os seus reguladores (Sherr C.J and Roberts J.M., 1999; Malumbres M. and Barbacid M., 2001). Tres ciclinas do tipo D (Ciclina D1, D2 e D3) actúan en células de mamíferos. As Ciclinas D únense ás súas parellas catalíticas, as quinases dependentes de Ciclina Cdk4 e Cdk6, e fosforilan membros da familia do pRb (Sherr C.J. and Roberts J.M., 1999). Inicialmente, os sinais mitoxénicos inducen a síntese das Ciclinas tipo D e posibilita o pregamento e transporte adecuado de Cdk4 e/ou Cdk6 ao núcleo. Complexos activos de Cdk4 ou Cdk6 e Ciclinas tipo D fosforilan aos membros da familia da proteína do

retinoblastoma (Rb) que inclúe pRb, p107 e p130. Estas proteínas conteñen múltiples sitios de fosforilación por Cdk's (por exemplo, pRb ten 16), aínda que só algúns poden ser recoñecidos polos complexos Cdk4-CiclinaD e/ou Cdk6-CiclinaD. Os únicos substratos que se sabe que son fosforilados por estes complexos son Smad3, Cdt1 e Marcks, o substrato miristilado rico en alanina da quinasa C (Malumbres M. and Barbacid M., 2001). Os ratos *knock-out* para as Ciclinas D, para Cdk4 e para Cdk6 proporcionan evidencias xenéticas de que a principal función das Ciclinas D no desenvolvemento embrionario é a de activar Cdk4 e Cdk6. Estes estudos demostran que é posible que as propiedades destas moléculas vaian ligadas á súa especificidade tisular e/ou á súa activación diferencial durante o desenvolvemento e convértenas en posibles dianas terapéuticas polo papel fundamental que teñen tanto no inicio do proceso tumoral como na proliferación do mesmo (Ciemerych M.A. and Sicinski P., 2005). As Ciclinas tipo E, as cales se cre son necesarias para a activación da Cdk2 contribuíndo á finalización da fase G1, son unha das dianas transcricionais fundamentais do complexo Rb-E2F, no que participa a proteína pRb para modular a actividade dos factores de transcrición. A pesar de que Rb está fosforilado inicialmente a través das quinases Cdk4-CiclinaD e/ou Cdk6-CiclinaD, a súa inactivación irreversible a leva a cabo Cdk2-CiclinaE. Crese que este proceso prodúcese para facer que as células sexan independentes dos sinais mitoxénicos e corresponde co punto de restrición (Indicado como **R** en figura 2; Malumbres M. and Barbacid M., 2001). O punto de restrición foi definido (Pardee A. B., 1989) como o estadio dentro de G1 máis aló do cal as células están comprometidas para avanzar á fase S. Hai tres criterios que se usan para definir este punto; i) as células non necesitan soro para continuar á fase S, ii) as células non son sensibles á inhibición mediante o factor de crecemento transformante beta, iii) as células non son sensibles ao inhibidor de síntese proteica ciclohexamida. En resumo, é o punto máis aló do cal as células non responden a sinais inhibitorias e non precisan sinais estimuladoras para progresar á fase S (Herrera R.E *et al.*, 1996). En efecto, as

células que presentan unha perda de función das *pocket proteins* (pRb, p107 e p130) non teñen un punto de restrición funcional xa que poden dividirse en ausencia de mitóxenos, presentan unha redución na capacidade de diferenciación e unha perda de resposta á senescencia, o que pode proporcionar a razón fundamental para da súa relevancia recorrente nos tumores humanos (Dannenbergh, J. H. *et al.*, 2000). Un dos reguladores fisiolóxicos deste evento pode ser a Ciclina C. Viuse que un complexo de Ciclina C con Cdk3 estimula a fosforilación de pRb durante a transición G0/G1 e que esta fosforilación é necesaria para que as células saian de G0 de maneira correcta. De modo que a entrada na fase G1 é análoga á fase S, aínda que participan complexos Ciclina-Cdk diferentes. Recentemente comprobouse que a Ciclina C é un dos reguladores fisiolóxicos do tránsito G0/G1, debido a que os seus niveis de mRNA alcanzan os seus niveis máis altos durante a saída da fase G0. Observouse que se forma un complexo Cdk3-Ciclina C durante dita saída estimulando a fosforilación de pRb durante a transición G0/G1 e que esta fosforilación é necesaria para que as células saian de G0 de forma efectiva (Ren S. and Rollins B. J., 2004). Posto que a expresión de Ciclina C precede ás das Ciclinas de tipo D, propúxose que a inactivación das proteínas do tipo Rb durante a fase G1 temperá inflúa na súa fosforilación secuencial por Cdk3-Ciclina C e despois por Cdk4-CiclinaD e/ou Cdk6-CiclinaD (Ren S. and Rollins B. J., 2004). Cdk3 debe ter tamén un papel independente de Rb porque un mutante dominante negativo leva á célula a arresto celular en presenza do antixeno SV40 T, unha proteína que é coñecida por inactivar a familia das *pocket proteins* (Hofmann F. and Livingston D.M., 1996). Entre as funcións do complexo Cdk2-Ciclina E, ademais da fosforilación das proteínas do grupo de Rb, crese que se atopa a de colaborar no inicio da replicación do DNA, xa que se observou que unha vez que as células entran na fase S deben silenciarse o devandito complexo para evitar unha nova replicación do DNA. Este requisito acádase, en parte, pola rápida degradación da Ciclina E por unha

ubiquitin-ligasa (SCF-Fbxw7), seguida da súa escisión polo proteosoma. Ademais, sábese que este complexo participa na fosforilación doutros substratos como proteínas involucradas na modificación de histonas (NPAT, tamén coñecida como p220, HIRA, CBP/p300), replicación de DNA (Cdt1), reparación de DNA (BRCA1, Ku70) e duplicación e maduración do centrosoma (CP110, Mps1, nucleofosmina, tamén coñecida como B23). Por outra banda, participa na fosforilación do seu propio inhibidor, p27^{Kip1}, facilitando a degradación do mesmo polo proteosoma (Hwang H. C. and Clurman B.E., 2005). Durante a fase S prodúcese unha acumulación de Ciclina A xa que mediante a inactivación de Rb iníciase a transcrición do seu correspondente xene, así como doutros como o da Ciclina B, aínda que neste caso, a síntese non é tan evidente ata a transición G2-M. Propúxose que unha vez Cdk2 sepárase da Ciclina E, interacciona coa Ciclina A recentemente sintetizada. Os complexos resultantes (Cdk2-Ciclina A) participan na fosforilación de numerosas proteínas como reguladores de Ciclina A (pRb), factores de transcrición (E2F1, B-Mybs), proteínas que interveñen na replicación do DNA (Cdc6), reparadores do DNA (BRCA1) modificadores de histonas (HIRA), proteínas que cooperan na proteólise mediada por ubiquitina (Cdc20) e *checkpoints* de ciclo celular (p53, p21 Cip1, MDM2). En tódolos casos, proteínas que se cre que son requiridas para unha adecuada finalización e saída da fase S (Sherr C. J. and Roberts J.M., 1999).

2.4.- Fase G2–M

Cara ao final da fase S, as Ciclinas tipo A asócianse con Cdk1. Os complexos Cdk2-Ciclina A e Cdk1-Ciclina A comparten gran cantidade de substratos como as proteínas que participan na replicación de DNA, como son MCMs, Cdc7 ou R2, así coma outras proteínas involucradas no control da progresión do ciclo celular, como Rb, p53, BARD1 e BRCA2. Descoñécese se os complexos Cdk2–Ciclina A e Cdk1–Ciclina A xogan un papel fundamental durante a transición da fase S á G2. Con todo, durante a fase G2, as Ciclinas

tipo A son degradadas por proteólise mediante ubiquitinación mentres as Ciclinas tipo B son sintetizadas de forma activa. Como consecuencia, Cdk1 únese ás Ciclinas tipo B, unha asociación que se cre é esencial para a activación da mitose (Malumbres M. and Barbacid M., 2001). Cdk1 únese de forma preferente a dúas isoformas de Ciclina tipo B, B1 e B2. O papel da Ciclina B3 é aínda descoñecido. Aínda que algúns estudos parecen indicar que se asocia principalmente a Cdk1, tamén se suxeriu que pode desenvolver a súa función uníndose a Cdk2. A Ciclina B3 pode interactuar coa Cdk2, aínda que ten un pobre efecto sobre a actividade quinasa da histona H1. Estableceuse que Cdk2 pode ser parella da Ciclina B3 porque se viu o resultado da interacción Cdk2-Ciclina B3 en multitude de sistemas, aínda que todos fallan na activación da actividade quinasa de Cdk2 asociada á histona H1. Por outra banda, a expresión forzada da Ciclina B3 pode inducir unha retención da célula na anafase e mesmo máis en G1. A pesar de que o mecanismo polo que isto sucede descoñécese, pode suxerir que este arresto en G1 podería estar asociado coa capacidade da Ciclina B3 de valorar os niveis de Cdk2, permitindo a acumulación de cantidades suficientes de complexos Cdk2- Ciclina E ou Cdk2- Ciclina A. Descoñécese como a Ciclina B3 participa na saída da anafase (Nguyen T. B. *et al.*, 2002).

Pénsase que os complexos Cdk1-Ciclina B regulan gran cantidade de procesos tanto durante a transición G2-M como durante a progresión a través da mitose (Nigg, E.A., 2001). Estes complexos poden fosforilar máis de 70 proteínas nas células de mamíferos. Con todo, a lista de substratos alternativos de Cdk1-Ciclina B debe ser moito máis ampla, xa que se identificaron ata 200 substratos de Cdk1 en fermentos, a maioría dos cales dependen de Cdk1 para fosforilarse *in vivo* (Ubersax J.A. *et al.*, 2003).

Os complexos Cdk1-Ciclina B participan tamén en diferentes procesos reguladores e estruturais, especialmente a través de fosforilacións proteicas, como a condensación de cromosomas (interacciona con

histonas, HMG-I e RII α), fragmentación do aparello de Golgi (a través de Nir2, p47, GM130 e GRASP65) e ruptura da lámina nuclear (por fosforilación de diferentes láminas, receptor de lámina B e do complexo do poro nuclear). Outros substratos inclúen algunhas proteínas de unión a microtúbulos (dineína, MAP4, MAP1 B, tau), proteínas implicadas na replicación (MCM2, MCM4, ribonucleósido reductasa R2), translación (quinasa S6, EF-1), proteólise dependente de ubiquitina (Cdc20, Cdh1) e outras proteínas reguladoras involucradas na progresión mitótica e na saída da mitose (fosfatasas Cdc25, actopaxina Lats1). Por último, a inactivación dos complexos Cdk1-Ciclina B é necesaria para unha adecuada saída da mitose. Esta inactivación é levada a cabo pola degradación das Ciclinas tipo B vía ubiquitinación pola ruta proteolítica regulada polos complexos promotores da anafase (Harper J. W. *et al.*, 2002).

2.5.- Papel biolóxico de outras Cdks

A Ciclina dependente de quinasa 5 (Cdk5) é un membro da familia das Cdks que participa na regulación do ciclo celular. A pesar de que as Cdks requiren a unión ás proteínas activadoras Ciclina, no caso de Cdk5 actúa dunha maneira única dentro da familia; por unha banda, non se lle coñece unha función no ciclo celular e, a pesar de que se expresa en diversos tipos de tecidos, leva a cabo a súa acción unicamente no sistema nervioso. Por outra banda, as súas proteínas activadoras son p35 e p39, que son estruturalmente diferentes á Ciclina e teñen un patrón específico de expresión neuronal. Con todo, tamén puido verse que se une a Ciclinas de tipo E e tipo D, aínda que os complexos que se forman non teñen actividade quinasa (Kesavapany S. *et al.*, 2004).

Os complexos Cdk5-p35 e Cdk5-p39 fosforilan numerosos substratos involucrados na regulación da transcrición (mSds3, Stat3, p53), función neural (tiroxina hidroxilasa, Nudel, Amphiphysin 1, Munc18a), migración (Doublecortin, Disabled1) e transmisión sináptica (Synapsin1, PSD-95; Cruz J. C. and Tsai L. H., 2004).

Cdk7 forma parte, xunto a Ciclina H e MAT1, do complexo quinasa activador de quinases dependentes de Ciclina (CAK) que é responsable da fosforilación e activación de Cdk1, Cdk2, Cdk4 e Cdk6 e a regulación do ciclo celular. Ademais, xunto con outras 6 subunidades, CAK tamén forma parte do factor de transcrición xeral TFHII, onde está involucrado na liberación do promotor e na progresión da transcrición desde o preinicio ao estado inicial (Lolli G. and Johnson L. N., 2005).

En mamíferos, Cdk8 e Ciclina C son compoñentes do complexo da holoenzima RNA polimerasa II onde actúan como unha proteína quinasa que fosforila o dominio carboxi-terminal (CTD) da subunidade maior da RNA polimerasa II. O complexo Cdk8-Ciclina C tamén se atopa en numerosos complexos de proteínas similares a mediadores, que se viu que *in vitro* son capaces de frear a transcrición xa activada dun modo independente ao CTD. Puido verse tamén que Cdk8-Ciclina C pode regular a transcrición por sinalización de subunidades de Cdk7-Ciclina H do factor xeral de iniciación da transcrición IHH (TFIIH). Cdk8 fosforila a Ciclina H nos seus dominios amino-terminal e carboxi-terminal, o cal reprime a capacidade de TFIIH de activar a transcrición e a actividade quinasa de CTD. A fosforilación da Ciclina H por Cdk8 ten un efecto negativo no crecemento da célula (Akoulitchev S. *et al.*, 2000).

Cdk9, que se activa mediante as Ciclinas de tipo T e de tipo K, xera factores de elongación de transcrición positiva (P-TEFb). Estes P-TEFb regulan positivamente a elongación transcricional por fosforilación do dominio C terminal da RNA polimerasa II (Garriga J. and Graña X., 2004).

Cdk10 é unha quinasa afín a Cdc2 que está involucrada na regulación da fase G2-M durante o ciclo celular porque, tanto o mutante dominante negativo como o antisentido de Cdk10, frean o ciclo en G2-M, aínda que non se sabe moito das proteínas que interactúan con esta quinasa contribuíndo á súa función na célula.

Cdk10 interacciona co dominio N-terminal do factor de transcripción Ets2, que funciona como regulador da expresión de Cdk1. O factor Ets2 contén un dominio de transactivación altamente conservado, chamado dominio *Pointed*. O dominio *Pointed* está implicado nas interaccións entre proteínas e requírese que estea intacto para a súa unión a Cdk10 (Kasten M. and Giordano A., 2001).

A produción de mRNAs en todos os organismos vivos é un proceso extremadamente complicado que inclúe gran cantidade de actividades catalíticas como son a transcripción, nivelación, escisión e empalme, poliadenilación e exportación. Todos estes procesos son controlados por un amplo grupo de proteínas que forman complexos moi dinámicos que interaccionan co DNA e co pre-mRNA para coordinar estas actividades. As fosforilacións xogan un papel fundamental na regulación da formación, activación e inactivación destes complexos. Identificouse un crecente número de proteína-quinasas que son capaces de levar a cabo a fosforilación de proteínas involucradas na produción de mRNA. Cdk11 únese á Ciclina L e interactúa co principal precursor dos factores de empalme do mRNA, RNPS1 e 9G8. O complexo Cdk11–Ciclina L tamén interacciona coa RNA polimerasa II, xogando un papel na produción de transcritos e a regulación do procesado de RNA (Loyer P. *et al.*, 2005).

3.- LA SUPERFAMILIA RAS

Tanto os organismos unicelulares como os multicelulares responden a sinais expresados por outras células. A organización celular e a sinalización están fortemente influenciadas pola superfamilia Ras, de pequenas proteínas de unión a GTP, as cales manteñen un centro de unión a GTP conservado tanto no que se refire á súa estrutura como ao seu mecanismo, a pesar das diferenzas nas secuencias e na función. Estas proteínas de unión a GTP comparten unha actividade enzimática común, producindo GDP por hidrólise de GTP (figura 3; Vermellas A.M. *et al.*, 2012).

A superfamilia Ras de pequenas guanosinas trifosfatasas (GTPasa)

inclúe ao redor de 150 membros en humanos. Está dividida en cinco familias principais: Ras, Rho, Arf/Sar, Ran e Rab en función da súa secuencia e as súas similitudes funcionais. As proteínas de unión a nucleótidos de guanina regulan gran cantidade de procesos, como a síntese de proteínas, variados procesos de transporte e crecemento celular e diferenciación. Actúan como interruptores moleculares e temporizadores do ciclo entre os estados inactivo, de unión a guanosina difosfatasa (GDP), e activo, unido a guanosina trifosfatasa (GTP). Estudos recentes mostran que o propio sistema interruptor conserva un módulo fundamental pero que os seus reguladores e efectores son variados tanto nas súas estruturas como nos seus modos de interacción (Vetter I.R. and Wittinhofer A., 2001).

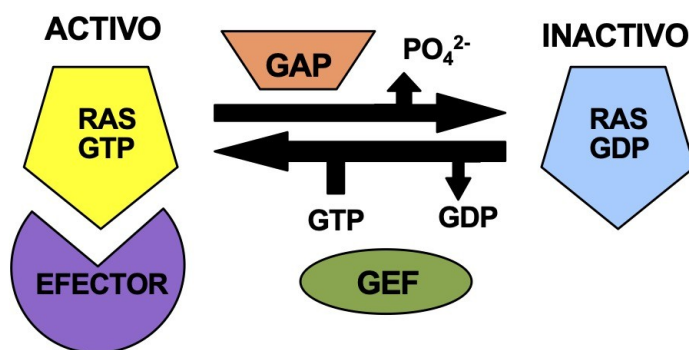


Figura 3. Equilibrio entre as formas GTP e GDP. GEFs e GAPs regulan a cantidade relativa de cada unha das formas.

Estas proteínas comparten unha serie de elementos de unión a GDP/GTP empezando pola rexión N-terminal. G1, GXXXXGKS/ T; G2, T; G3, DXXFQ/ H/ T; G4, T/ NKXD e G5, C/ SAK/ L/ T. Estes elementos forman un dominio G de, aproximadamente, 20 kDa que teñen unha estrutura e unha bioquímica conservada, compartida por tódalas proteínas da superfamilia Ras, así como por outras GTPasas.

Identificouse unha secuencia consenso que define a unha proteína como proteína de unión a GTP. Esta secuencia consenso inclúe os elementos GXXXXGK, DXXG e NKXD con espazos de 40 a 80 aminoácidos entre a primeira e a segunda secuencia e entre a segunda e a terceira (figura 4; Dever T.E. *et al.*, 1987).

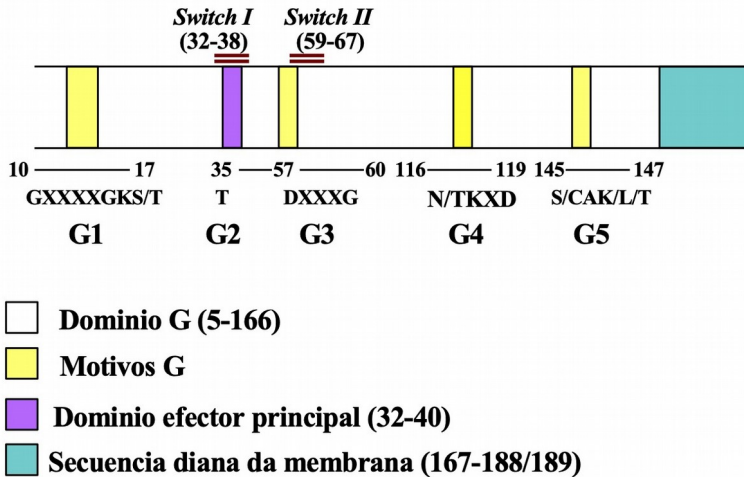


Figura 4. Estrutura do dominio funcional da superfamilia Ras.

3.1.- La familia Ras

A familia de oncoproteínas Ras (*Ras sarcoma*) está composta por 36 membros da superfamilia de Ras e foron obxecto de intensos estudos debido, en gran parte, ao seu papel fundamental en oncoxénese humana (Repansky G.A. *et al.*, 2004). Estas proteínas serven como nodos activados de sinalización en resposta a diversos estímulos extracelulares, interactuando con diversos efectores da cascada os cales regulan desde as redes de sinalización citoplasmática ou o control de expresión xénica á regulación da proliferación celular, a diferenciación e a supervivencia.

A ruta de sinalización mellor caracterizada de Ras é a activación de

Ras polo factor de crecemento epidérmico tirosina quinasa RasGEF Sos (figura 5; Repasky G.A. *et al.*, 2004). Únese a Ras activado e promove a translocación da quinasa serina/treonina Raf á membrana plasmática, onde fosforilacións posteriores promoven a activación total da quinasa Raf. Raf fosforila e activa a quinasa específica MEK1/2, que á súa vez, fosforila e activa a MAP quinasa ERK1/2. ERK activado se trasloca ao núcleo onde fosforila factores de transcrición da familia Ets, os cales activan os promotores da resposta a Ets.

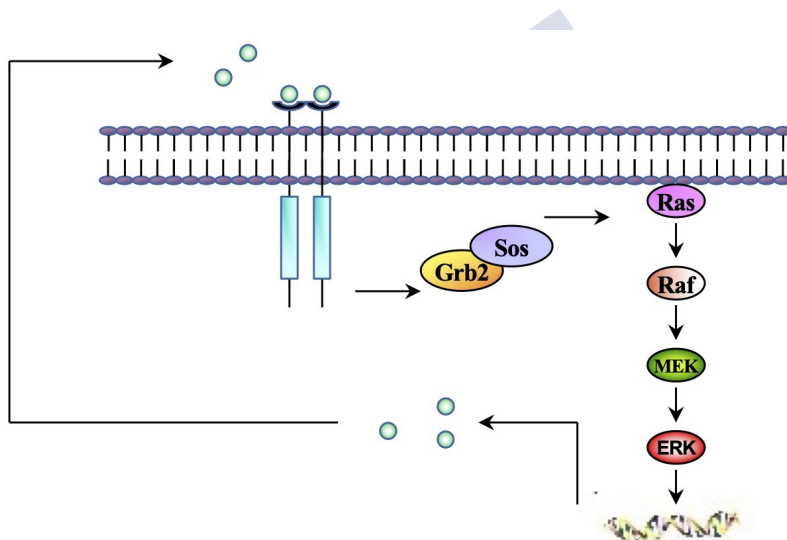


Figura 5. Ruta de activación Raf/MAPK/ERK.

Viuse que a transformación inducida por Ras é eficiente a condición de que se atopen activados diversos efectores directos agregados á MAP quinasa Ras e vese inhibida cando se produce a inactivación da ruta PI3-quinasa. Relacionouse o reordenamento da actina coa capacidade dos mutantes de Ras de activar a PI3-quinasa. A

capacidade Ras activado de estimular PI3K ademais de Raf é, por tanto, importante na transformación de células de mamíferos e esencial na reorganización do citoesqueleto inducida por Ras (Rodriguez Viciano *et al.*, 1997).

Outras proteínas da familia Ras, como son Rap, R-Ras, Ral ou Rheb tamén regulan redes de sinalización. Por último, aínda que son bioquimicamente similares a Ras, moitas proteínas da familia parecen actuar como supresores de tumores, máis que como oncoxenes durante o desenvolvemento tumoral (como Rerg, Noey2 e D-Ras; Colicelli J., 2004).

4.- P53

O xene P53 foi descrito por primeira vez en 1979 e foi o primeiro xene supresor de tumores identificado. Posteriormente, viuse que a proteína p53 atópase alterada na maioría dos cancros humanos, e que na metade destes casos, esta alteración débese a unha mutación no xene de p53, aínda que tamén pode deberse a causas indirectas, como pode ser a elevación dos niveis de inhibidores de p53, como MDM2, ou por unha diminución das moléculas que actúan favorecendo a activación da vía p53, como p14^{ARF} (Hayon I. L. and Haupt E., 2002).

O supresor de tumores p53 regula o crecemento celular en función dos estímulos extracelulares que recibe, como son os de crecemento e supervivencia, da intensidade dos sinais de estrés e doutros factores como poden ser o tipo celular, o estado oncoxénico da célula, destacando o balance Rb/E2F ou o nivel de expresión de p53 e a súa interacción con proteínas específicas celulares. En función destes factores p53 pode inducir tanto o arresto do crecemento celular, que impide a replicación de DNA danado, como a morte celular programada (apoptose), que elimina células defectivas (Sionov R.V. and Haupt E., 1999).

4.1.- Estrutura de p53

En humanos, o xene de p53 atópase situado no brazo curto do cromosoma 17 (17p13). O xene ten aproximadamente 22000 bp e organízase en 11 exóns que codifican un mRNA de 2.2 kb. A tradución comeza no exón 2 (figura 6)

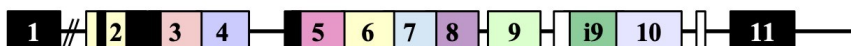


Figura 6. Esquema da estrutura do xene p53 humano.

A proteína p53 é un polipéptido de aproximadamente 400 aminoácidos (393 en humanos). Atópase en forma de tetrámeros e únese directamente ao DNA (Friedman P., Chen X., Bargonetti J. and Prives C., 1993).

Esta presenta, polo menos, dous dominios de oligomerización autónomos: un dominio forte de tetramerización, que é a rexión C-terminal, e un dominio débil, que é a rexión central de unión ao DNA (figura 7). Estes dominios son fundamentais na formación dos tetrámeros e na asociación de tetrámeros na proteína *wild type* (Wang P. *et al.*, 1994).

Actúa como factor de transcrición que pode levar a cabo a súa acción ben activando ou ben inhibindo a transcrición de gran número de xenes, incluíndo p21^{WAF1}, GADD45, 14-3-3 σ , bax, Fas/APO1, KILLER/DR5, PIG3, Tsp1, IGF- BP3 e outros (o-Deiry W.S., 1998).

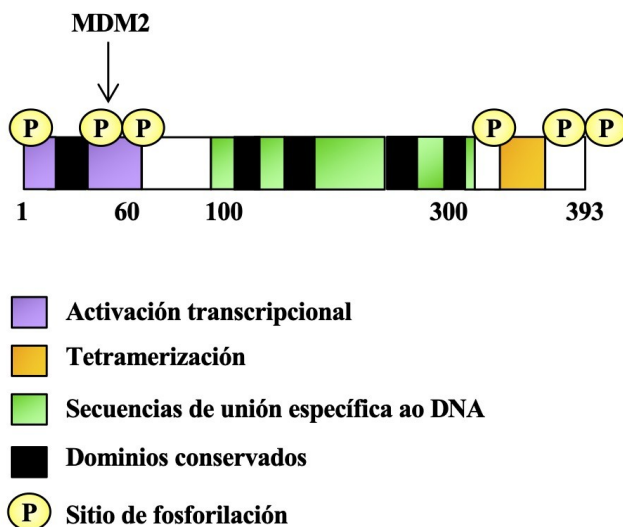


Figura 7. Esquema da estrutura da proteína p53.

A actividade de p53 en células normais debe estar altamente controlada xa que ten efectos inhibitorios sobre o crecemento celular. Hai múltiples mecanismos que regulan a actividade de p53 debido á importancia de restrinxir a súa actividade en condicións de ausencia de estrés oncoxénico. A pesar de que pode estar regulada por factores como NF- κ B ou HOXA, o principal mecanismo de control da súa actividade vén dado polos seus niveis. De aí a importancia da regulación da estabilidade da proteína.

4.2.- Estabilización de p53

p53, a miúdo chamado “gardián do xenoma”, exerce as súas capacidades como supresor tumoral coordinando un circuíto regulador que monitora e responde a unha gran variedade de sinais de estrés, incluíndo o dano ao DNA, eventos oncoxénicos anormais, erosión telomérica e hipoxia (Horn H. F. and Vousden K.H., 2007; Vousden

K.H. and Lane D.P., 2007). p53 é un factor de transcripción secuenciación específico e responde a eses eventos de estrés mediante a regulación da progresión do ciclo celular, apoptose, reparación do DNA, senescencia, metabolismo celular ou autofaxia (Kruse J. P. and Gu W., 2009). Certos estudos suxiren que unha actividade pouco convencional de p53, como a regulación metabólica e a función antioxidante, son fundamentais na supresión de tumoroxénese espontánea en fase temperá (Li T. *et al.*, 2012).

Co obxecto de coordinar a gran variedade de procesos celulares, p53 precisa unha refinada e complicada regulación que consiste en numerosos moduladores, tanto positivos como negativos. En homeostase, o nivel de p53 mantense baixo e a función de p53 é reprimida por reguladores negativos HDM2 (en ratos o seu ortólogo é mdm2) e HDMX (en ratos mdmX; Kruse J. P. and Gu W., 2009). Baixo condicións de estrés, con todo, p53 é estabilizado, desaparece a represión, e é activado nunha sección específica do seu promotor.

Un dos principais mecanismos polos que a actividade de p53 é regulada é a través do control da estabilidade proteica. Viuse que se realiza a través da degradación dependente do proteosoma seguido de ubiquitinación (Dai C. and Gu W., 2010). A través dunha serie de pasos, múltiples copias dun pequeno péptido chamado ubiquitina son engadidos a p53. Estas cadeas de ubiquitina actúan como marcador facendo posible que p53 sexa detectado pola maquinaria de degradación de proteínas. A proteína MDM2 ten actividade ligasa E3 e é un dos enzimas involucrados na marcaxe de p53 con ubiquitina. Este proceso está suxeito a ciclos de retroalimentación, de modo que p53 únese á rexión reguladora do xene de MDM2, estimulando a súa transcripción. Á súa vez, a proteína únese a p53 e favorece a unión de grupos ubiquitina que provocan a súa degradación. Ao diminuír os niveis de p53, diminúe tamén a transcripción de MDM2, polo que a degradación de p53 sería menor e os seus niveis volverían aumentar (Vogelstein B., Lane D. and Levine A. J., 2000).

MDM2 é fundamental na regulación de p53 en ausencia de factores exógenos, de tal maneira que se observou que a eliminación de MDM2 en ratos provoca letalidade embrionaria por apoptose. Dita letalidade vese revertida en caso de eliminación de p53, obténdose embrións normais e viables, aínda que cunha maior tendencia a desenvolver tumores pola ausencia de p53 (Jones S. N., Roe A.E., Donehower L.A. and Bradley A., 1995).

Ademais de regular a estabilidade de p53 por ubiquitinación, Mdm2 interacciona coa rexión N-terminal de p53 que contén o dominio transcricional principal (Momand J., Zambetti G. P., Olson D., George D. and Levine A. J., 1992). Debido a esta interacción, interfire na actividade de p53 impedindo que se una a coactivadores transcricionais, como p300/CBP (Wadgaonkar R. and Collins T., 1999).

Polo visto anteriormente, a regulación dos niveis de Mdm2 é fundamental para a regulación de p53, xa que interaccionan e regúlanse mutuamente. Unha diminución nos niveis de Mdm2 provoca a estabilización de p53 e o inicio da súa función como factor transcricional.

Descríbironse numerosas ubiquitin-ligasas con MDM2 xogando un papel predominante tanto no control dos niveis basais de proteína p53 nas células sen estrés como restablecendo devanditos niveis tras a resposta a unha situación de estrés (Grossman S. R. *et al.*, 2003; Haupt E. *et al.*, 1997; Kubbutat M. H. *et al.* 1997; Shi D. *et al.*, 2009; Chen D. *et al.*, 2005).

Unha das causas de inhibición da expresión de Mdm2 son os sinais de estrés oncoxénico, como radiación ultravioleta, hipoxia ou substancias citotóxicas; neste caso, redúcense os niveis de mRNA de MDM2, e por tanto da proteína, por unha ruta independente de p53, provocando un incremento dos niveis de p53. A proteína p53 atópase entón activada e actuando como factor transcricional o que lle permite levar a cabo as súas funcións iniciando a apoptose ou o arresto celular (Freedman D.A., Wu L. and Levine A. J., 1999).

Por outra banda, Mdm2 pode ser fosforilado por diversos residuos en

dúas rexións concretas, o dominio N-terminal de unión a p53 e a rexión central acídica, que participa no transporte núcleo-citoplasma, na unión de p19^{ARF} e na ubiquitinización de p53 (Hai T. J. and Meek D. W., 2000). A fosforilación de MDM2 pode ocorrer de maneira dependente de ATM e actuar en distintos lugares. Así, pode interferir na unión de MDM2 con p53 por fosforilación na rexión amino-terminal ou ben, impedir a ubiquitinización de p53 por actuar no dominio carboxi-terminal (Khosravi R. *et al.*, 1999).

A ubiquitinación proteica é un proceso reversible e describíronse moitas familias enzimáticas con capacidade desubiquitinadora incluíndo o OTU, as proteasas ubiquitin-específicas (USPs), a hidrolasa ubiquitin C-terminal (UCHs), MJD e as metaloenzimas Jab1/MPN/ Mov34 (JAMM) (Nijman S.M. *et al.*, 2005). As enzimas desubiquinadoras (DUBs) demostraron un papel na escisión da ubiquitina desde os precursores traslacionais e no mantemento dos niveis de ubiquitina libre na célula. Por iso, estas actividades poden antagonizar as funcións da ubiquitinación na célula (Komander D., Ciague M. J. and Urbé S., 2009).

OTUD5 pertence a unha subfamilia de 14 DUBs caracterizada por ter un dominio OTU. Observouse que OTUD5 xoga un papel fundamental na resposta de p53 ao estrés por dano xenómico xa que interacciona directamente con p53, formando un complexo e controlando o seu ubiquitinación. É requirida para permitir a rápida activación da transcrición e a apoptose dependentes de p53 en resposta ao dano do DNA por estrés (Luo J. *et al.*, 2013).

Ademais, pequenas modificacións nas ubiquitinas (SUMO-1) ou a acción de proteínas como p19^{ARF}, poden tamén favorecer a estabilización de p53 ao impedir unha ubiquitinización eficaz. Tamén pode producirse a formación de complexos de MDM2 con proteínas como p19^{ARF} ou pRb, que levan consigo o inicio da transcrición dependente de p53 (Buschmann T. *et al.*, 2000).

4.3.- Activación da ruta de p53

p53 actívase en resposta a unha variedade de sinais de estrés celular como é o dano ao DNA, a activación de oncoxenes, e a depleción de nucleótidos (Mandinova A. and Le S. W., 2011; Vousden K. H. and Prives C., 2009). Como un auténtico factor de transcripción, p53 transactiva os seus xenes diana en resposta a estes sinais de estrés, resultando en arresto de ciclo celular, senescencia ou apoptose, o que prevén a proliferación de células danadas (Brooks C. L. and Gu W., 2010).

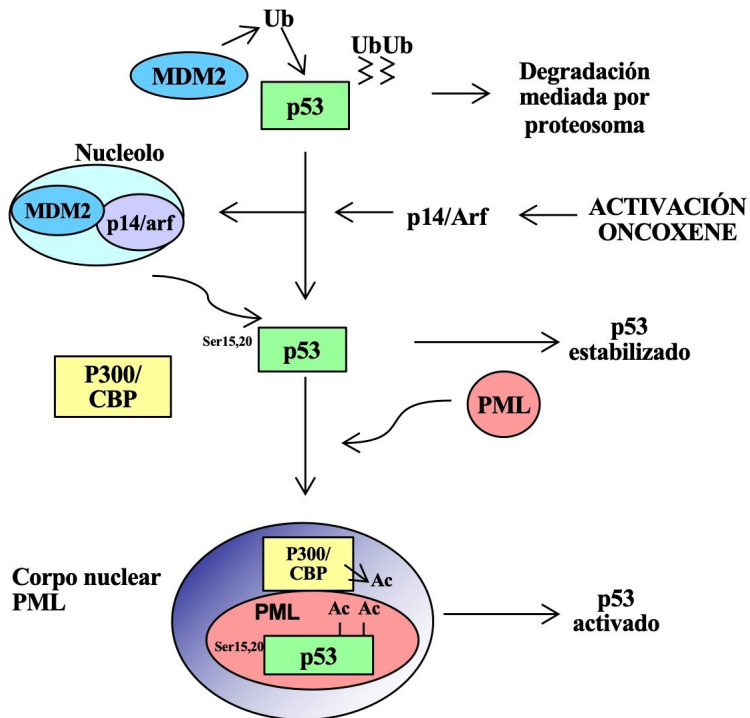


Figura 8. Activación de p53 mediada por oncoxenes.

A ruptura dunha molécula dunha cadea dobre de DNA pode ser suficiente para provocar o incremento dos niveis de p53 (figura 8). Ademais da elevada sensibilidade que esta ruta presentaba polo dano no DNA, observouse que podía ser activada por outros sinais. De feito, coñécense polo menos tres rutas independentes polas que a vía de p53 pode estar activada:

- dano no DNA, como pode ser o causado por radiación ionizante. Neste caso, a activación da vía de p53 depende de dúas proteínas quinases, ATM e Chk2, que fosforilan os residuos Ser15 e Ser20 de p53. ATM actúa en presenza de rupturas de dobre fío mentres que Chk2 é, á súa vez, estimulada por ATM (Hirao A. *et al.*, 2000)
- sinais de proliferación aberrantes, por expresión de oncoxenes como Ras ou Myc. Neste caso, a activación da vía depende de p19^{ARF}, debido á súa interacción con Mdm2 (Sherr C. J. and Weber J. D., 2000)
- a través de substancias quimioterápicas, radiación UV e inhibidores da proteína-quinasa. Neste caso, a activación é independente de ATM, Chk2 ou ARF, pero si están involucradas ATR e Casein-quinasa II (Meek D. W., 1999).

4.4.- Consecuencias da activación da ruta de p53

A activación de p53 está ben estudada e implica o recrutamento directo dos tetrámeros de p53 aos seus elementos resposta en presenza dos promotores dos xenes diana (Kitayner M. *et al.*, 2006). Foron identificadas máis de 100 dianas transcricionais directas de p53 (Riley T. *et al.*, 2008).

Unha vez estabilizada e activada a proteína de p53, comeza a desenvolver a súa función como factor transcricional, que pode ter un efecto activador ou pode tamén reprimir transcricionalmente a expresión dun gran número de xenes (Ho J. and Benchimol S., 2003). Esta represión pode ocorrer de modo directo ou indirecto. Os

mecanismos directos implican o recrutamento de p53 ás rexións promotor dos xenes diana (Vousden K. H. and Prives C., 2009; Bohlig L. and Rother K., 2011). Observouse que isto ocorre ben mediante a unión directa de p53 ao elemento de resposta ou ben mediante a interacción doutros factores de transcrición aos seus respectivos lugares de unión (Bohlig L. and Rother K., 2011).

A represión indirecta mediada por p53 viuse a través da activación da súa diana transcricional directa, p21 (Laptenko O. and Prives C., 2006), que é un membro da familia Ink4a/Cip1 de inhibidores de Ciclinas dependentes de quinasa (Cdk), inducendo a parada do ciclo celular ao unirse e inhibir os complexos Cdk4-Ciclina D e Cdk6-Ciclina D o que resulta nunha defosforilación e activación da proteína retinoblastoma Rb, a cal secuestra ao factor de transcrición E2F reprimindo a transcrición dos xenes involucrados no ciclo celular (Sherr C. J. and Roberts J.M., 1999). O mecanismo de represión a través de p21 implica o recrutamento dos complexos de represión E2F4 a estes promotores diana. A indución de p16 tamén desregula as dianas de represión de p53, o que implica a participación da ruta compartida Rb-E2F. Móstrase como en resposta da indución de ámbolos dous, p53 e p21, os complexos E2F4 son especificamente recrutados aos promotores das dianas de represión de p53 (Benson E. K. *et al.*, 2013).

En resumo, os xenes aos que modula p53 poden levar a cabo catro tipos de funcións:

- **Regulación do ciclo celular.** Por estimulación directa da expresión de p21^{WAF1/CIP1}, que como se viu anteriormente, é un inhibidor das Cdks. De feito, p21^{WAF1/CIP1} inhibe a actividade de Cdk4 e Cdk2 xa que unha vez activado, únese tanto ao complexo Cdk4-Ciclina D como a Cdk2-Ciclina E inhibindo a súa actividade quinasa. (Hei G. *et al.*, 2005). Ademais, outras proteínas como 14-3-3 σ ou Reprimo poden interferir cos complexos Ciclina-Cdk provocando o arresto celular.

- **Apoptose.** Gran cantidade dos xenes activados por p53 son responsables do inicio da morte celular programada. Así, BAX, regulado transcricionalmente por p53, pertence á familia de Bcl-2 e é mediador da apoptose inducida (Selvakumaran M. *et al.*, 1994). Viuse tamén que o xene p53 AIP1 é diana de p53. A proteína mitocondrial p53 AIP1 induce apoptose por perda de $\Delta\psi_m$, potencial da membrana interna da mitocondria (Oda K. *et al.*, 2000). Así mesmo, unha sobreexpresión da proteína mitocondrial NOXA induce apoptose (Oda E. *et al.*, 2000). Tamén os receptores TNF e Fas poden desencadear a morte celular programada. Doutra banda, p53 pode provocar apoptose, por estimulación mitocondrial, que produce un exceso de especies reactivas de osíxeno (ROS) altamente tóxicas (Volgstein B., Lane D. and Levine A. J., 2000).

- **Inhibición da neovascularización.** Durante o desenvolvemento tumoral, prodúcese un proceso de anxioxénese, crecemento de novos vasos que permiten ás células oncoxénicas obter o osíxeno e os nutrientes que precisan para seguir crescendo. Neste punto, p53 actúa impedindo esa nova vascularización xa que regula a transcrición de xenes como Tsp1 e BAI1, que provocan a inhibición da anxioxénese (Nishimori H. *et al.*, 1997; Van Meir E. G. *et al.*, 1994).

- **Estabilidade xenética.** p53 pode controlar a reparación do DNA, evitando a acumulación de erros que poden conducir ao desenvolvemento dun proceso oncoxénico, xa que regula a transcrición de xenes como p53 R2, que codifica unha ribonucleótido-reductasa capaz de promover a reparación do DNA sometido a estrés oncoxénico (Tanaka H. *et al.*, 2000).

5.- RB

Hai máis de 50 anos, observouse un tumor infantil que se manifestaba de forma espontánea (Falls H. F. and Neel J.V., 1951), o retinoblastoma, e, a pesar de ser pouco frecuente, a súa xenética atípica ofreceu unha ferramenta coa que comprender a etioloxía dalgúns cancros humanos. Barallouse a hipótese de que o retinoblastoma fose o resultado de dúas mutacións e que o fenotipo tumoral non se manifestase a menos que ámbalas copias do xene estivesen danadas, fosen os eventos herdados ou espontáneos (Knudson A. G., 1971). A clonación do xene de retinoblastoma (RB; Friend S. H. *et al.*, 1986) e a identificación das mutacións bialélicas de RB nos tumores retinoblastoma serviron de apoio para a hipótese dos dous eventos e validaron o concepto de xene supresor de tumores. Numerosos tumores humanos presentan mutacións e deleccións no xene de Rb e a perda alélica herdada incrementa a susceptibilidade á oncoxénese (Dunn J.M. *et al.*, 1988).

5.1.- *Pocket proteins*

A proteína retinoblastoma (pRB) e os seus aíns, p107 e p130 configuran a familia de proteínas reguladoras do ciclo celular chamadas *pocket proteins* (o termo *pocket protein* deriva da rexión *pocket* de unión, altamente conservada). Estas proteínas son coñecidas polo seu papel de contención na transición G1-S mediante a regulación dos xenes de resposta E2F. pRB e o par p107/p130 son necesarios na represión de distintos conxuntos de xenes, principalmente a través da súa interacción selectiva cos xenes E2F que se asocian a elementos específicos do promotor. Ademais de regular os xenes E2F de maneira reversible, as *pocket proteins* contribúen ao silenciamento dos devanditos xenes en células que experimentan senescencia ou diferenciación. Afectan tamén á transición G1-S a través de mecanismos independentes de E2F, como son a inhibición de

Cdk2 ou a estabilización de p27^{Kip1}, que están implicados no control da saída de G0.

Observouse que RB estaba mutado en multitude de tipos tumorais, como cancro de pulmón (Harbour J. W. *et al.*, 1988), mama (Le E.E. *et al.*, 1988) ou vexiga (Horowitz J.M. *et al.*, 1989), e que a proteína que codifica, pRb, está amplamente expresada e regulada de maneira importante e que ten un papel fundamental no ciclo celular (Le W. H. *et al.*, 1987; Buchkovich K. *et al.*, 1989). Estudos posteriores mostraron que pRb actúa de forma conxunta coas súas dúas proteínas afíns, p130 e p107, regulando a proliferación na maioría, senón en todos, os tipos celulares (Harrington E.A. *et al.*, 1998; Smith E. J. *et al.*, 1998). Parece evidente que as *pocket proteins* son as participantes principais dunha rede de regulación de xenes que organiza a resposta celular a sinais antimitoxénicas e cuxa desregulación constitúe un dos acenos de identidade do cancro (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2000).

5.2.- Estrutura de Rb

O xene humano RB1 está localizado no brazo longo do cromosoma 13 (13 q14). Consta de 200 kb e organízase en 27 exóns que codifican un mRNA de 4,7 kb (figura 9). A proteína pRb é un polipéptido de 110 kDa de peso e 928 aminoácidos. A lonxitude dos exóns individuais varía entre os 32 e os 1.889 bp. Por outra banda, os intróns varían de tamaño entre as máis de 60 kb que mide o máis extenso e as 80 bp o menor (Friend S. H. *et al.*, 1986; Hong F.D. *et al.*, 1989). RB contén dous dominios estruturados coñecidos como o N-terminal e o dominio *Pocket*, así como un dominio C-terminal (RbC), duns 150 residuos.

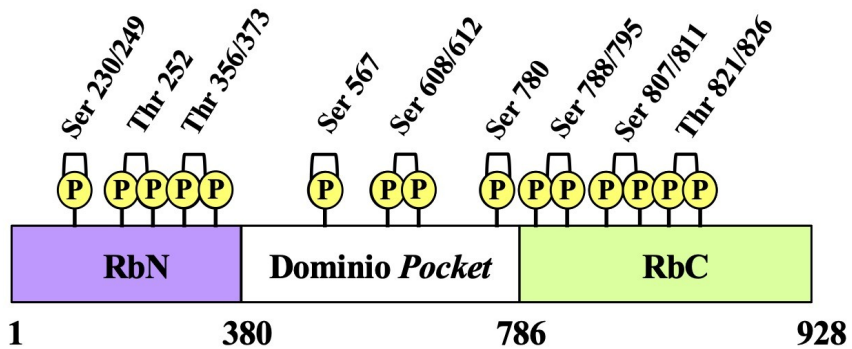


Figura 9. Estrutura do xene RB.

A transcripción de RB iníciase en múltiples puntos e as secuencias que rodean os sitios de iniciación teñen un alto contido en G e C. Moitas características do promotor do xene RB1 lembran características asociadas cos xenes *housekeeping*, seguindo o seu patrón de expresión ubicua (Hong F.D. *et al.*, 1989).

A rexión carboxi-terminal é fundamental xa que contén o sinal de localización nuclear (NLS) e os dominios responsables de HDAC1. O NLS controla o transporte das proteínas Rb dende o citoplasma ao núcleo; está formado por dous grupos de residuos básicos separados por un tramo de aminoácidos incluíndo residuos de prolina (Dingwall C. and Laskey R.A., 1991). O sinal de localización nuclear funciona tamén para transportar as proteínas E2F4 e E2F5, as cales non presentan o NLS.

A rexión carboxi-terminal é tamén responsable da interacción con diversas moléculas: é necesaria e suficiente para a formación dun complexo Rb-PP1c inhibindo a actividade catalítica do enzima (Tamrakar S. and Ludlow J. W., 2000), presenta unha secuencia que interacciona cos complexos Ciclina-Cdk (Adams P.D. *et al.*, 1999), únese fisicamente a Mdm2, de forma que esta inhibe a súa función de regulación do crecemento (Xiao Z. *et al.*, 1995), combínase coa rexión N-terminal de Skp2 interferindo na unión de Skp2 con p27 e

impedindo a ubiquitinación desta (Ji P. *et al.*, 2004), inhibe a acción quinasa da tirosina quinasa nuclear c-Abl ao unirse á súa rexión C-terminal (Welch P. J. and Wang J.E., 1995).

A familia das proteínas Rb mostran unha conformación estérica peculiar debido á rexión *pocket*, que é responsable de moitas das interaccións proteína-proteína na homeostase do ciclo celular (Paggi M.G. *et al.*,1996). A rexión *pocket* está caracterizada estruturalmente por dous dominios funcionais conservados (A e B) separados por un espazador (S), que varía en función da proteína. Membros da familia E2F de factores de transcrición interactúan cos dominios A e B da zona *pocket* (Puri N. *et al.*, 1999), así como proteínas que posúan o motivo LXCXE, como as oncoproteínas de moitos virus tumorais (Le J. Ou. *et al.*, 1998), as Ciclinas de tipo D (Weinberg R.A., 1995) e HDAH.

5.3.- Activación e inactivación de RB. Consecuencias no control do ciclo

Nun tecido normal, operan múltiples sinais antiproliferativas para manter a homeostase celular e tisular, entre as que se inclúen distintos inhibidores do crecemento que se atopan aloxados na matriz extracelular e nas superficie das células próximas. Estes sinais inhibitorios do crecemento, como ocorre coas activadoras, recíbense nos receptores transmembrana da superficie celular axustados a circuítos de sinalización interna. Os sinais antirecemento poden bloquear a proliferación por dous mecanismos diferentes. Por unha banda, as células poden saír do ciclo proliferativo entrando en quiescencia (G0), que abandonarán no futuro se os sinais extracelulares o permiten, e, de forma alternativa, as células poden verse obrigadas a renunciar ao seu potencial proliferativo de forma permanente ao inducirse o seu paso a estados posmitóticos,

xeralmente asociados á adquisición de trazos específicos asociados a diferenciación (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011).

Gran parte dos circuitos que permiten a células normais responder os sinais de crecemento asócianse cun mecanismo de control do ciclo celular que regula o tránsito da célula a través da fase G1 do ciclo. As células rastrexan o seu ambiente externo nese momento e, en base aos sinais detectados, deciden se proliferan, entran en repouso, ou evolucionan a un estado posmitótico.

A nivel molecular, moitos, senón todos, os sinais antiproliferativos son canalizados a través da proteína retinoblastoma (pRb) e as súas dous afíns, p107 e p130. Cando se atopa nun estado hipofosforilado, pRb bloquea a proliferación mediante o secuestro e a alteración da función de factores de transcrición E2F que controlan a expresión de xenes esenciais para a progresión de G1 á fase S (Weinberg R.A., 1995; Nevins J. R., 1992).

Como pode verse na figura 10, os complexos formados entre as *pocket proteins* e os membros da familia E2F modulan o funcionamento dunha rede que controla o avance da división celular. En concreto, régúlase a transcrición dos xenes que controlan a entrada en mitose e a progresión a través da mesma, e coordinan estes programas do ciclo celular con mecanismos transcricionais a través dos cales se dirixe o control dos *checkpoints*, a resposta ao dano no DNA, a apoptose, a diferenciación e o desenvolvemento (Ishida S. *et al.*, 2001; Muller H. *et al.*, 2001; Polager S. *et al.*, 2002; Ren B. *et al.*, 2002; Weinmann A.S. *et al.*, 2002; Dimova D. K. *et al.*, 2003). Por tanto, a liberación de E2Fs do seu complexo con Rb ten consecuencias moito máis amplas que o simple aumento da proliferación. Tamén explica a propensión das células tumorais a entrar en apoptose, a presentar defectos na regulación dos *checkpoints*, a ter unha resposta alterada ao dano no DNA e a resistir os efectos dos axentes de diferenciación.

En caso de producirse a fosforilación de Rb, libérase E2F permitindo o avance do ciclo e, por tanto, a proliferación celular.

Alguns factores de sinalización como TGF-beta, actúan tratando de impedir a fosforilación que inactiva pRb. Para iso, pode actuar suprimindo a expresión do xene c-myc, que regula a maquinaria do ciclo en G1 (Pietenpol J.A. *et al.*, 1990). Tamén pode favorecer a síntese de inhibidores de Ciclinas dependentes de quinasa como p15^{INK4} (Rich J. N. *et al.*, 1999) e p21, o que diminúe a actividade das Cdk2, favorecendo a hipofosforilación de pRb (Datto M. B. *et al.*, 1997).

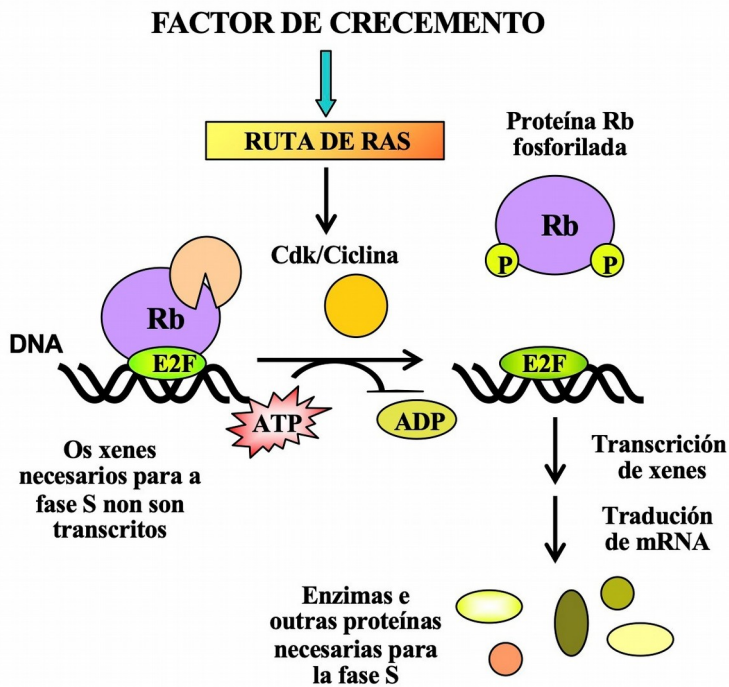


Figura 10. Ruta de activación/desactivación de Rb mediante a unión a E2F segundo o seu grao de fosforilación.

A ruta de actuación de pRb, que como se indica anteriormente, está controlada en parte tanto polo factor TGF-beta como por outros factores extrínsecos, pode verse interrompida ou alterada de diversas formas nos diferentes tipos tumorais (Fynan T.M. and Reiss M., 1993):

- perda da capacidade de resposta a TGF ben por unha desregulación dos receptores TGF ou ben pola existencia de receptores disfuncionais, como ocorre no receptor TGF-beta tipo II (Fynan T.M. and Reiss M., 1993; Markowitz S. *et al.*, 1995)
- eliminación da proteína citoplasmática Smad4, que intervén na ruta de sinalización de TGF-beta actuando mediante ligandos nas súas dianas, por deleción ou mutación intraxénica (Miyaki M. and Kuroki T., 2003).
- alteración da función dos inhibidores de quinasa dependente de Ciclina, p15^{INK4B} e p16^{INK4A}, por mutación do locus INK (Chin L. *et al.*, 1998; Caputi M. *et al.*, 2005).
- perda da capacidade de resposta de Cdk4 ás accións inhibitorias de p15^{INK4B} debido a mutacións con alteracións de aminoácidos, Arg24Cys, no seu dominio de interacción INK4A/B, que non afectan, con todo, á súa capacidade de unirse a Ciclinas. Os complexos Cdk4-Ciclina D resultantes teñen entón vía libre para inactivar pRb por hiperfosforilación (Zuo L. *et al.*, 1996)
- deleción ou mutación do xene de RB perdéndose a proteína Rb funcional, obxectivo final desta vía. A perda da heterocigosidade dos xenes supresores de tumores é observada en gran variedade de tumores celulares, incluíndo retinoblastomas, osteosarcomas e carcinomas de pulmón (Bignon E. J. and Rio P., 1993).
- interrupción da función de pRb en certos tumores inducidos por virus, os carcinomas cervicais en particular, debido ao seu secuestro mediante oncoproteínas virais que se asocian a ela formando complexos e desprazando a E2F, como ocorre coa oncoproteína E7 do virus do papiloma humano tipo 16 (Dyson N. *et al.*, 1989). De modo similar ocorre en linfomas non Hodgkin e linfoma de Burkitt asociados a SIDA (Cinti C. *et al.*, 2000; Lazzi S. *et al.*, 2002).

- desactivación da expresión de integrinas e outras moléculas de adhesión celular que envían sinais anticrecemento por parte das células tumorais, favorecendo en cambio os que transmiten sinais de crecemento; estes sinais anticrecemento baseadas en adherencia é probable que tamén interveñan na ruta de pRb.
- sobreexpresión da Ciclina D1 que provoca unha fosforilación constitutiva de Rb e por tanto, perda da regulación de E2F, presente en numerosos tipos tumorais como adenomas paratiroideos, linfomas de células B ou carcinomas de células escamosas (Hunter T. and Pines J., 1994). Observouse que esta desregulación pode aparecer tamén noutras Ciclinas de G1 como D2, D3 e E asociadas a tumoroxénese (Keyomarsi K. *et al.*, 1995).

O concepto e a importancia da perda dun supresor tumoral no cancro quedan reflectidos no feito de que o papel de Rb como nodo de control do circuíto de regulación da proliferación celular vese alterado, dun modo ou outro, na maioría dos cancros humanos (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011; Malumbres M. and Barbacid M., 2001).

5.4.- Outras funcións de Rb

Moitos dos aspectos da función de pRb no ciclo celular coñécense desde hai máis de 20 anos (Weinberg R.A., 1995). Por entón, sabíase que pRb era unha proteína nuclear que se atopaba hipofosforilada en repouso ou fase G0 e que incrementaba o seu nivel de fosforilación durante o paso por G1, manténdose hiperfosforilada durante a mitose. A represión exercida polas proteínas Rb require os dominios A e B conservados das *pocket protein* e parece implicar a asociación doutras proteínas ademais dos factores E2F. As proteínas Rb reprimen a transcrición pola remodelación da estrutura da cromatina a través da interacción con proteínas tales como hBRM, BRG1, HDAC1 e SUV39 H1 (Shao Z. and Robbins P.D., 1995), que están

respectivamente involucrados na remodelación do nucleosoma, a acetilación/desacetilación de histonas e metilación. Tanto BRG1 como hBRM demostraron asociarse co pRB e estar implicadas na represión mediada por pRb. Non se require unha interacción física entre pRb e BRG1 para a detención do crecemento e a represión transcricional dos xenes diana de E2F inducidas polo pRB (Kang H. *et al.*,2004; Cobrinik D., 2005).

A proteína Rb ten tamén un papel importante no proceso de diferenciación de multitude de tecidos. A evidencia máis convincente da importancia de Rb na diferenciación celular vén dada do estudo dos ratos *knockout* para Rb, xa que presentan letalidade embrionaria na semana 14 de xestación debido a defectos no desenvolvemento do sistema hematopoético e do Sistema Nervioso Central (Le E.E. *et al.*, 1992).

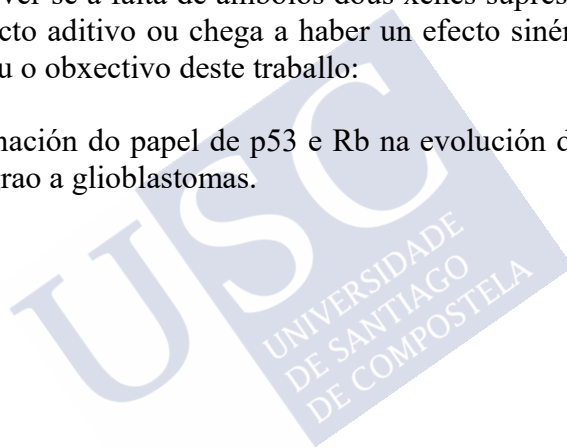




OBXECTIVOS

O estudo das lesións xenéticas máis frecuentes nos glioblastomas dan conta da importancia que ten a eliminación funcional de p53 e Rb no desenvolvemento deste tipo de tumores. Baseándonos en estudos previos realizados no noso grupo, nos que se analizaba a ausencia de p53 (datos non publicados) e de Rb (Seoane M. *et al.*, 2008), quixemos ver se a falta de ámbolos dous xenes supresores de tumores ten un efecto aditivo ou chega a haber un efecto sinérxico. En base a isto, xurdiu o obxectivo deste traballo:

- Determinación do papel de p53 e Rb na evolución dos astrocitomas de baixo grao a glioblastomas.





MATERIAL E METODOLOXÍA

1.- RATOS MODIFICADOS XENETICAMENTE. CONDICIÓN DE ESTABILACIÓN

As colonias de ratos establáronse baixo as condicións de aloxamento e manexo establecidas no RD 53/2013, do 1 de febreiro, que recolle a protección que deben ter os animais empregados en experimentación.

O proxecto autorizado ten o número 15010/15/002.

Os animais mantivéronse no animalario do Centro de Investigación en Medicina Molecular e enfermidades Crónicas (CIMUS) de Universidade de Santiago de Compostela, rexistrado co número de REGA 150780275701 onde se mantiveron en condicións libres de patóxenos (SPF) en microaisladores, con ciclos de luz/escuridade de 12 horas e alimentación *ad libitum*.

A eutanasia realizouse por inhalación de CO₂.

Os ratos empregados para os experimentos son das cepas FVB.129-Trp53 tm1 Brn e FVB.129-Rb1tm2 Brn. Ditas cepas presentan unha mutación condicional nos xenes endóxenos p53 e Rb, respectivamente.

Dita mutación consiste na presenza de dous sitios loxP flanqueando, no caso de p53, os exóns 2 a 10, e no caso de Rb, o exón 19. Estes sitios loxP van permitir a eliminación do DNA que haxa entre eles empregando a recombinasa Cre, facilitando a perda da funcionalidade destes xenes no momento desexado.

2.- CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS

Os astrocitos conséguense a partir de ratos neonatos, de tres días de idade, FVB.129-Trp53 tm1 Brn obtidos do NCI (Jonkers J. *et al.*, 2001) e ratos FVB.129-Rb1tm2 Brn obtidos do MMHCC (Mariño S.

et al., 2000) previamente cruzados entre eles ata conseguir os homocigotos. A extracción das células, astrocitos *knock-out* condicionais de p53 e Rb, realízase en condicións de esterilidade, empregándose para iso os cerebros dos neonatos dunha mesma camada. Posteriormente, as células obtidas son homoxeneizadas mediante disgregación e peneiradas a través dun filtro de 40 μm de malla. Tras centrifugalas 5 minutos a 1000 g, as células son resuspendidas en DMEM complementado cun 1% de glutamina (Sigma) ao que engadimos un 10% de FBS (Invitrogen) e posteriormente, son sementadas en placas de 10 cm de diámetro e mantidas a 37° C e 5% de CO₂ (McCarthy K.D. and de Vellis J., 1980). Despois de 24 horas, e tras lavalas con PBS para eliminar restos celulares non fixados, múdase o medio de cultivo por medio fresco e déixanse medrar as células por 7 días.

3.- INFECCIÓN RETROVIRAL

Empréganse células empaquetadoras de retrovirus Phoenix (cedidas polo prof. Nolan; Grignani F. *et al.*, 1998) que previamente son transfectadas mediante fosfato cálcico (Sayer J.A. *et al.*, 2004) cos vectores retrovirais pBABE-Puro, pBABE-Puro-HRas^{V12}, PIG-Puro, PIG-Cre. Seméntanse 2,5x10⁶ células Phoenix en placas de 10 cm de diámetro. Ás 24 horas e ás 48 horas da transfección cámbiaselles o medio e ás 72 horas recóllese o sobrenadante coas partículas virais e penéirase mediante un filtro de 0,45 μm . O devandito sobrenadante filtrado é utilizado posteriormente para infectar os astrocitos p53^{flox/flox} previamente sementados. Engádese ao medio polibreno (Sigma) nunha concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$.

Coa combinación dos diferentes sobrenadantes infectantes, obtivéronse 4 grupos de astrocitos infectados (p-BABE-Puro/PIG-Puro, p-BABE-Puro-HRas^{V12}/PIG-Puro, p-BABE-Puro/PIG-Cre e p-BABE-Puro-HRas^{V12}/PIG-Cre), levando todos eles a resistencia a

puromicina.

Tras 48 horas de incubación das células no sobrenadante infectante, os astrocitos infectados son seleccionados mediante tratamento con puromicina 2 µg/ml durante 48 horas.

4.- ENSAIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Seméntanse, por triplicado, 5×10^3 astrocitos, previamente seleccionados, por pozo en placas de 24 pozos. As medidas de proliferación tómanse cada 48 horas a partir do primeiro día tralo cultivo. Despois de lava-las células con PBS, fíxanse mediante unha disolución 1:3 de acedo acético e metanol, durante 15 minutos; a continuación, tínguense os astrocitos con cristal violeta (Sigma) diluído ao 0,1% en PBS. Tras 30 minutos, procédese a realizar os lavados necesarios para retirar o exceso de tinguidura. Por último, retírase con acedo acético ao 10% o colorante fixado á parede celular e cuantifícase no espectrofotómetro a 590 nm de lonxitude de onda (Squires M. S, Nixon P.M. and Cook S. J., 2002).

5.- ENSAIOS DE SENESCENCIA E APOPTOSE

Trala selección co antibiótico, seméntanse por triplicado 5×10^3 astrocitos por pozo en placas de 24 pozos. O 6º día tralo cultivo cuantifícase o número de células senescentes. A senescencia determínase co kit de tinguidura de SA-β-galactosidasa (Cell Signaling).

Para a cuantificación de células apoptóticas utilízase o reactivo de Hoechst 33258 (Sigma) e déixanse as células 30 minutos en escuridade. Posteriormente, lávanse con PBS e realízanse as microfotografías utilizando para iso un microscopio de fluorescencia Olympus IX51 (Daxhelet G.A. *et al.*, 1989).

6.- TRANSFORMACIÓN CELULAR

Para os ensaios de transformación celular utilízanse ratos inmunodeficientes, concretamente Fox Chase SCID CB17/lcr-Prkdcscid/lcrCrl, obtidos de Charles River (Brown A.R., DeWitt C. L., Bosma M. J. Nisonoff A. J., 1980). Estes ratos presentan unha deficiencia severa combinada que afecta aos seus linfocitos B e T, aínda que manteñen funcionais as células NK, os macrófagos e os granulocitos. Por este motivo, son susceptibles de desenvolver un tumor ao inxectalos con células transformadas, sendo un modo de confirmar dita transformación.

Inxectamos no flanco do rato, de modo subcutáneo, 3×10^6 astrocitos, previamente infectados e seleccionados.

7.- ESTUDOS BIOQUÍMICOS

A extracción de proteínas realízase o 6º día dende o cultivo dos astrocitos, unha vez seleccionados, mediante o tampón RIPA (1x PBS, 1% NP40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, 10 mg/mL PMSF, 40µg de aprotinina/mL, 100mM de ortovanadato). Tras unha incubación de 30 minutos en xeo, sométese ás células a dous pulsos de sonicación de 3 segundos e centrifúgase o extracto 10 minutos a 10000 g e 4°C e, tras descartar o sobrenadante, resuspéndese o *pellet*.

Para estes estudos bioquímicos utilizamos a técnica de Western-blot. Realizamos a separación proteica mediante un xel desnaturizante de poliacrilamida ao 12% utilizando para iso 50 µg. de proteína por pozo. Para realizar a transferencia empregouse unha membrana de nitrocelulosa (BioRad). O posterior bloqueo fíxose con leite ao 5% (leite en po desnatado) en TBS-T.

Para as determinacións que nos interesan, utilízanse os seguintes anticorpos primarios: anti-p53 (1:1000, CM5, Novocastra), anti- Rb (1:1000, G3-245, BD), anti-p19^{ARF} (1:1000, ab80, Abcam), anti-p16

(1:1000, M-156, Santa Cruz), anti-p21 (1:1000, F-5, Santa Cruz), anti- α -tubulina (1:5000, Sigma), anti-H2AX (1:500, Ser139, Millipore), anti-Pan-RasV12 (1:500, Ab-1, Calbiochem).

As incubación cos anticorpos primarios fíxose durante toda a noite a 4°C e as concentracións de anticorpos empregadas foron as indicadas polo fabricante.

As incubacións cos anticorpos secundarios fixéronse durante unha hora, despois de lavar a membrana. Empregáronse anticorpos anti-IgG de rato (1:1000, GE Healthcare) e anti-IgG de coello (1:5000, GE Healthcare), en leite ao 5% en TBS-T.

8.- ENSAIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Tras desparafinar e hidratar as mostras, realízase un pretratamento no microondas a máxima potencia (800 W) durante 20 minutos en Buffer Citrato. Tras lavar con PBS, bloquéase con peroxidasa ao 3% durante 10 minutos. A continuación, incúbase cos anticorpos do noso interese. O revelado posterior realízase con DAB (durante 10 minutos) para despois realizar unha contratinguidura con Hematoxilina (durante 3 minutos). Por último, deshidratamos as mostras e montámolas.

Para as determinacións que nos interesan os anticorpos utilizados son Sox-2 (1:500, ref. 17320, Santa Cruz), GFAP (1:200, ref. 3670, Cell Signaling), Hematoxilina (05-06004, BioÓptica), Eosina (05-10003E, BioÓptica).

9.- ENSAIOS DE INMUNOCITOQUÍMICA

Tras fixar as mostras en Formalina durante 30 minutos e lavalas con PBS, permeabilízanse as células con Tritón X-100 ao 1% en PBS durante 1 hora. A continuación, incúbase cos anticorpos do noso interese, tralo que se montan as mostras nun medio de montaxe acuoso e DAPI.

Para as determinacións que nos interesan os anticorpos utilizados son Sox-2 (1:500, ref. 17320, Santa Cruz), GFAP (1:200, ref. 3670, Cell

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Signaling), Hematoxilina (05-06004, BioÓptica), Eosina (05-10003E, BioÓptica).

10.- ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os experimentos repetíronse un mínimo de tres veces, empregándose no caso de experimentos *in vivo* o número mínimo de animais imprescindibles para observar a reproductibilidade dos resultados ou as posibles diferencias interindividuais se existiran, co obxectivo de cumprir o principio das 3 R.

O cálculo e a representación dos resultados a efectos comparativos, fíxose empregando, para cada grupo, a media \pm SD.

A análise estatística realizouse co *software* GraphPad. Aplicouse o test de Mann-Whitney para a comparación dos grupos nos estudos dos niveis de senescencia e apoptose, o test ANOVA para o estudo da proliferación, o test Welch para o estudo da supervivencia libre de tumor e o test Mantel-Cox para o estudo da variación do volume do tumor. En todos os casos, as diferencias observadas entre os grupos considerábanse estatisticamente significativas cando o valor de *p* era inferior a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

1.-AUMENTO DA PROLIFERACIÓN DOS ASTROCITOS NEONATAIS *KNOCK-OUT* CONDICIONAIS PARA P53 E P53/RB RESPECTO AOS GRUPOS CONTROL

Segundo a clasificación da OMS, os tumores cerebrais clasifícanse en catro grupos en función da súa malignidade, utilizando para iso as características histopatolóxicas e alteracións xenéticas que presentan (WHO, 2010). Deles, os glioblastomas ou tumores de grao IV, caracterízanse por presentar un alto grao de proliferación celular, invasión tisular, anoxénese, necrose e unha elevada resistencia a tratamento mediante fármacos ou radioterapia. A pesar de que tanto a nivel morfolóxico como a nivel clínico os glioblastomas comparten trazos que os describen, a nivel xenético, obsérvanse diferenzas que permiten diferenciarlos en dous subgrupos, segundo sexan primarios ou secundarios, derivados dun astrocitoma de grao II (Furnari F. B. *et al.*, 2007).

Análises moleculares dos subtipos de glioblastoma permitiron identificar as alteracións propias de cada un, en función do seu grao de incidencia. Desta maneira, como pode verse na táboa 4, identificáronse alteracións nas vías de sinalización como a amplificación de EGFR como exclusiva de glioblastomas primarios (aparece no 40% dos casos) xa que nunca aparece nos glioblastomas secundarios. Esta sobreexpresión provoca un aumento de tumoroxenicidade, xa que leva consigo un incremento na proliferación e unha diminución da apoptose, aparentemente, a través da vía Ras-Shc-Grb2 (Prigent S.A. *et al.*, 1996).

Outra lesión frecuente neste tipo de tumores é a perda de heterocigosidade no cromosoma 10 (Albarosa R. *et al.*, 1996), o que

afecta directamente á fosfatasa PTEN. De feito, viuse que PTEN aparece mutado en ámbolos dous tipos de glioblastomas aínda que a súa incidencia é maior nos primarios (Tohma E. *et al.*, 1998).

Por outra banda, comprobouse tamén que as mutacións de p53 son menos frecuentes en glioblastomas primarios (<10%) mentres que a súa incidencia aumenta en glioblastomas secundarios (>65%) dos cales, un 90% xa presentan a mutación nos estadios iniciais do tumor (Watanabe K. *et al.*, 1997).

En canto á ruta de RB, observouse que a súa interrupción é un evento case obrigado durante a tumoxénese, xa que como se viu anteriormente, aparece alterada nun 74% dos glioblastomas, ben sexa deleción ou mutación do xene RB, pola amplificación das Ciclinas dependentes de quinasas da fase G1 ou pola deleción ou silenciamento do inhibidor de Cdks, p16^{INK4B}, observándose nun mesmo tumor varios eventos asociados a esta vía (Wiedemeyer R. *et al.*, 2008; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

Despois de estudar como se comporta a célula na que se eliminou Rb, quixemos observar que ocorre tras a deleción do supresor de tumores p53, unido á hiperactivación da vía de Ras xa que, os últimos datos clínicos mostran que tanto a ausencia de Rb como a de p53 catalóganse coma lesións xénicas asociadas a glioblastomas, aínda que p53 relaciónase tamén con estadios iniciais do tumor.

Así mesmo, estudamos as consecuencias da eliminación de ámbolos dous supresores de tumores, Rb e p53, combinándoa novamente coa hiperactivación do oncoxene Ras para observar se hai algunha modificación na resposta da célula ao pasar dun dobre a un triplo evento oncoxénico.

Táboa 4.- Porcentaxe dos casos de GMB que presentan alteracións en cada unha das rutas fronte ao total de casos estudados.

Ruta		Porcentaxe de eventos de cada ruta
p53	TP53, MDM2, MDM4, CDKN2A	74,96 % dos casos (443/591)
Rb	RB1, CDKN2A CDKN2B, CDK4, CDKN2C, CDK6, CCND2	74,28 % dos casos (439/591)
Ras	EGFR, ERBB2, PDGFRA, MET, KRAS, NRAS, HRAS, NF1, SPRY2, FOXO1, FOXO3, AKT1, AKT2, AKT3, PIK3R1 PIK3CA, PTEN	76,82 % dos casos (454/591)

*Esta táboa mostra a transcendencia clínica dos eventos oncoxénicos seleccionados para o noso traballo (datos obtidos de www.cbiportal.org).

Para iso inicialmente utilizamos como modelo celular astrocitos *knock-out* condicionais para p53, que nos permiten inducir estes eventos oncoxénicos, fronte a estudos previamente publicados que utilizaban modelos animais que carecen de p53 ao longo do desenvolvemento (Le J-S. *et al.*, 2008), o cal mellora o modelo xa que evita unha posible adaptación funcional da célula en canto ao que implica a ausencia de p53.

Existen estudos previos que determinan que existe un marcado incremento de proliferación en astrocitos que combinan a perda de p53 cunha sobreexpresión de Ras oncoxénico (Le J-S. *et al.*, 2008).

Para tratar de comprender mellor a importancia da ausencia de p53, desenvolvemos un modelo celular baseado en astrocitos *knock-out* condicionais aos que inducimos un evento oncoxénico, como é a introdución de HRas^{V12} (datos non publicados). O devandito evento, combinámolo cunha delección dirixida de p53. Isto permítenos comparar os grupos de estudo de forma aguda, fronte ao traballo anteriormente citado en que a falta de p53 ocorre desde o desenvolvemento, o que pode levar consigo variacións funcionais adaptativas a nivel xenético.

Observamos unha maior taxa de proliferación nos astrocitos infectados coa recombinasa CRE, é dicir, aqueles que teñen p53 delecionado fronte aos grupos que aínda o conservan. Ademais, este aumento de taxa de crecemento celular é maior naquelas células que dita perda do xene antitumoral está combinada coa expresión constitutiva do oncoxene HRas^{V12}. Estes resultados coinciden cos xa publicados anteriormente. Cabe destacar que a taxa de proliferación é maior no grupo que unicamente carece de p53 que a observada no grupo que sobreexpresa HRas^{V12}, fronte ao que ocorre no caso de que o xene delecionado sexa Rb (Seoane M. *et al.*, 2008).

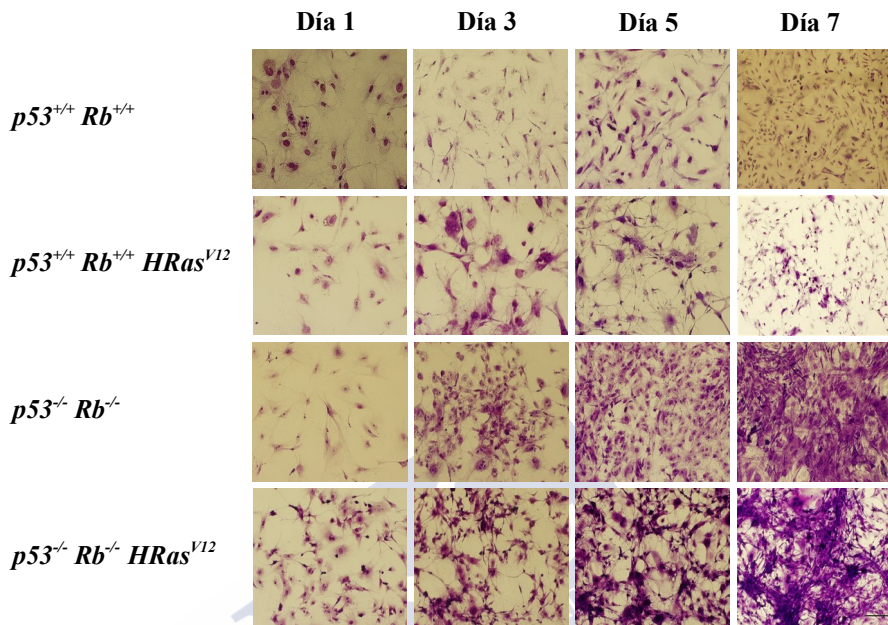


Figura 11.- Microfotografías que muestran las diferencias en la tasa de proliferación celular en los distintos grupos según los días de estudio (microfotografía de tinguadura con cristal violeta 40x; la barra de escala corresponde a 100 μ m).

A continuación estudamos lo que ocurre en el caso de que haya una doble delección de genes supresores de tumores y el resultado obtenido (figuras 11 e 12) sigue una pauta similar a lo observado en el caso de ausencia de p53 (datos no publicados), de modo que la tasa de proliferación es mayor en el caso de eliminar p53 y Rb que en el caso de sobreexpresión del oncogene, diferente igualmente a lo que ocurriría en el caso de Rb (Seoane M. *et al.*, 2008).

Dos datos obtidos, extráese a posible existencia dunha cooperación na desregulación do control do ciclo ante a ausencia de p53 especialmente nas células que sobreexpresan o oncoxene HRas^{V12} e dita falta de regulación vese potenciada pola ausencia de Rb, posiblemente debido ao seu efecto regulador do punto de restrición R, como se constatou en melanomas (Bardeesy N. *et al.*, 2001).

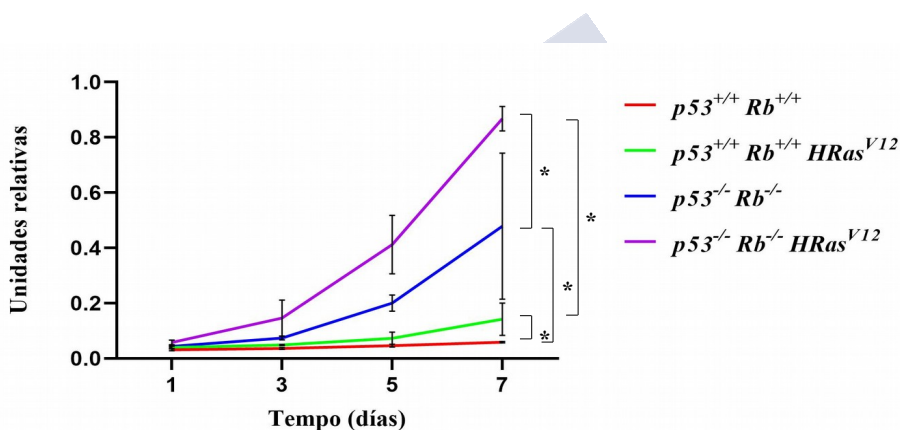


Figura 12.- Taxa de proliferación celular nos distintos grupos de estudo. Obsérvase unha marcada taxa de proliferación entre os grupos que perderon p53 e Rb fronte a aqueles que aínda os conservan sendo esta diferenza é maior nas células que expresan HRas^{V12}. Os datos foron analizados co test ANOVA (n = 5). As diferenzas significativas (p<0,05) expresáronse cun asterisco (*).

2.- AUSENCIA DE INDUCCIÓN DE APOPTOSE E SENESCENCIA NOS GRUPOS QUE PRESENTAN DELECCIÓN DOS XENES SUPRESORES DE TUMORES RB E P53

Os coñecidos como xenes supresores de tumores teñen como función manter a homeostase tisular controlando para iso o comportamento

das células nun determinado tecido do organismo (Hussanin S. P. and Harris C. C., 1998). O supresor de tumores p53 actúa en resposta a varios tipos de estrés celular mediante unha serie de procesos antiproliferativos. Como se viu anteriormente, e se resume na figura 13, p53 pode ser activado por dano no DNA, hipoxia ou expresión aberrante de oncoxenes promovendo a actuación dos *checkpoints* de ciclo celular, a reparación do DNA, a senescencia celular e a apoptose. Polo tanto, alteracións da función de p53 facilitan a aparición de defectos na activación dos *checkpoints*, inmortalización celular, inestabilidade xenómica e unha inapropiada supervivencia, permitindo a proliferación continuada e a evolución de células danadas (Hussanin S. P. and Harris C. C., 1998).

Estudouse en profundidade a capacidade de p53 para controlar o proceso de apoptose. De feito, considérase esta capacidade como unha contribución á actividade de p53 como supresor tumoral. A evidencia de que o p53 endógeno pode controlar a apoptose foi obtida de ensaios que estudaban a entrada en apoptose de timocitos de ratos *knockout* para p53 en fronte a timocitos *wildtype* trala acción de radiación, observándose que p53 era necesario para o inicio da apoptose inducida por radiación, pero non para a apoptose inducida por moitos outros estímulos (Clarke A. R. *et al.*, 1993). Ademais, observouse que a apoptose dependente de p53 como resposta a un evento oncoxénico é un regulador fundamental da tumoroxénese correspondendo os tumores máis agresivos cunha diminución nos seus niveis de activación (Symonds H. *et al.*, 1994).

A importancia da relación entre a apoptose e a supresión tumoral mediada por p53 determinouse a través de estudos que vinculaban a perda de p53 cun peor diagnóstico do tumor debido á diminución nos niveis de apoptose (Bardeesy N. *et al.*, 1995).

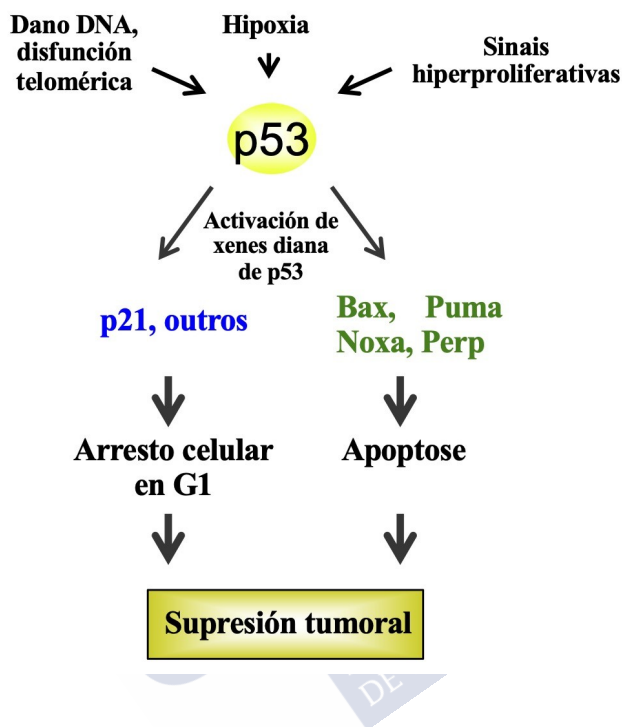


Figura 13. Proceso de activación da supresión tumoral a través de p53.

A determinación dos niveis de apoptose é importante neste modelo debido a que p53, como se describiu anteriormente, é unha peza fundamental tanto na entrada en parada celular, por activación da expresión de p21^{WAF1/CIP1} (Hei G. et al., 2005), como na apoptose (Oda K. *et al.*, 2000; Selvakumaran M. *et al.*, 1994). No caso da delección de p53 e tras realizar unha medición dos niveis de apoptose, non observamos diferenzas significativas entre os distintos grupos, o que nos indica que o aumento que observamos mediante curvas de

proliferación celular en canto ao número de células non se debe a unha diminución da morte celular, senón a un aumento de proliferación (datos non publicados).

No caso da dobre delección de p53 e Rb, sen embargo, observamos diferenzas significativas entre os grupos control e os grupo *knockout* (figuras 14 e 15), non habendo sen embargo un aumento nos grupos que sobreexpresan o oncoxene HRas^{V12}. Por outra banda, e dado a que os niveis son moi baixos en tódolos grupos, a diminución da apoptose non ten un impacto significativo a nivel biolóxico.

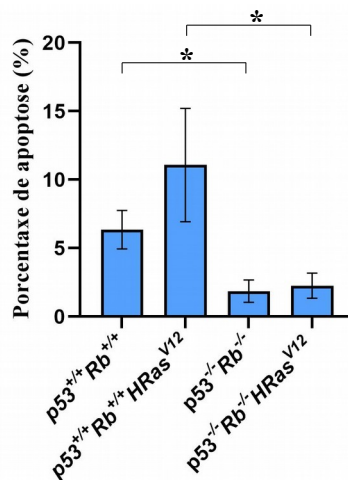


Figura 14.- Niveis de apoptose (media \pm SD). Os datos foron analizados co test Mann-Whitney cun $n = 5$, sendo $p < 0,05$ dos grupos que presentan a delección dos xenes supresores de tumores fronte aos seus grupos control, representado cun asterisco (*).

Ademais desta capacidade de promover a apoptose, p53 tamén induce parada de ciclo celular, senescencia celular e inflúe directamente na reparación do DNA, estando o resultado da súa activación influenciado polas características do estímulo causante (Fridman J.S. and Lowe S. W.,2003). Así, a transformación oncoxénica debida a adenovirus humanos provoca a estabilización de p53 no núcleo, como

consecuencia do cal aparece nas células perda de viabilidade por un proceso similar ao da apoptose (Lowe S. W. and Ruley H.E., 1993). Con todo, a hiperactivación do oncoxene Ras provoca a entrada das células nun estado de parada celular en G1 debido á acumulación de p53 e p16 e distínguese fenotipicamente pola entrada en senescencia (Serrano M. *et al.*, 1997).

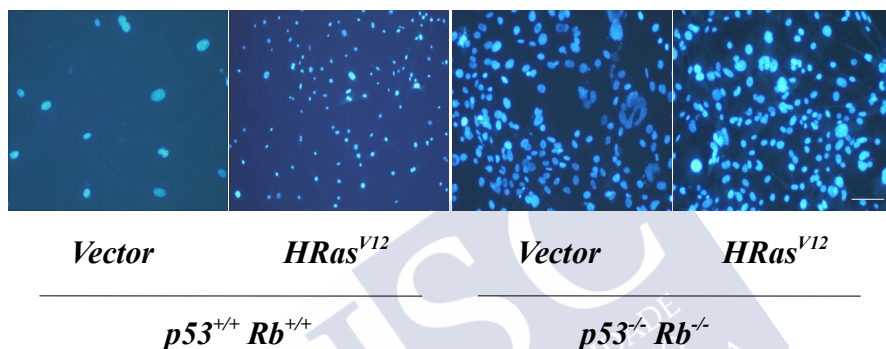


Figura 15.- Avaliación da aparición de apoptose nos distintos grupos de estudo empregando o colorante de Hoechst 33258 (microfotografía de tinguidura con Hoechst 33258 40x; a barra de escala corresponde a 100 μ m).

A activación da ruta Ras-MAPK en fibroblastos e células epiteliais pode inducir proliferación pero provoca senescencia prematura (Woods D. *et al.*, 1997). Así, Ras oncoxénico pode activar o programa ARF-p53 para a supresión da transformación epitelial. A interrupción do devandito programa pode ser importante durante o desenvolvemento de carcinoxénese (Lin A. W. and Lowe S. W., 2001).

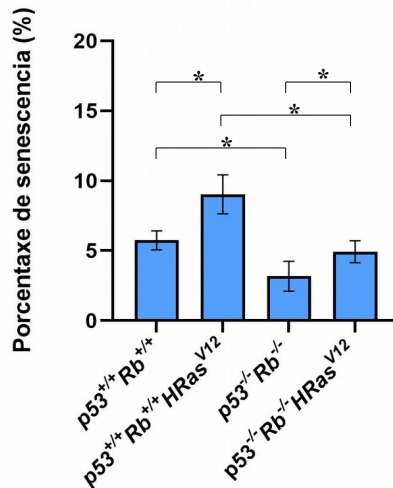


Figura 16.- Niveis de senescencia (media \pm SD). Os datos foron analizados co test Mann-Whitney cun $n = 5$, e sendo $p < 0,05$ nos grupos que presentan a delección dos xenes supresores de tumores e/ou que expresan o oncoxene HRas^{V12} fronte aos seus grupos control, representado cun asterisco (*).

Por outra banda, viuse que os MEA que carecen de Rb son resistentes á senescencia inducida por Ras oncoxénico, aínda tendo activada a DDR pola activación da ruta de p53 (Seoane M., Costoya J.A. and Arce V.M., 2017).

No noso caso, ao estudar os niveis de senescencia no caso da eliminación de p53, observamos que non hai diferenzas significativas entre os grupos (datos non publicados) polo que tampouco se pode achacar ese aumento na proliferación a unha diminución do envellecemento celular.

Con todo, coa combinación da eliminación de ámbolos xenes supresores de tumores, obsérvase un descenso significativo os niveis de senescencia (figuras 16 e 17), aínda que, dado que en todos os grupos o nivel de senescencia é moi baixo, non se pode asociar o aumento da proliferación celular.

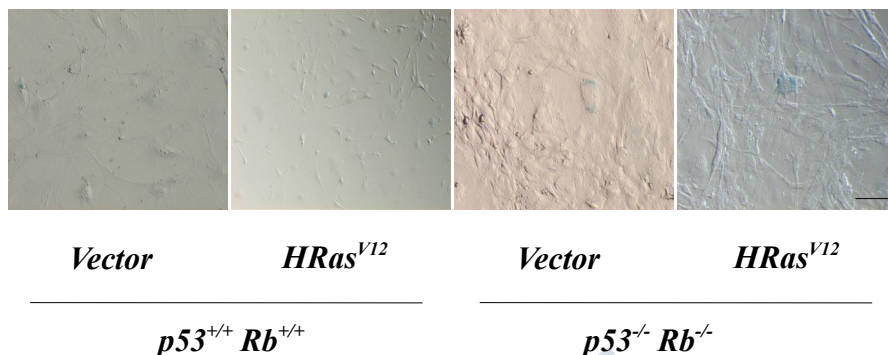


Figura 17.- Tinguidura con SA-β-galactosidasa das células no 6º día tralo cultivo para a determinación dos niveis de senescencia (microfotografía de tinguidura con SA-β-galactosidasa 40x; a barra de escala corresponde a 100 μm).

3.- APARICIÓN DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS A NIVEL MORFOLÓXICO TRALA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE HRAS^{V12}, EN ESPECIAL NO GRUPO EN QUE DITA EXPRESIÓN SE COMBINA COA SUPRESIÓN DE P53 E RB

As células malignizadas caracterízanse por ter un ciclo celular acelerado, alteracións xenéticas, crecemento invasivo, mobilidade celular incrementada, quimiotaxe, cambios na superficie celular, etc. Morfoloxicamente, as células tumorais caracterízanse por presentar un núcleo grande, de tamaño e forma irregular. O núcleo das células neoplásicas ten nos seus cambios un papel importante na valoración da malignidade tumoral, en especial os que concirnen á súa superficie, volume, relación núcleo/citoplasma, forma e densidade, así como á estrutura e a homoxeneidade. Outras modificacións ultraestruturais relaciónanse con segmentación do núcleo, invaxinacións, cambios na cromatina, como redución da heterocromatina, incremento dos poros de membrana nuclear, formación de inclusións, etc. O nucléolo está

caracterizado por hipertrofia, macro e microsegregación, movemento a través da membrana alterado, incremento no seu número e formación dun sistema canicular intranuclear entre a membrana nuclear e o nucléolo. O citoplasma tamén presenta cambios, coa aparición de novas estruturas e/ou a desaparición de estruturas normais, acumulación de RNA ribosómico e mensaxeiro que o converte en basófilo, diminución do tamaño do citoplasma coa aparición frecuentemente de vacuomas. Tamén é frecuente a aparición de alteracións na coloración da célula.

A mitose é característica das células malignizadas. O número de mitose incrementado, formas de mitose atípicas con defectos na aparición do eixo mitótico, estruturas asimétricas e formas atípicas dos cromosomas. En tumores anaplásicos, é frecuente a presenza de núcleos xigantes e células multinucleadas que presentan divisións anormais.

Do mesmo xeito que ocorría no caso de delección de Rb (Seoane M. *et al.*, 2008), observamos unha marcada diferenza na morfoloxía celular nos grupos celulares nos que hai sobreexpresión de HRas^{V12}, tales como diferenzas de tamaño entre as células ou un marcado alongamento das prolongacións das mesmas. Estas mesmas diferenzas obsérvanse tamén no caso dos astrocitos que expresan HRas^{V12} desde o desenvolvemento (Le J-S. *et al.*, 2008). No noso caso, observamos ademais que estes cambios son máis evidentes no grupo que combina esta expresión constitutiva do oncoxene HRas^{V12} coa delección de p53. Con todo, no grupo que unicamente presenta delección de p53, a pesar da elevada taxa de proliferación, as células manteñen a súa morfoloxía orixinal. Isto corrobora que aínda que p53 ten un papel importante no control da proliferación celular, é a presenza do oncoxene a que provoca a transformación celular (datos non publicados).

Dos datos obtidos podemos concluír que, aínda que a perda de p53 provoca un pronunciado aumento na taxa de proliferación celular, non parece ser suficiente para producir o inicio da transformación celular. Dita transformación si ten lugar cando, ademais, hiperactivamos a vía de sinalización de Ras mediante a sobreexpresión de HRas^{V12}, como

pode verse na capacidade destas células de producir o desenvolvemento de tumores. A cooperación entre ámbolos eventos pode vir dada polo feito de que a presenza de Ras oncoxénico provoca lesións no DNA por estrés replicativo e xeración de ROS (Seoane M. *et al.*, 2008) e p53 xoga un papel fundamental na activación de mecanismos de reparación, polo que a súa ausencia impide que esta teña lugar.

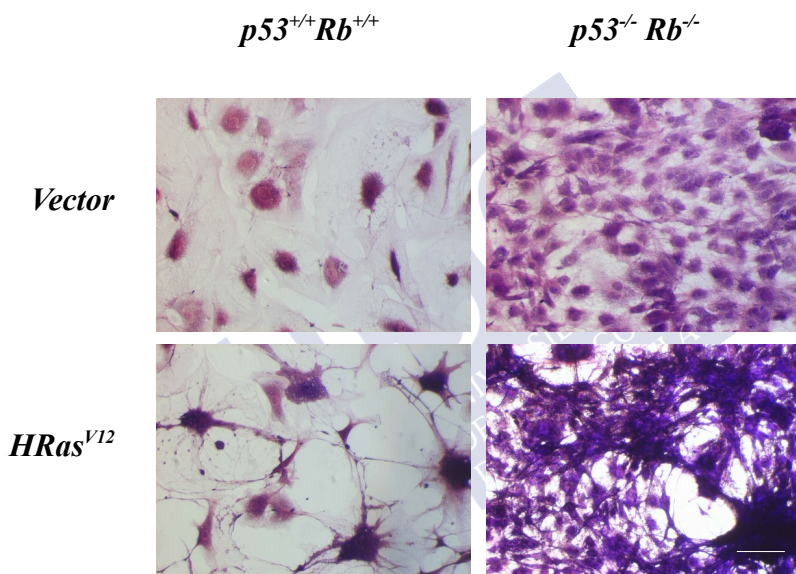


Figura 18.- Aparición de claras diferenzas morfolóxicas entre os grupos de estudo. Asíciáanse á sobreexpresión do oncoxene HRas^{V12}, observándose diferenzas de tamaño e forma, mentres que nos outros grupos o tamaño permanece homoxéneo, aínda se constata o aumento na proliferación ao producirse a delección dos xenes supresores de tumores (microfotografía de tinguidura con cristal violeta 40x; a barra de escala corresponde a 100 μ m).

Para tratar de determinar a importancia de cada un dos eventos, no noso grupo desenvolveuse un modelo que combinaba as ausencias de p53 e Rb cunha sobreexpresión de Ras oncoxénico, obtendo datos

similares aos ensaios que estudaban as consecuencias da perda de cada xene supresor de tumores por separado (figura 18). Do mesmo xeito que ocorre nos casos anteriores, a ausencia de p53 e Rb eleva a taxa de proliferación, con todo, as diferenzas morfolóxicas obsérvanse nos casos en que se sobreestimula a vía de Ras.

4.- ACTIVACIÓN DOS CHECKPOINTS DO CICLO CELULAR, ESPECIALMENTE NOS GRUPOS QUE PRESENTAN UN DOBRE EVENTO ONCOXÉNICO

A pesar de que Rb e as proteínas do grupo de p53 non son imprescindibles para a finalización do ciclo de división celular, a alteración ou interrupción da súa función aparece na maioría, se non todos, os procesos tumorais (Sherr C. J., 1996; Levine A. J., 1997). Os supresores de tumores Rb e p53 son, á súa vez, regulados por dúas proteínas, p16^{INK4a} e p19^{ARF}, codificadas por un único locus xenético, INK4a/ARF, e que son tamén potentes supresores tumorais. p16^{INK4a} actúa como inhibidor de Cdk4 (Serrano M., 1997), mentres que hai evidencias de que p19^{ARF} modula a actividade de p53 como parte da resposta dun *checkpoint* a sinais oncoxénicas e hiperproliferativas (Sherr C. J., 1998).

As quinazas dependentes de Ciclina D Cdk4 e Cdk6 regulan a fosforilación de Rb. Por inhibición de Cdk4 e Cdk6, as proteínas da familia INK4 poden impedir a entrada en fase S en células con Rb funcional. A interrupción na ruta p16^{INK4a}– Ciclina D1/ Cdk4– Rb é un evento común en tumores humanos, como resultado da perda de función dun dos reguladores negativos (p16^{INK4a} ou Rb) ou por eventos que levan consigo a sobreexpresión dun dos proto-oncoxenes (Ciclina D1 ou Cdk4; Sherr C. J., 1996).

A inactivación de p53 provoca unha diminución en respostas celulares como inhibición do ciclo celular ou apoptose en resposta a unha tensión ou a dano no DNA (Ko L. J. and Prives C., 1996; Levine A. J., 1997). A eliminación de p53 funcional a través de diversos mecanismos é o evento simple máis común en tumores humanos,

ocorrendo en preto da metade dos casos (Hollstein M. *et al.*, 1994). En condicións de homeostase, a proteína p53 ten unha vida curta e exprésase en niveis baixos en células normais pero cando aparece un dano xenotóxico, atópase estabilizada e acumúlase. Entre os produtos xénicos inducidos por p53 está o inhibidor de Cdk p21^{Cip1/Waf1}, que pode levar a cabo o arresto celular (Harper J. W. *et al.*, 1993; o-Deiry W.S. *et al.*, 1993)

As células que carecen dun xene funcional de p53 son resistentes á detención do ciclo celular inducida por p19^{ARF}, o que implica que p53 actúa *downstream* na vía de ARF (Kamijo T. *et al.*, 1997). Con todo, as células carentes de ARF presentan un *checkpoint* de p53 intacto tras radiación ionizante ou UV, polo que p19^{ARF} non transmiten sinais a p53 en resposta ao dano do DNA (Sherr C. J., 1998).

Tras realizar o estudo bioquímico das mostras observamos diferenzas nos niveis de activación dos distintos *checkpoints* de ciclo, como pode verse na figura 19, co que a célula tenta contrarrestar o aumento de proliferación anteriormente indicado. No caso de p19^{ARF}, observamos un aumento significativo da expresión proteica no grupo que combina ámbolos eventos oncoxénicos. En canto a p16^{INK4}, vemos un aumento claro naqueles grupos que expresan constitutivamente HRas^{V12}. Por outra banda, en canto a p21^{CIP1}, ten diminuída a súa expresión nos casos en que p53 atópase deletado, o cal era de esperar ao estar a súa expresión regulada transcricionalmente por p53 (Hei G. *et al.*, 2005).

Observamos tamén que, naqueles grupos en que hai unha combinación de eventos oncoxénicos, prodúcese unha clara expresión de γ -H2AX. Os organismos teñen mecanismos moi precisos para reparar as rupturas de dobre cadea ou DSBs non programadas, é dicir, aquelas que non forman parte de procesos celulares como meiose, mitose ou desenvolvemento do sistema inmune (Jeggo P.A. *et al.*, 1995), ou polo menos para tratar de reducir ao mínimo as súas consecuencias biolóxicas (Sedelnikova O.A. *et al.*, 2003). Tras unha lesión que

provoque a ruptura do dobre filamento de DNA cromosómico poñendo en perigo a integridade física dun cromosoma, ten lugar a fosforilación específica da histona H2AX no residuo serina 139, producindo unha forma modificada específica denominada γ -H2AX. A histona é rapidamente γ -fosforilada despois da aparición da ruptura (Rogakou E. P. *et al.*, 1998), podendo servir estes focos de γ -H2AX nos sitios de rupturas do dobre fío de DNA para o recrutamento de proteínas que están implicadas en volver unir os extremos de DNA (Rogakou E. P. *et al.*, 1999).

No noso caso, detectamos niveis elevados de expresión da histona fosforilada, especialmente no grupo que combina a delección dos xenes supresores de tumores coa sobreexpresión do oncoxene HRas^{V12}, o que indica un claro dano por DSBs no DNA.



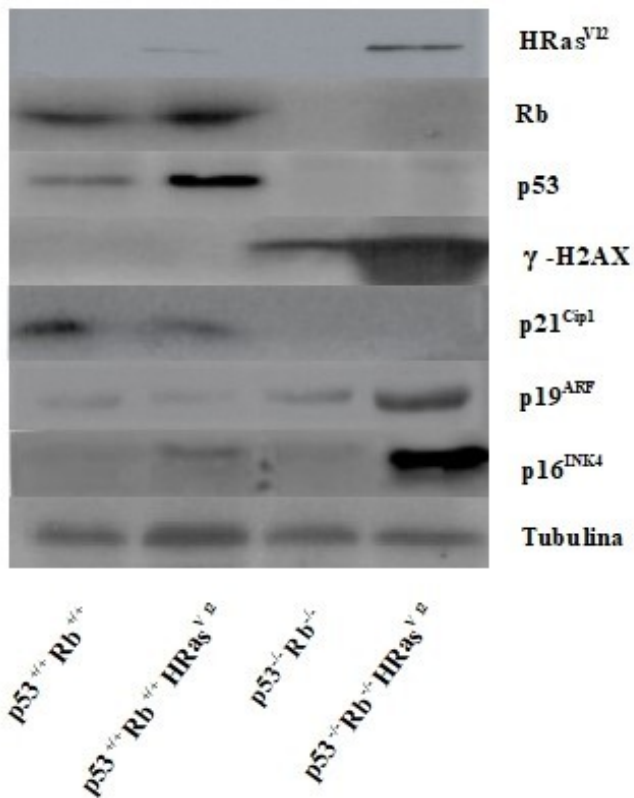


Figura 19.- Diferencias nos níveis de expresión proteica nos astrocitos co-infectados. Observase unha activación dos *checkpoints* de ciclo tratando de contrarrestar-lo aumento de proliferación. É salientable a presenza de expresión γ -H2AX, especialmente, no grupo que combina ámbolos eventos oncoxénicos, o que é indicativo de dano na estrutura do DNA.

5.- ENSAIO DE TUMOROXENICIDADE POSITIVO PARA CÉLULAS p53^{-/-}-Rb^{-/-}-HRAS^{V12}

A tumoroxenicidade defínese como a capacidade dunha poboación de células inoculadas a un modelo animal para producir un tumor por proliferación no sitio de inoculación e/ou en sitios distantes por metástase. Para iso é frecuente a utilización de animais xeneticamente inmunocomprometidos, por exemplo, ratos espidos ou con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) ou mediante inactivación das células T con globulina anti-timocitos (ATG), soro anti-timocitos (ATS) ou soro anti-linfocitos (ALS; WHO, 2010).

Unha vez obtidos os datos bioquímicos e de crecemento celular, tratamos de verificar a posibilidade de que estas modificacións xenéticas impliquen a aparición de transformación celular. Para iso, realizamos inxeccións subcutáneas dos catro grupos de estudo en ratos SCID, concretamente nos flancos. A aparición dunha masa tumoral apoiaría a idea de que as células estudadas presenten transformación celular.

Determinamos a porcentaxe de individuos SCID que, tras ser inxectados, mantéñense libres da aparición de tumor así como o tempo en que devandito tumor preséntase. Como se observa na figura 20, no 100% dos individuos inxectados (6/6) con astrocitos do grupo p53^{-/-}-Rb^{-/-}-Ras^{V12} preséntase desenvolvemento tumoral sendo, ademais, o tempo transcorrido desde a inxección é moi baixo, incluso menor ao observado nos casos en que o xene deletado era Rb (Seoane M. *et al.*, 2008) e p53. En canto ao grupo p53^{-/-}-Rb^{-/-} observamos casos de desenvolvemento tumoral (5/6) aínda que a un tempo máis prolongado que no grupo anterior; nos grupos en que non hai perda de p53 e Rb non tivemos ningún caso (0/6). Estes resultados demostran que a ausencia de p53 e Rb provoca transformación celular e aparición de tumoroxenicidade, potenciada pola expresión constitutiva de HRas^{V12}.

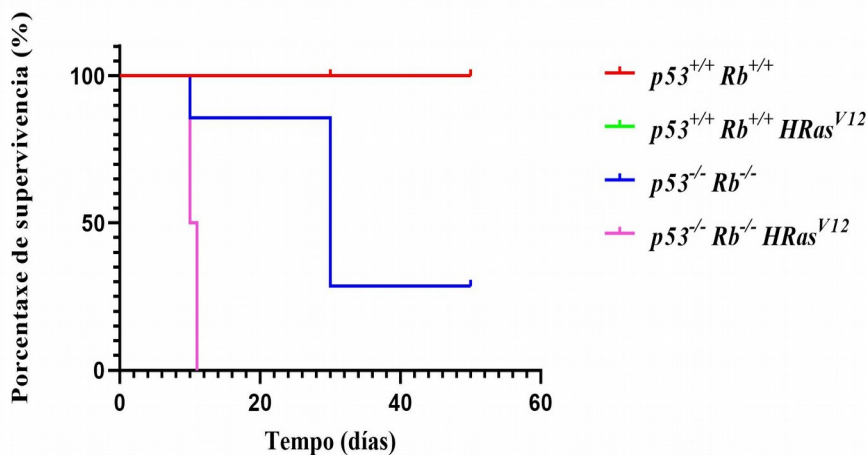


Figura 20.- Representación da supervivencia libre de tumor, é dicir, o tempo transcorrido dende a inxección ata a aparición do proceso tumoral. Os datos foron analizados co test Mantel-Cox cun $n = 6$, e sendo $p < 0,05$ tanto nos grupos que presentan tumor entre eles coma fronte aos seus grupos control.

Ademais, dende a aparición do tumor, realizamos medicións das dimensións do mesmo para determina-lo seu volume e a súa taxa de crecemento nos grupos que desenvolven tumores. Para iso empregamos a fórmula

$$Volume (V) = \frac{1}{2} (a^2 \times b)$$

sendo a o diámetro maior e b o menor (Sung C. *et al.*, 1993), considerando que existe tumor cando o diámetro menor alcanza los 4 mm.

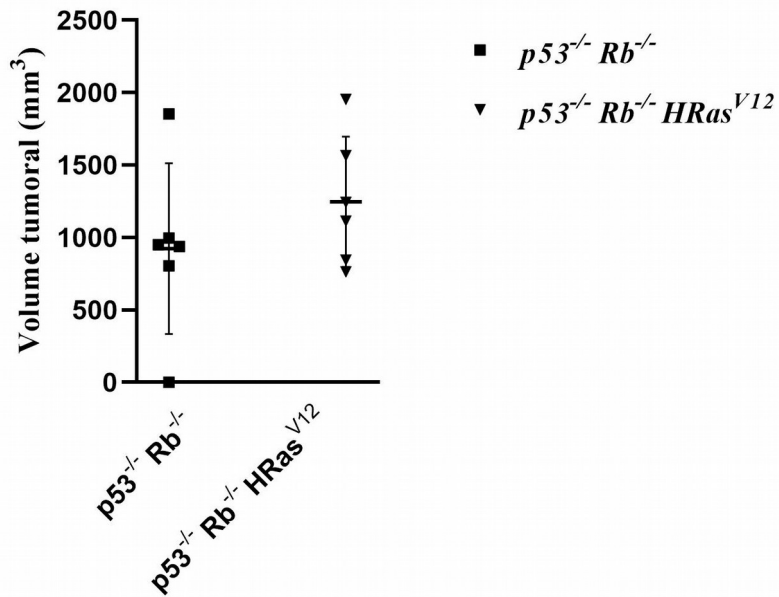
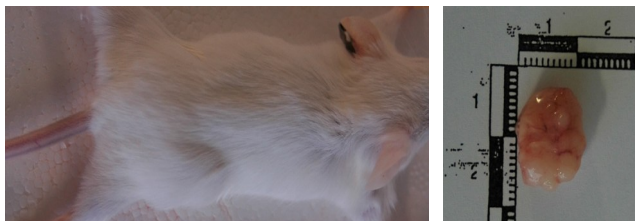


Figura 21.- Comparativa do volume dos tumores desenvolvidos nos distintos grupos. Representación do tamaño dos tumores no momento da súa extracción. Comparamos os volumes dos tumores desenvolvidos no grupo $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ (5/6) cos do grupo $p53^{-/-} Rb^{-/-} HRas^{V12}$ (6/6). Os datos foron analizados co test Welch cun $n = 6$, sendo $p > 0,05$.

Destes resultados podemos extraer que aínda que non se aprecian diferenzas significativas na taxa de crecemento dos tumores dos distintos grupos, a hiperactivación de $HRas^{V12}$ oncoxénico favorece a que a aparición dos mesmos ocorra nun tempo menor (figura 21).

$p53^{-/-} Rb^{-/-}$



$p53^{-/-} Rb^{-/-} HRas^{V12}$

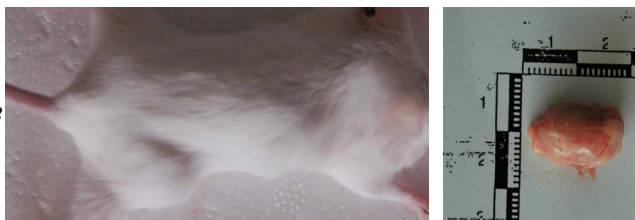


Figura 22.- Extracción dos tumores desenvolvidos nos grupos de estudo $p53^{-/-} Rb^{-/-}$ e $p53^{-/-} Rb^{-/-} HRas^{V12}$.

6.- CARACTERIZACIÓN DOS CORTES HISTOLÓXICOS TUMORAIS

Os tumores requiren a chegada de nutrientes e osíxeno así como a capacidade de eliminar os refugallos metabólicos e o dióxido de carbono. A neovascularización asociada ao tumor, xerada por un proceso de anxioxénese, suple estas necesidades (Hanahan D. and Folkman J., 1996), estimulando o crecemento tumoral e a proliferación. As células malignas segregan substancias que estimulan a formación de novos vasos, chamados por Bassermann en 1984 como TAP (*Tumor Angiogenesis Factor*). Por mor de que a proliferación das células tumorais adoita ocorrer máis rápido que a formación de novos capilares, pódese relacionar a aparición de procesos de necrose e apoptose cun grao maior de crecemento tumoral (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011).

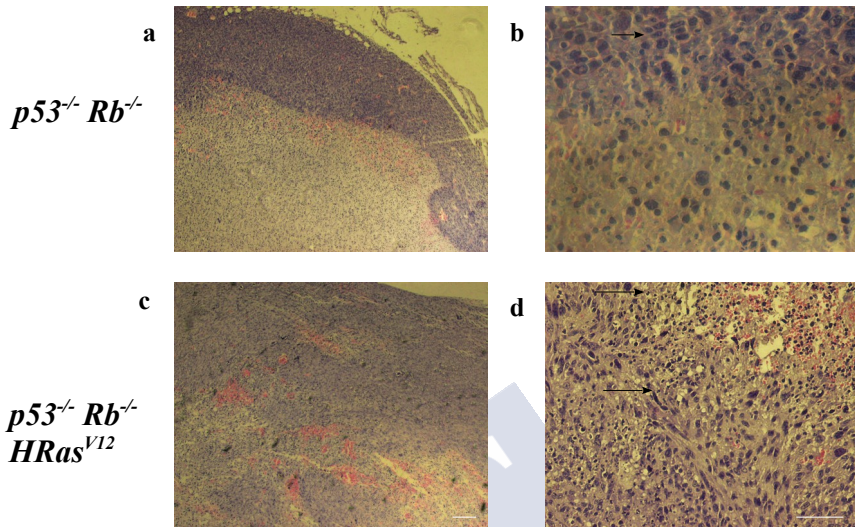


Figura 23.- Cortes histolóxicos dos tumores extraídos aos ratos SCID con tinguidura Hematoxilina-Eosina. Nas figuras a e c obsérvanse amplas zonas que presentan neovascularización. Nas figuras b e d poden verse meioses atípicas (frechas) e diferenzas no tamaño dos núcleos, especialmente no caso de células que combinan o triplo evento oncoxénico (microfotografías de tinguidura con Hematoxilina-Eosina; figuras a e c 10x e figuras b e d 40x; a barra de escala corresponde a 200 μ m nas figuras a e c e a 100 μ m nas figuras b e d).

A formación de vasos entra en repouso tras a embrioxénese, activándose na etapa adulta só en ocasións puntuais (cicatrización, por exemplo). Con todo, durante a progresión tumoral, o "interruptor anxioxénico" permanece case sempre activo provocando a aparición de novos vasos que axudan a manter a expansión de crecements neoplásicos (Hanahan D. and Folkman J., 1996). A aparición destes novos vasos adoita ir acompañada de capilares enrevesados e excesivamente ramificados, microhemorragias, vasos distorsionados e ampliados. Por outra banda, o fluxo sanguíneo é irregular e a eliminación do dióxido de carbono adoita ser deficiente, o que

provoca a acidificación da contorna así como insuficiencia metabólica, isquemia e necrose. Tamén son frecuentes os edemas debido á elevada permeabilidade deste tipo de vasos, así como niveis anormais de proliferación de células endoteliais (Nagy A. *et al.*, 2010; Baluk P. *et al.*, 2005).

O proceso de anxioxénese aparece de maneira temperá durante o desenvolvemento dos tumores invasivos, tanto en modelos animais como en humanos (Raica M. *et al.*, 2009; Hanahan D. and Folkman J., 1996). Nun principio, asociábase a aparición da anxioxénese a tumores macroscópicos de rápido crecemento, pero datos máis recentes indican que a anxioxénese contribúe tamén á fase premaligna da progresión neoplásica (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011).

Realizamos cortes histolóxicos das masas tumorais unha vez extraídas para determinar as súas características tisulares. Como pode verse na figura 23, observamos zonas cunha marcada neovascularización, especialmente no grupo que expresa constitutivamente HRas^{V12}. Ademais, tamén poden verse zonas necrosadas, o que é indicativo de rápido crecemento tumoral e por tanto de malignidade.

7.- PRESENZA DE DESDIFERENCIACIÓN NAS CÉLULAS TUMORAIS

As células nai atópanse na maioría de tecidos e caracterízanse pola súa capacidade de auto-renovación e por dar lugar, mediante a diferenciación, a células efectoras especializadas, sendo por iso cruciais para o mantemento da homeostase do tecido e para a súa reparación despois dunha lesión. Entre elas, as células nai neurais (NSC) son específicas de tecido con capacidade de proliferación, auto-renovación e produción dunha gran familia de proxenie diferenciada funcional (Bez A. *et al.*, 2003), estando presentes en "nichos vasculares" (Ramirez-Castillejo C. *et al.*, 2006; Gilbertson R. J. and Rich J. N., 2007) especializados no cerebro adulto de mamíferos podendo servir estes nichos como protección fronte a estímulos

apoptóticos e permitindo un equilibrio adecuado entre a auto-renovación e a diferenciación endotelial. Ademais, estas células nai neurais teñen a posibilidade de prosperar en rexións hipóxicas (Studer L. *et al.*, 2000).

Con todo, existen un tipo de células que comparten características fenotípicas e funcionais coas células nai neurais. Son as chamadas células iniciadoras de tumor ou TICs coa mesma capacidade de proliferación, auto-renovación e multipotencia, que xorden da transformación das NSC (Hadjipanayis C. G. and Van Meir E. G., 2009) e que poden iniciar novos tumores cunha alta eficiencia, sendo responsables do crecemento do mesmo e podendo actuar o propio tumor como nicho para as células que requiren factores paracrinos para o seu mantemento e supervivencia, debido á súa elevada vascularización, proporcionando ademais unha contorna hipóxica que á súa vez favorece a formación de novos vasos mediados polo factor de transcripción HIF-1 (Kaur B. *et al.*, 2005; Keith B. and Simon M. C., 2007).

A perda de diferenciación que sofren as células malignas pode explicarse por unha redución no tempo de rexeneración entre mitose, o que supón unha diminución do tempo de diferenciación; esta desdiferenciación é un proceso importante no desenvolvemento tumoral, xa que as células adquiren características morfolóxicas e funcionais de células fetais do tecido hóspede provocando cambios na composición citoplasmática e no metabolismo do glucóxeno, anomalías intermedias e erros na transmisión da información xenética. Nunha poboación de células malignas desenvólvense subpoboacións e subclones que se distinguen en termos de invasividade, agresividade e capacidade de metástase, aparecendo, ademais, variacións na relación co estroma, diferenzas estruturais nas células en termos de antixenicidade e/ou membrana glicoproteica e comportamentos alterados en canto á invasión e a metástase, provocando diferenzas de sensibilidade aos ciclostáticos, radiación e outros tratamentos antitumorais.

O xene Sox2, pertencente á familia de factores de transcripción SOX,

codifica o factor de transcripción SOX2 expresado durante o desenvolvemento embrionario. SOX2 controla a expresión de varios xenes importantes na regulación deste proceso, como é *Fgf4* na formación do blastocisto (Scaffidi P. and Bianchi M.E., 2001) e que tamén se expresa no tubo neural, participando no desenvolvemento das neuronas e da glía (Zappone M.V. *et al.*, 2000; Ferri A. L. *et al.*, 2004). Trala diferenciación, os niveis de expresión de Sox2 en astrocitos diminúen ata facerse imperceptibles, aínda que conservan a expresión dos xenes na subfamilia SoxE (Wegner M. and Stolt C. C., 2005; Schmitz M. *et al.*, 2007), podendo detectarse unha reactivación na súa expresión en casos de lesión no tecido ou por factores glioxénicos (Bani- Yaghoub M. *et al.*, 2006).

Observouse que a expresión de Sox2 está aumentada nos tumores do sistema nervioso central de liñaxe astroglial, oligodendroglial e endotelial, así como en tumores mixtos neurogliares e en tumores de orixe embrionaria, e dita expresión correlaciónase inversamente coa diferenciación (Phi J. H. *et al.*, 2008) e positivamente co grao de malignidade (Schmitz M. *et al.*, 2007; Phi J. H. *et al.*, 2008; Ma E. H. *et al.*, 2008). O silenciamento de Sox2 en células iniciadoras de glioblastoma impide a súa proliferación e inhibe a tumoroxenicidade o que indica que Sox2 é fundamental para o mantemento da capacidade de auto-renovación de células nai neurais cando adquiriron propiedades cancerixenas (Gangemi R.M. *et al.*, 2009).

Quixemos determinar a expresión de Sox2 tanto nas nosas células en cultivo como a nivel tisular nos tumores desenvolvidos nos ratos SCID. Para iso realizamos tinguiduras en células que sobreexpresaban o oncoxene HRas^{V12} en presenza ou en ausencia dos xenes supresores de tumores p53 e Rb.

Como pode verse na figura 24, a expresión de Sox2 pasa de ser citoplasmática a ser nuclear ao producirse a delección dos xenes supresores de tumores e en presenza de sobreexpresión de Ras oncoxénico, o que é indicativo de desdiferenciación (Zappone M.V.

et al., 2000; Ferri A. L. et al., 2004; Alcock J. et al., 2009).

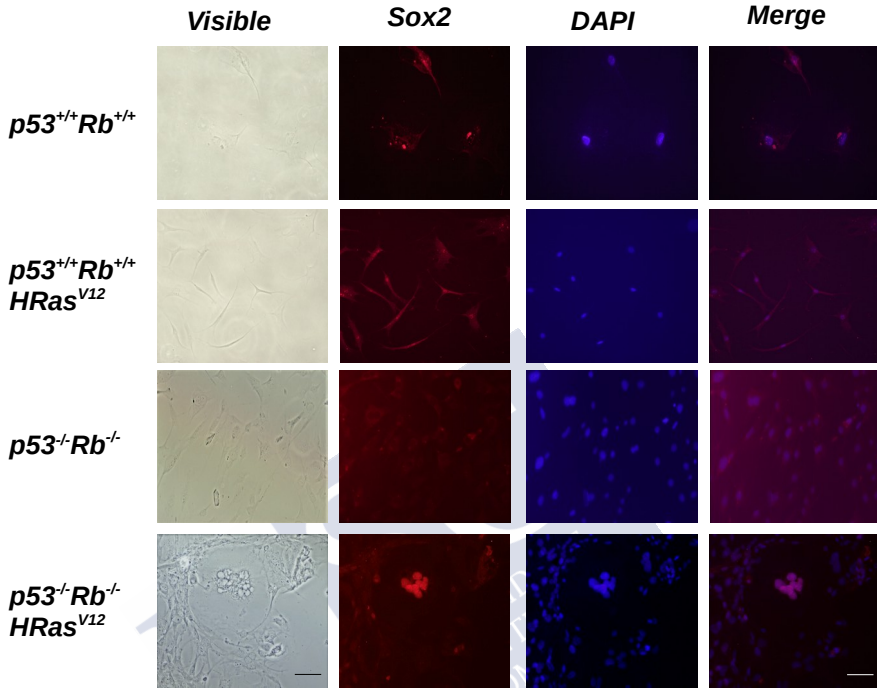


Figura 24.- Tinguidura de inmunofluorescencia. Tratamos de determina-la localización da expresión de Sox2 nas células dos distintos grupos de estudo en cultivo, $p53^{+/+}Rb^{+/+}$, $p53^{+/+}Rb^{+/+}HRas^{V12}$, $p53^{-/-}Rb^{-/-}$ e $p53^{-/-}Rb^{-/-}HRas^{V12}$. Observamos que no grupo que combina o triplo evento oncoxénico detéctase expresión de Sox2 a nivel nuclear (microfotografías de tinguidura con inmunofluorescencia 40x; a barra de escala corresponde a 100 μ m).

Quixemos comprobar se ocurría este mesmo cambio de lugar de expresión nos tumores desenvolvidos nos ratos SCID e efectivamente, observamos que a expresión de Sox2, do mesmo xeito que ocorre en cultivo, localízase no núcleo das células (figura 25)

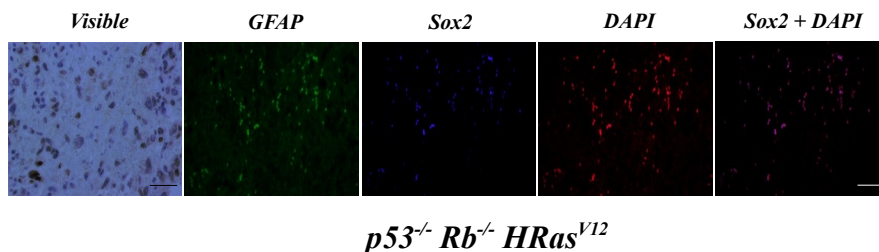


Figura 25.- Tinguadura de inmunofluorescencia dos cortes histolóxicos extraídos do tumor producido por células que combinan o triplo evento oncoxénico. Ao igual que ocorre nos cultivos celulares, nos tumores do grupo $p53^{-/-} Rb^{-/-} HRas^{V12}$ observamos expresión nuclear de Sox-2 o que implica desdiferenciación celular (Zappone M.V. *et al.*, 2000) e está asociada a un alto grao de malignidade (microfotografías de tinguadura con inmunofluorescencia 40x; a barra de escala corresponde a 100 μ m).

Debido a que se describiu que a maior parte dos glioblastomas teñen hiperactivada a vía de sinalización de Ras (Guha A. *et al.*, 1997), coñécese tamén que a ausencia de p53 ten un papel importante na progresión da malignidade nos tumores de baixo grao (Zhu E. *et al.*, 2005), e aparece unha alteración da función de Rb e p53 na maior parte dos tumores cerebrais humanos (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008), quixemos estudar a cooperación que se produce ao combinar estes eventos no avance do astrocitoma a glioblastoma.

Tomados en conxunto, os nosos resultados permítenos concluir que a cooperación entre a perda de p53 e Rb é suficiente para o inicio do proceso tumoral, existe unha perda de control na proliferación celular e aparecen danos non reparados que provocan a transformación celular, véndose potenciada pola hiperactivación da vía de Ras.

O incremento observado na taxa de proliferación celular, os cambios na morfoloxía celular e o desenvolvemento de tumores exógenos seguen o mesmo patrón que os resultado obtidos anteriormente no noso grupo no caso de combinar tanto a ausencia de Rb como de p53

coa hiperactivación da vía de Ras (Seoane M. *et al.*, 2008), aínda que a ausencia de ámbolos supresores de tumores é suficiente para a tumoroxénese.

Con todo, tralo estudo de desdiferenciación, observamos que aínda que o patrón de desenvolvemento tumoral é similar nos grupos que carecen dos xenes supresores de tumores Rb e p53, é necesaria a hiperestimulación da vía de Ras para que o tumor desenvolvido adquira as características propias dun glioblastoma. Probablemente, isto débese a que son necesarios varios eventos oncoxénicos para iniciar a reprogramación de células diferenciadas a células pluripotentes ou células nai pluripotentes inducidas (iPS).

Esta reprogramación non ocorre de maneira eficaz debido a que existen barreiras, como é a activación da resposta de dano a DNA (DDR) e a apoptose dependente de p53 (Chin L. *et al.*, 1999) que a impiden mesmo en células que presentan dano nos telómeros, deficiencias na reparación do DNA ou danos exóxenos do xenoma. Por tanto, a eliminación de p53 permite unha reprogramación eficiente que implica a xeración de células iPS que manteñen o dano no DNA e as aberracións cromosómicas (Marión R.M. *et al.*, 2009).

Un estudo recente mostra que os glioblastomas conteñen células nai de glioblastoma (GSC) que teñen un programa transcricional que xorde da resposta aos eventos oncoxénicos (Richards L. *et al.*, 2021)

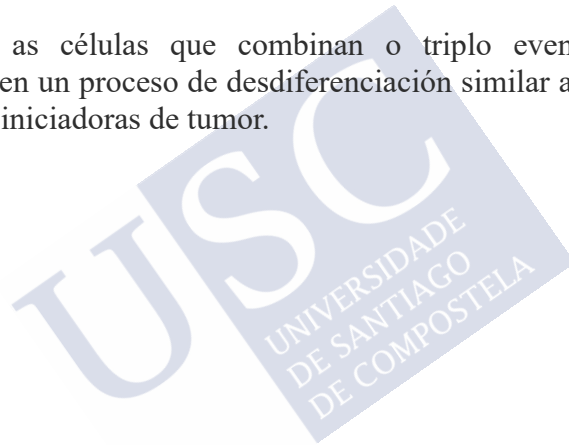


CONCLUSIÓNS

A cooperación entre as perdas de p53 e Rb é suficiente para o inicio do proceso tumoral.

No caso de combinar estas deleccións cunha hiperactivación de Ras oncoxénico prodúcese un incremento na perda de control da proliferación e dos mecanismos de reparación do DNA.

Ademais, as células que combinan o triplo evento oncoxénico, desenvolven un proceso de desdiferenciación similar ao que presentan as células iniciadoras de tumor.





BIBLIOGRAFÍA

Adams P.D., Li X., Sellers W.R., Baker K.B., Leng X., Harper J.W., Taya Y. and Kaelin W.G. (1999) Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.*; 19(2): 1068-1080

Albarosa R., Colombo B.M., Roz. L., Magnani I., Pollo B., Cirenei N., Giani C., Conti A.M., DiDonato S. and Finocchiaro G. (1996) Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am J Hum Genet.*; 58(6): 1260-1267

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2014) *Molecular Biology of the cell*. 6th ed., New York, USA: Garland Science

Alcock J., Lowe J., England T., Bath P. and Sottile V. (2009) Expression of SOX1, SOX2 and SOX9 is maintained in adult human cerebellar cortex. *Neurosci Lett.*; 450(2): 114-116

Akoulitchev S., Chuikov S. and Reinberg D. (2000) TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature.*; 407(6800): 102-106

Attardi L.D. and DePinho R.A. (2004) Conquering the complexity of p53. *Nat Genet.*; 36(1): 7-8

Baluk P., Hashizume H. and McDonald D.M. (2005) Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.*; 15(1): 102-111

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Bani-Yaghoub M., Tremblay R.G., Lei J.X., Zhang D., Zurakowski B., Sandhu J.K., Smith B., Ribocco-Lutkiewicz M., Kennedy J., Walker P.R. and Sikorska M. (2006) Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol.*; 295(1): 52-66

Bardeesy N., Bastian B.C., Hezel A., Pinkel D., DePinho R.A. and Chin L. (2001) Dual inactivation of Rb and p53 pathways in Ras-induced melanomas. *Mol Cell Biol.*; 21(6): 2144-2153

Bardeesy N., Beckwith J.B. and Pelletier J. (1995) Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 mutations. *Cancer Res.*; 55(2): 215-219

Bass A.J., Watanabe H., Mermel C.H., Yu S., Perner S., Verhaak R.G., Kim S.Y., Wardwell L., Tamayo P., Gat-Viks I., Ramos A.H., Woo M.S., Weir B.A., Getz G., Beroukhi R., O'Kelly M., Dutt A., Rozenblatt-Rosen O., Dziunycz P., Komisarof J., Chiriac L.R., Lafargue C.J., Scheble V., Wilbertz T., Ma C., Rao S., Nakagawa H., Stairs D.B., Lin L., Giordano T.J., Wagner P., Minna J.D., Gazdar A.F., Zhu C.Q., Brose M.S., Cecconello I., Jr U.R., Marie S.K., Dahl O., Shivdasani R.A., Tsao M.S., Rubin M.A., Wong K.K., Regev A., Hahn W.C., Beer D.G., Rustgi A.K. and Meyerson M. (2009) SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet.*; 41(11): 1238-1242

Bassermann R., Ludwig G., Hölzel D. and Eder M. (1984) Hematogenic organ metastasis-which primary tumor?. *Pathologie.*; 5(1): 13-20

Benson E.K., Mungamuri S.K., Attie O., Kracikova M., Sachidanandam R., Manfredi J.J. and Aaronson S.A. (2013) p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of

E2F4 complexes. *Oncogene.*; 33(30): 3959-3969

Bignon Y.J. and Rio P. (1993) The retinoblastoma gene: will therapeutic use of its tumor suppressive properties be possible?. *Bull Cancer.*; 80(8): 704-712

Bez A., Corsini E., Curti D., Biggiogera M., Colombo A., Nicosia R.F., Pagano S.F. and Parati E.A. (2003) Neurosphere and neurosphere forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.*; 993(1-2): 18-29

Bohlig L. and Rother K. (2011) One function-multiple mechanisms: the manifold activities of p53 as a transcriptional repressor. *J Biomed Biotechnol.*; 2011(5701):464916

Bosma G.C., Custer R.P. and Bosma M.J. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.*; 301(5900): 527-530

Bourdon J.C. (2007) p53 and its isoforms in cancer. *British Journal of Cancer.*; 97(3): 277-282

Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A., Campos B., Noushmehr H., Salama S.R., Zheng S., Chakravarty D., Sanborn J.Z., Berman S.H., Beroukhi R., Bernard B., Wu C.J., Genovese G., Shmulevich I., Barnholtz-Sloan J., Zou L., Vegesna R., Shukla S.A., Ciriello G., Yung W.K., Zhang W., Sougnez C., Mikkelsen T., Aldape K., Bigner D.D., Van Meir E.G., Prados M., Sloan A., Black K.L., Eschbacher J., Finocchiaro G., Friedman W., Andrews D.W., Guha A., Iacocca M., O'Neill B.P., Foltz G., Myers J., Weisenberger D.J., Penny R., Kucherlapati R., Perou C.M., Hayes D.N., Gibbs R., Marra M., Mills G.B., Lander E., Spellman P., Wilson R., Sander C., Weinstein J., Meyerson M., Gabriel S., Laird P.W., Haussler D., Getz G., Chin L.; TCGA Research Network (2013) The somatic genomic landscape of

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

glioblastoma. *Cell.*; 155(2): 462-477

Brooks C.L. and Gu W. (2010) New insights into p53 activation. *Cell Res.*; 20(6): 614-621

Brown A.R., DeWitt C.L., Bosma M.J. Nisonoff A. J. (1980) Dominance of an immune response by secondary cells: quantitation by allotyp analysis. *Immunol.*; 124(1): 250-254

Buchkovich K., Duffy L.A. and Harlow E. (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell.*; 58(6): 1097-1105

Buttitta F., Marchetti A., Gadducci A., Pellegrini S., Morganti M., Carnicelli V., Cosio S., Gagettti O., Genazzani A.R. and Bevilacqua G. (1997) p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study. *Br J Cancer.*; 75(2): 230-235

Buschmann T., Fuchs S.Y., Lee C.G., Pan Z.Q. and Ronai Z. (2000) SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell.*; 101(7): 753-762

Caputi M., Russo G., Esposito V., Mancini A. and Giordano A. (2005) Role of cell-cycle regulators in lung cancer. *J Cell Physiol.*; 205(3): 319-327

Cerami E., Gao J., Dogrusoz U., Gross B.E., Sumer S.O., Aksoy B.A., Jacobsen A., Byrne C.J., Heuer M.L., Larsson E., Antipin Y., Reva B., Goldberg A.P., Sander C. and Schultz N. (2012) The cBio cancer genomic portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.*; 2(5): 401-404

Chen D., Kon N., Li M., Zhang W., Qin J. and Gu W. (2005) ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell.*; 121(1): 1071-1083

Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C. and Pandolfi P.P. (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.*; 436(7051): 725-730

Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.L., Gottlieb G.J., Greider C.W. and DePinho R.A. (1999) p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*; 97(4): 527-538

Chin L., Pomerantz J. and DePinho R.A. (1998) The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products-two pathways. *Trends Biochem Sci.*; 23(8): 291-296

Ciemerych M.A. and Sicinski, P. (2005) Cell cycle in mouse development. *Oncogene.*; 24(17): 2877-2898

Cinti C., Leoncini L., Nyongo A., Ferrari F., Lazzi S., Bellan C., Vatti R., Zamparelli A., Cevenini G., Tosi G.M., Claudio P.P., Maraldi N.M., Tosi P. and Giordano A. (2000) Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. *Am J Pathol.*; 156(3): 751-760

Clarke A.R., Purdie C.A., Harrison D.J., Morris R.G., Bird C.C., Hooper M.L. and Wyllie A.H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature.*; 362(6423): 849-852

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Cobrinik D. (2005) Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene.*; 24(17): 2796-2809

Colicelli J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.*; 2004(250): RE13

Cruz J.C. and Tsai L.H. (2004) A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol.*; 14(3): 390-394

Dai C. and Gu W. (2010) p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med.*; 16(11): 528-36

Dannenberg J.H., van Rossum A., Schuiff L. and te Riele H. (2000) Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G1 control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev.*; 14(23): 3051-3064

Datto M.B., Hu P.P., Kowalik T.F., Yingling J. and Wang X.F. (1997) The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol.*; 17(4): 2030-2037

Daxhelet G.A., Coene M.M., Hoet P.P. and Cocito C.G. (1989) Spectrofluorometry of dyes with DNAs of different base composition and conformation. *Anal Biochem.*; 179(2): 401-403

Dever T.E., Glynias M.J. and Merrick W.C. (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 84(7): 1814-1818

Dimova D.K., Stevaux O., Frolov M.V. and Dyson N.J. (2003) Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway. *Genes Dev.*; 17(18):2308-2320

Dingwall C. and Laskey R.A. (1991) Nuclear targeting sequences- a consensus?. *Trends Biol Sci.*; 16(12): 478-481

Dunn J.M., Phillips R.A., Becker A.J. and Gallie B.L. (1988) Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science.*; 241(4874): 1797-1800

Dyson N., Howley P.M., Münger K. and Harlow E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.*; 243(4893): 934-937

Eischen C.M., Weber J.D., Roussel M.F., Sherr C.J. and Cleveland J.L. (1999) Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.*; 13(20): 2658-2669

el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1993) WAF, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.*; 75(4): 817-825

el-Deiry W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.*; 8(5): 345-357

Falls H.F. and Neel J.V. (1951) Genetics of retinoblastoma. *AMA Arch Ophthalmol.*; 46(4): 367-389

Fearon E.R. and Vogelstein B. (1997) Tumor suppressor and DNA repair gene defects in human cancer. In: Holland J.F., Bast R.C., Morton D.L., Frei E., Kufe D.W. and Weichselbaum R.R., editors.

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Cancer medicine, 4th ed. (p.p. 97-117), Baltimore, USA: Williams & Wilkins

Ferri A.L., Cavallaro M., Braidà D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi P.P., Sala M., DeBiasi S. and Nicolis S. (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development.*; 131(15): 3805-3819

Freedman D.A., Wu L. and Levine A.J. (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci.*; 55(1): 96-107

Friedman P., Chen X., Bargonetti J. and Prives C. (1993) The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 90(8): 3319-3323

Friend S.H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R.A., Rapaport J.M., Albert D.M. and Dryja T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.*; 323(6089): 643-646

Fridman J.S. and Lowe S.W. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene.*; 22(56): 9030-9040

Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R. M., Mukasa A., Stommel J.M., Stegh A., Hahn W.C. Ligon K.L., Louis D.N., Brennan C., Chin L., DePinho R.A. and Cavenee W.K. (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology and paths to treatment. *Genes Dev.*; 21(21): 2683-2710

Fynan T.M. and Reiss M. (1993) Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis.

Crit Rev Oncog.; 4(5): 493-540

Gangemi R.M., Griffero F., Marubbi D., Perera M., Capra M.C., Malatesta P., Ravetti G.L., Zona G.L., Daga A. and Corte G. (2009) SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells.*; 27(1): 40-48

Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer S.O., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E., Cerami E., Sander C. and Schultz N. (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.*; 6(269): p11

Garriga J. and Graña X. (2004) Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene.*; 337(1): 15-23

Gilbertson R.J. and Rich J.N. (2007) Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer.*; 7(10): 733-736

Grignani F., Kinsella T., Mencarelli A., Valtieri M., Riganelli D., Grignani F., Lanfrancone L., Peschle C., Nolan G.P. and Pelicci P.G. (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.*; 58(1): 14-19

Grossman S.R., Deato M.E., Brignone C., Chan H.M., Kung A.L., Tagami H., Nakatani Y. and Livingston D.M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science.*; 300(5617): 342-344

Guha A., Feldkamp M.M., Lau N., Boss G. and Pawson A. (1997) Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene.*; 15(23): 2755-2765

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Hadjipanayis C.G. and Van Meir E.G. (2009) Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J Mol Med (Berl)*; 87(4): 363-374

Hanahan D. and Folkman J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*; 86(3): 353-364

Hanahan D. and Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*; 100(1): 57-70

Hanahan D. and Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: next generation. *Cell*; 144(5): 646-6749

Harbour J.W., Lai S.L., Whang-Peng J., Gazdar A.F., Minna J.D. and Kaye F.J. (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*; 241(4863): 353-357

Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K. and Elledge S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*; 75(4): 805-816

Harper J.W., Burton J.L. and Solomon M.J. (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev*; 16(17): 2179-2206

Harrington E.A., Bruce J.L., Harlow E. and Dyson N. (1998) pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95(20): 11945-11950

Haupt Y., Maya R., Kazanietz A. and Oren M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*; 387(6630): 296-299

- Hay T.J. and Meek D.W. (2000) Multiples sites in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett.*; 478(1-2): 183-186
- Hayon I.L. and Haupt Y. (2002) p53: an internal investigation. *Cell Cycle.*; 1(2): 111-116
- He G., Siddik Z.H., Huang Z., Wang R., Koomen J., Kobayashi R., Khokhar A.R. and Kuang J. (2005) Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene.*; 24(18): 2929-2943
- Herrera R.E., Sah V.P., Williams B.O., Mäkelä T.P., Weinberg R.A. and Jacks T. (1996) Altered cell cycle kinetics, gene expression and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol.*; 16(5): 2402-2407
- Hirao A., Kong Y.Y., Matsuoka S., Wakeham A., Ruland J., Yoshida H., Liu D., Elledge S.J. and Mak T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science.*; 287(5459): 1824-1827
- Hirschi A., Cecchini M., Steinhardt R.C., Schamber M.R., Dick F.A. and Rubin S.M. (2010) An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nat Struct Mol Biol.*; 17(9): 1051-1057
- Ho J. and Benchimol S. (2003) Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ.*; 10(4): 404-408
- Hofmann F. and Livingston D.M. (1996) Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit. *Genes Dev.*; 10(7): 851-861

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Hong F.D., Huang H.J, To H., Young L.J., Oro A., Bookstein R., Lee E.Y. and Lee W.H. (1989) Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 86(14): 5502-5506

Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesanto R. and Harris C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*; 22(17): 3551-3555

Horn H.F. and Vousden K.H. (2007) Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene.*; 26(9): 1306-1316

Horowitz J.M., Yandell D.W., Park S.H., Canning S., Whyte P., Buchkovich K., Harlow E., Weinberg R.A. and Dryja T.P. (1989) Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science.*; 243(4893): 937-940

Hunter T. and Pines J. (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.*; 79(4): 573-582

Hussanin S.P. and Harris C.C. (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.*; 58(18): 4023-4037

Hwang H.C. and Clurman B.E. (2005) Cyclin E in normal and neoplastic cell cycle. *Oncogene.*; 24(17): 2776-2786

Ishida S., Huang E., Zuzan H., Spang R., Leone G., West M. and Nevins J.R. (2001) Role of E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarrays analysis. *Mol Cell Biol*; 21(14): 4684-4699

Jeggo P.A., Taccioli G.E. and Jackson S.P. (1995) Menage à trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *Bioessays.*; 17(11): 949-957

Ji P., Jiang H., Rekhtman K., Bloom J., Ichetovkin M., Pagano M. and Zhu L. (2004) An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. *Mol Cell.*; 16(1): 47-58

Jones S.N., Roe A.E., Donehower L.A. and Bradley A. (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.*; 378(6553): 206-208

Jonkers J., Meuwissen R., van der Gulden H., van der Valk M. and Berns A. (2001) Synergic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet.*; 29(4):418-425

Kamijo T., Zindy F., Roussel M.F., Quelle D.E., Downing J.R., Ashmun R.A., Grosveld G. and Sherr C.J. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell.*; 91(5): 649-659

Kang H., Cui K. and Zhao K. (2004) BRG1 controls the activity of the retinoblastoma protein via regulation of p21/CIP1/WAF1/SDI. *Mol Cell Biol.*; 24(3): 1188-1199

Kapuy O., He E., López-Avilés S., Uhlmann F., Tyson J.J. and Nývák B. (2009) System-level feedbacks control cell cycle progression. *FEBS Lett.*; 583(24): 3992-3998

Kasten M. and Giordano A. (2001) Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

transactivation activity. *Oncogene*.; 20(15): 1832-1838

Kaur B., Khwaja F.W., Severson E.A., Matheny S.L., Brat D.J. and Van Meir E.G. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol*.; 7(2): 134-153

Keith B. and Simon M.C. (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells and cancer. *Cell*.; 129(3): 465-472

Kesavapany S., Li B.S., Amin N., Zheng Y.L., Grant P. and Pant H.C. (2004) Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochim Biophys Acta*.; 1697(1-2): 143-153

Keyomarsi K., Conte D. Jr., Toyofuku W. and Fox M.P. (1995) Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene*.; 11(5): 941-950

Khosravi R., Maya R., Gottlieb T., Oren M., Shilon Y. and Shkedy D. (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 96(26): 14973-14977

Kitayner M., Rozenberg H., Kessler N., Rabinovich D., Shaulov L., Haran T.E. and Shaked Z. (2006) Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell*.; 22(6): 741-753

Kleihues P., Louis D.N., Scheithauer B.W., Rorke L.B., Reifenberger G., Burger P.C. and Cavenee W.K. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol Exp Neurol*.; 61(3): 215-25; discussion 226-229

- Knudson A.G. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 68(4): 820-823
- Knudson A.G. (1985) Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.*; 45(4): 1437-1443
- Ko L.J. and Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.*; 10(9): 1054-1072
- Komander D., Ciague M.J. and Urbé S. (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 10(8): 550-563
- Kruse J.P. and Gu W. (2009) Modes of p53 regulation. *Cell.*; 137(4): 609-622
- Kubbutat M.H., Jones S.N. and Vousden K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.*; 387(6630): 299-303
- Laptenko O. and Prives C. (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.*; 13(6): 951-961
- Lazzi S., Bellan C., De Falco G., Ferrari F., Nyongo A., Claudio P.P., Tosi G.M., Vatti R., Gloghini A., Carbone A., Giordano A., Leoncini L. and Tosi P. (2002) Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. *Hum Pathol.*; 33(7): 723-731
- Lee E.Y., Chang C.Y., Hu N., Wang Y.C., Lai C.C., Herrup K., Lee W.H. and Bradley A. (1992) Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature.*; 359(6393): 288-294
- Lee E.Y., To H., Shew J.Y., Bookstein R., Scully P. and Lee W.H.

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

(1988) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science.*; 241(4862): 218-221

Lee J.O., Russo A.A. and Pavletich N.P. (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature.*; 391(6670): 859-865

Lee J.S., Gil J.E., Kim J.H., Kim T.K., Jin X., Oh S.Y., Sohn Y.W., Jeon H.M., Park H.J., Park J.W., Shin Y.J., Chung Y.G., Lee J.B., You S. and Kim H. (2008) Brain cancer stem-like cell genesis from p53-deficient mouse astrocytes by oncogenic Ras. *Biochem Biophys Res Commun.*; 365(3): 496-502

Lee W.H., Shew J.Y., Hong F.D., Sery T.W., Donoso L.A., Young L.J., Bookstein R. and Lee E.Y. (1987) The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature.*; 329(6140): 642-645

Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.*; 88(3): 323-331

Levine A.J. and Oren M. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.*; 9(10): 749-758

Li T., Kon N., Jiang L., Tan M., Ludwig T., Zhao Y., Baer R. and Gu W. (2012) Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell.*; 149(6): 1269-1283

Lin A.W. and Lowe S.W. (2001) Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 98(9): 5025-5030

Lolli G. and Johnson L.N. (2005) CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell control and a target for drugs? *Cell Cycle*.; 4(4): 572-577

López Avilés S., Kapuy O., Novák B. and Uhlmann F. (2009) Irreversibility of mitotic exit is the consequence of systems level feedback. *Nature*.; 459(7246): 592-595

Louis D.N. (1994) The gene p53 and protein in human brain tumours. *J. Neuropathol Exp Neurol*.;53(1):11-21

Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P. and Ellison D.W. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*.;131(6): 803-20

Loyer P., Trembley J.H., Katona R., Kidd V.J. and Lahti J.M. (2005) Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal*.; 17(9): 1033-1051

Lowe S.W. and Ruley H.E. (1993) Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*.; 7(4): 535-545

Luo J., Lu Z., Lu X., Chen L., Cao J., Zhang S., Ling Y. and Zhou X. (2013) OTUD5 regulates p53 stability by deubiquitinating p53. *PLOS ONE*.; 8(10): e77682

Ma Y.H., Mentlein R., Knerlich F., Kruse M.L., Mehdorn H.M. and Held-Feindt J. (2008) Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*.; 86(1): 31-45

Maher E.A., Furnari F.B., Bachoo R.M., Rowitch D.H., Louis D.N.,

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Cavenee W.K. and DePinho R.A. (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.*; 15(11): 1311-1333

Malumbres M. and Barbacid M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.*; 1(3): 122-231

Mandinova A. and Lee S.W. (2011) The p53 pathway as a target in cancer therapeutics: obstacles and promise. *Sci Transl Med.*; 3(64): 64rv1

Marino S., Vooijs M., van der Gulden H., Jonkers J. and 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 Dev.*; 14(8): 994-1004

Marión R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M and Blasco M. A. (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature.*; 460(7259): 1149-1153

Markowitz S., Wang J., Myeroff L., Parson R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R.S. Zborowska E., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.*; 268(52215): 1336-1338

McCarthy K.D and de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.*; 85(3): 890-902

Meek D.W. (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?. *Oncogene.*; 18(53): 7666-7675.

- Miyaki M. and Kuzoki T. (2003) Role of Smad4 (DpC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*; 306(4): 799-804
- Momand J., Zambetti G.P., Olson D., George D. y Levine A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.*; 69(7): 1237-1245
- Morgan D.O. (2007) The cell cycle: principles of control, 1st ed. London, UK: New Science Press
- Muller H., Bracken A.P., Vernell R., Moroni M.C., Christians F., Grassilli E., Prosperini E., Vigo E., Oliner J.D. and Helin K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation and apoptosis. *Genes Dev.*; 15(3): 267-285
- Nagy A., Chang S.H., Shih S.C., Dvorak A.M. and Dvorak H.F. (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.*; 36(3): 321-331
- Nevins J.R. (1992) Transcriptional regulation. A closer look at E2F. *Nature.*; 358(6385): 375-376
- Nguyen T.B., Manova K., Capodieci P., Lindon C., Bottega S., Wang X.Y., Refik-Rogers J., Pines J., Wolgemuth D.J. and Koff A. (2002) Characterization and expression of mammalian cyclin B3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem.*; 277(44): 41960-41969
- Nicolis S.K. (2007) Cancer stem cells and 'stemness' genes in neurooncology. *Neurobiol Dis.*; 25(2): 217-229
- Nigg E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 2(1): 21-32
- Nijman S.M., Luna-Vargas M.P., Velds A., Brummelkamp T.R., Dirac

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

A.M., Sixma T.K. and Bernards R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell.*; 123(5): 773-786

Nishimori H., Shiratsuchi T., Urano T., Kimura Y., Kiyono K., Tatsumi K., Yoshida S., Ono M., Kuwano M., Nakamura Y. and Tokino T. (1997) A novel brain-specific p53-target gene BAI1, containing Thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene.*; 15(18): 1245-1250

Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamahita T., Tokino T., Taniguchi T. and Tanaka N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.*; 288(5468): 1053-1058

Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y. and Taya Y. (2000) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.*; 102(6): 849-862

Paggi M.G., Baldi A., Bonetto F. and Giordano A. (1996) Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review. *J Cell Biochem.*; 62(3): 418-430

Pardee A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.*; 246(4930): 603-608

Peters J.M. (2006) Anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 7(9): 644-56

Phi J.H., Park S.H., Kim S.K., Paek S.H., Kim J.H., Lee Y.J., Cho B.K., Park C.K., Lee D.H. and Wang K.C. (2008) Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway.

Am J Surg Pathol.; 32(1): 103-112

Pietenpol J.A., Stein R.W., Moran E., Yaciuk P., Schlegel R., Lyons R.M., Pittelkow M.R., Münger K., Howley P.M. and Moses H.L. (1990) TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell.*; 61(5): 777-785

Polager S., Kalma Y., Berkovich E. and Ginsberg D. (2002) E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene.*; 21(3): 437-446

Prigent S.A., Nagane M., Lin H., Huvar I., Boss G.R., Feramisco J.R., Cavenee W.K. and Huang H.S. (1996) Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem.*; 271(41): 25639-25645

Puri N., Krishnamurthy S., Habib S., Hasnain S.E., Goswami S.K. and Prasad R. (1999) CDR1, a multidrug resistance gene from *Candida albicans*, contains multiple regulatory domains in its promoter and the distal AP-1 element mediates its induction by miconazole. *FEMS Microbiol Lett.*; 180(2): 213-219

Raica M., Cimpean A.M. and Ribatti D. (2009) Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer.*; 45(11): 1924-1934

Ramirez-Castillejo C., Sánchez-Sánchez F., Andreu-Agulló C., Ferrón S.R., Aroca-Aguilar J.D., Sánchez P., Mira H., Escribano J. and Fariñas I. (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci.*; 9(3): 331-339

Ren B., Cam H., Takahashi Y., Volkert T., Terragni J., Young R.A. and Dynlacht B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

repair, replication and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.*; 16(2): 245-256

Ren S. and Rollins B.J. (2004) Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell.*; 117(2): 239-251

Repansky G.A., Chenette E.J. and Der C.J. (2004) Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?. *Trends Cell Biol.*; 14(11): 639-647

Rich J.N., Zhang M., Datto M.B., Bigner D.D. and Wang X.F (1999) Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J Biol Chem.*; 274(49): 35053-35058

Richards L., Whitley O.K.N., MacLeod G., Cavalli F.M.G, Coutinho F.J., Jaramillo J.E., Svergun N., Riverin M., Croucher D.C., Kushida M., Yu K., Ghilhamon P., Rastegar N., Ahmadi M., Bhatti J.K., Bozek D.A., Li N., Lee L., Che C., Luis E., Park N.I., Xu Z., Ketela T., Moore R.A., Marra M.A., Spears J., Cusimano M.D., Das S., Bernstein M., Haibe-Kains B., Lupien M., Luchman H.A., Weiss S., Angers S., Dirks P.B., Bader G.D., and Pugh T.J. (2021) Gradient of Developmental and Injury Response transcriptional states defines functional vulnerabilities underpinning glioblastoma heterogeneity. *Nat Cancer.*; 2(2):157-173

Riley T., Sontag E., Chen P. and Levine A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 9(5): 402-412

Roberts P.J. and Der C.J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK

mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.*; 26(22): 3291-3310

Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Khwaja A., Marte B.M., Pappin D., Das P., Waterfield M.D., Riedley A. and Downward J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actine cytoskeleton by Ras. *Cell.*; 89(3): 457-467

Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S. and Bonner V.M. (1998) DNA-double stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.*; 273(10): 5858-5868

Rogakou E.P., Boon C., Redon C. and Bonner W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol.*; 146(5): 905-916

Rojas A.M., Fuentes G., Rausell A. and Valencia A. (2012) The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol.*; 196(2): 189–201

Santamaria D., Barrière C., Cerqueira A., Hunts S., Tardy C., Newton K., Cáceres J.F., Dubus P., Malumbres M. and Barbacid M. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.*; 448(7155): 811-815

Sayer J.A., Carr G. and Simmons N.L. (2004) Calcium phosphate and calcium oxalate crystal handling is dependent upon CLC-5 expression in mouse collecting duct cells. *Biochem Biophys Acta.*; 1689(1): 83-90

Scaffidi P. and Bianchi M.E. (2001) Spatially precise DNA bending is an essential activity of the Sox2 transcription factor. *J Biol Chem.*; 276(50): 47296-47302

Schmitz M., Temme A., Senner V., Ebner R., Schwind S., Stevanovic

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

S., Wehner R., Schackert G., Schackert H.K., Fussel M., Bachmann M., Rieber E.P. and Weigle B. (2007) Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T-cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*; 96(8): 1293-1301

Sedelnikova O.A., Pilch D.R., Redon C. and Bonner W.M. (2003) Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther*; 2(3): 233-235

Selvakumaran M., Lin H.K., Miyashita T., Wang H.G., Krajewski S., Reed J.C., Hoffman B. and Liebermann D. (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*; 9(6): 1791-1798

Seoane M., Iglesias P., González T., Dominguez F., Fraga M., Aliste C., Forteza J. and Costoya J.A. (2008) Retinoblastoma loss modulates DNA damage response favoring tumor progression. *PLoS One*; 3(11): e3632

Seoane M., Costoya J.A. and 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). *Sci Rep*; 7(1): 12991

Serrano M. (1997) The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*; 237(1): 7-13

Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D. and Lowe S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*; 88(5): 593-602

Shao Z. and Robbins P.D. (1995) Differential regulation of E2F and

- Sp1-mediated transcription by G1 cyclins. *Oncogene.*; 10(2): 221-228
- Sherr C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science.*; 274(5293): 1672-1677
- Sherr C.J. (1998) Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.*; 12(19): 2984-2991
- Sherr C.J. and Weber J.D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.*; 10(1): 94-99
- Sherr C.J. and Roberts J.M. (1999) CDK inhibitors positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*; 13(12): 1501-1512
- Shi D, Pop M.S., Kulikov R., Love I.M., Kung A.L. and Grossman S.R. (2009) CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 106(38): 16275-16280
- Sionov R.V. and Haupt Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.*; 18(45): 6145-57
- Sindransky D., Mikkelsen T., Schwechheimer K., Rosenblum M.L., Cavanee W. and Vogelstein B. (1992) Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature.*; 355(6363): 846-847
- Smith E.J., Leone G. and Nevins J.R. (1998) Distinct mechanisms control the accumulation of the Rb-related p107 and p130 proteins during cell growth. *Cell Growth Differ.*; 9(4): 297-303
- Squires M.S, Nixon P.M. and Cook S.J. (2002) Cell-cycle arrest by PD184352 requires inhibition of extracellular signal-regulates kinases (ERK) 1/2 but not ERK5/BMK1. *Biochem J.*; 366(2): 673-680

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Studer L., Csete M., Lee S.H., Walikonis J., Wold B. and McKay R. (2000) Enhanced proliferation, survival and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci.*; 20(19): 7377-7383

Sung C., Dedrick R.L., Hall W.A., Johnson P.A. and Youle R.J. (1993) The spatial distribution of immunotoxins in solid tumors: assessment by quantitative autoradiography. *Cancer Res.*; 53(9): 2092-2099

Symonds H., Krall I., Remington L., Saenz-Robles M., Lowe S., Jacks T. and Van Dyke T. (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression *in vivo*. *Cell.*; 78(4): 703-711

Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y. and Nakamura Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature.*; 404(6773): 42-49

Tamrakar S. and Ludlow J.W. (2000) The carboxyl-terminal region of the retinoblastoma protein binds non-competitively to protein phosphatase type 1alpha and inhibits catalytic activity. *J Biol Chem.*; 275(36): 27784-27789

The Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathway. *Nature.*; 455(7216): 1061-1068

Thornton B.R. and Toczyski D.P. (2003) Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat Cell Biol.*; 5(12): 1090-1094

Tohma Y., Gratas C., Biernat W., Peraud A., Fukuda M., Yonekawa Y.,

- Kleihues P. and Ohgaki H. (1998) PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastoma (*de novo*) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 57(7): 684-689
- Ubersax J.A., Woodbury E.L., Quang P.N., Paraz M., Blethrow J.D. Shah K., Shokat K.M. and Morgan D.O. (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature.*; 425(6960): 859-864
- Uwanogho D., Rex M., Cartwright E.J., Pearl G., Healy C., Scotting P.J. and Sharpe P.T. (1995) Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev.*; 49(1-2): 23-36
- Van Meir E.G., Polverini P.J., Chazin V.R., Su Huang H.J., de Tribolet N. and Cavenee W.K. (1994) Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of *wild-type* p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet.*; 8(2): 171-176
- Vetter I.R. and Wittinghoffer A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.*; 294(5545): 1299-1304
- Vogelstein B., Lane D. and Levine A.J. (2000) Surfing the network. *Nature.*; 408(6810): 307-310
- Vousden K.H. and Lane D.P. (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 8(4): 275-283
- Vousden K.H. and Prives C. (2009) Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell.*; 137(3): 413-431
- Wadgaonkar R. and Collins T. (1999) Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J Biol Chem.*; 274(20): 13760-13767

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

Wang P., Reed M., Wang Y., Mayr G., Stenger J.E., Anderson M.E., Schwedes J.F. and Tegtmeier P. (1994) p53 domains: structure, oligomerization and transformation. *Mol Cell Biol.*; 14(8): 5182-5191

Watanabe K., Sato k., Biernat W., Tachibana O., von Ammon K., Ogata N., Yonekaawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiples biopsies. *Clin Cancer Res.*; 3(4): 523-530

Wegner M. and Stolt C.C. (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.*; 28(11): 583-588

Weinberg R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.*; 81(3): 323-330

Weinmann A.S., Yan P.S., Oberley M.J., Huang T.H. and Farham P.J. (2002) Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Gene Dev.*; 16(2): 235-244

Welch P.J. and Wang J.Y. (1995) Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and independent mechanisms. *Mol Cell Biol.*; 15(10): 5542-5551

Wennerberg K., Rossman K.L. and Der C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.*; 118(5): 843-846

Wiedemeyer R., Brennan C., Heffernan T.P., Xiao Y., Mahoney J., Protopopov A., Zheng H., Bignell G., Furnari F., Cavenee W.K., Hahn W.C., Ichimura K., Collins V.P., Chu G.C., Stratton M.R., Ligon K.L., Futreal P.A. and Chin L. (2008) Feedback circuit among INK4 tumor

suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell.*; 13(4): 355-364

Woods D., Parry D., Cherwinski H., Bosch E., Lees E. and McMahon M. (1997) Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21^{Cip1}. *Mol Cel Biol.*; 17(9): 5598-5611

World Health Organization (2010) Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. *WHO Technical Report Series 878, Annex 1*. Geneve, Switzerland: WHO Press

Wu L. and Maki C.G. (2005) MDM2: RING finger protein and regulator of p53. In: Iuchi S. and Kuldell N., editors. *Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function*. (p.p. 252-260) Georgetown (TX), USA: Landes Bioscience/Eurekah.com and Kluwer Academic/ Plenum Publisher

Fearon E.R. and Volgestein B. (1997) Tumor suppressor and DNA repair gene defects in human cancer. In: Holland J.F., Bast R.C., Morton D.L., Frei E., Kufe D.W. and Weichselbaum R.R., editors. *Cancer medicine*, 4th ed. (p.p. 97-117), Baltimore, USA: Williams & Wilkins

Xiao Z., Chen J., Levine A.J., Modjtahedi N., Xing J., Sellers W.R. and Livingston D.M. (1995) Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature.*; 375(6533): 694-698

Zappone M.V., Galli R., Catena R., Meani N., De Biasi S., Mattei E., Tiveron C., Vescovi A.L., Lovell-Badge R., Ottolenghi S. and Nicolis S.K. (2000) Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the

C. G. LÓPEZ DEL CASTILLO

mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development.*; 127(11): 2367-2382

Zhu Y., Guignard F., Zhao D., Liu L., Burns D.K., Mason R.P., Messing A. and Parada L.F. (2005) Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell.*; 8(2): 119-130

Zuo L., Weger J., Yang Q., Goldstein A.M., Tucker M.A., Walker G.J., Hayward N. and Dracopoli N.C. (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.*; 12(1): 97-99









