



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Utilización de células madre tumorales derivadas de pacientes para
identificar posibles blancos terapéuticos que determinen la capacidad
invasiva de gliomas de alto grado**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área Química Biológica

Olivia Morris Hanon

Director de tesis: Dr. Guillermo Videla Richardson

Directora Adjunta: Dra. Paola Rojas

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vazquez

Lugar de trabajo: Instituto de Neurociencias (INEU-CONICET), Fundación para la Lucha contra
las Enfermedades Neurológicas de la Infancia

Buenos Aires, 2024

Resumen

El glioblastoma (GBM) es el tumor primario maligno más común y letal del sistema nervioso central y, a pesar de décadas de investigación, el pronóstico de los pacientes con GBM no ha mejorado sustancialmente. La dificultad para desarrollar tratamientos más efectivos se adjudica, en parte, a la presencia de células madre tumorales (CMT). Estas células son capaces de resistir a las terapias antineoplásicas, pudiendo regenerar el tumor luego de su resección. El carácter difuso de los GBM es otro factor que dificulta el desarrollo de terapias efectivas. Estos tumores no tienen bordes histológicamente claros y definidos. En la periferia, las células tumorales se encuentran invadiendo el parénquima cerebral normal. Esta habilidad para invadir imposibilita la resección total del tumor mediante cirugía y conlleva la generación de nuevos focos tumorales. A pesar del rol central de la migración e invasión celular en la progresión y la recurrencia del GBM, no se han desarrollado tratamientos que tengan como blanco estos procesos. Más aún, algunos tratamientos incluso son capaces de aumentar la capacidad invasiva de estas neoplasias.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se propuso como objetivo general de esta tesis estudiar la capacidad migratoria e invasiva de las CMG. Para ello, dada la heterogeneidad inter-tumoral que presentan los GBM, se utilizaron varias líneas de CMG derivadas de pacientes con el fin de identificar posibles blancos terapéuticos que afecten estos procesos biológicos. A lo largo de este trabajo se evaluó la capacidad migratoria e invasiva de las líneas de CMG, tanto en condiciones basales de cultivo (normoxia), como en respuesta a hipoxia (1% O₂ durante 72 horas) ya que la hipoxia es un inductor conocido de la migración e invasión en GBM.

Los ensayos de migración *in vitro* revelaron una elevada variabilidad entre las distintas líneas de CMG. Se observó que algunas de ellas exhiben una capacidad migratoria de hasta cinco veces mayor que la de otras. Además, encontramos que, en respuesta a hipoxia, cinco de las ocho líneas analizadas aumentan su capacidad migratoria, una no se ve afectada y, llamativamente, otras dos la disminuyen. Respecto a la capacidad de invasión, no se

observó una relación directa entre la invasión y la migración. Por ejemplo, una línea de CMG presentó la menor capacidad migratoria, pero a su vez, exhibió la mayor capacidad invasiva.

Con el fin de comprender la variabilidad en la migración/invasión entre las líneas tumorales, se realizó una secuenciación masiva del transcriptoma, tanto en normoxia como en hipoxia en cuatro líneas de CMG. La secuenciación permitió analizar la heterogeneidad entre estas líneas en cuanto a la expresión diferencial de genes y el enriquecimiento de conjuntos de genes asociados a procesos biológicos o a factores de transcripción. Con estos análisis se confeccionó un listado con numerosos posibles blancos terapéuticos. De esta selección inicial de genes, se priorizaron aquellos que mostraron una elevada expresión y una baja variabilidad entre réplicas. De acuerdo con estos criterios, se eligieron seis genes candidatos para ser evaluados en profundidad: HIF1 α , HIF2 α , fibronectina 1 (FN1), condroitínsulfato *proteoglicano* 5 (CSPG5), y las galectinas 1 y 3 (LGAS1 y LGALS3).

Para evaluar la relevancia de HIF1 α y HIF2 α en la capacidad migratoria e invasiva de CMG, llevamos a cabo los silenciamientos génicos de los mismos utilizando ARN pequeños de interferencia (siRNA) y, posteriormente, realizamos ensayos de migración e invasión *in vitro*. En todas las líneas de CMG pudimos observar que HIF1 α y/o HIF2 α afectan la migración. Sorprendentemente, en algunas líneas de CMG el silenciamiento de estos factores de transcripción condujo a la inhibición de la migración, mientras que, en otras, a un incremento de esta. De manera similar, el silenciamiento de CSPG5 también generó efectos variables entre las líneas de CMG, ya que su silenciamiento llevó a un aumento de la migración sólo en dos de las líneas de CMG estudiadas. Al silenciar FN1 se observó que su silenciamiento llevaba a un aumento de la migración en dos líneas. El rol de FN1 en la migración también se evaluó agregando concentraciones definidas de esta proteína a los componentes de la matriz extracelular empleada como sustrato en los ensayos migratorios. Pudimos observar que bajas concentraciones de fibronectina recombinante aumentan la migración de las CMG, mientras que concentraciones mayores la inhiben. Cabe resaltar que este efecto dual se observó en todas las líneas de CMG. El efecto del silenciamiento de LGALS1 sobre la migración fue homogéneo en todas las líneas de CMG ensayadas, la

disminución de su expresión conllevó una menor capacidad migratoria. El silenciamiento de LGALS3, en cambio, disminuyó la migración en todas las líneas exceptuando una.

Por último, se evaluó si las líneas de CMG que exhibieron una baja capacidad migratoria en normoxia e hipoxia, son capaces de aumentar su migración frente a otros estímulos. Para ello, se evaluó el efecto de medios condicionados en la capacidad migratoria de las líneas CMG. En particular, se evaluaron dos tipos de medios condicionados medio condicionado por macrófagos y medio condicionado por la misma línea de CMG. Se observó que una de las líneas de CMG con baja migración basal cuya capacidad migratoria e invasora disminuye con la hipoxia, aumenta notablemente su migración con medios condicionados. Este resultado evidencia que la baja migración de esta línea, no se debe a una inhabilidad para migrar sino a la falta de estímulos externos precisos.

En conclusión, en esta tesis se lograron identificar numerosos genes que podrían representar posibles blancos terapéuticos para interferir en la invasión del GBM, en particular, la invasión en respuesta a la hipoxia. Sin embargo, los resultados obtenidos resultaron muy variables entre las líneas celulares estudiadas, recalcando la importancia de considerar la heterogeneidad inter-tumoral a la hora de desarrollar terapias.

Palabras clave: GLIOBLASTOMA, CÉLULAS MADRE TUMORALES, MIGRACIÓN, INVASIÓN, TRANSCRIPTÓMICA, HIPOXIA

Abstract

Use of patient-derived tumor stem cells to identify potential therapeutic targets that determine the invasive capacity of high-grade gliomas.

Glioblastoma (GBM) is the most common and lethal primary malignant tumor of the central nervous system. Despite decades of research, the prognosis of patients with GBM has not substantially improved. The difficulty in developing more effective treatments is attributed, in part, to the presence of tumor stem cells (TSC). These cells can resist antineoplastic therapies and can regenerate the tumor after its resection. The diffuse nature of GBM is another factor that hinders the development of effective therapies. These tumors do not have clear and defined histological borders. In the periphery of the tumor, tumor cells are found invading the normal brain parenchyma. This ability to invade makes total resection of the tumor by surgery impossible and leads to the generation of new tumor foci. Despite the central role of cell migration and invasion in GBM progression and recurrence, no treatments have been developed that target these processes. Furthermore, many treatments can increase the invasive capacity of these tumors.

Taking these considerations into account, the general objective of this thesis was to study the migratory and invasive capacity of GSCs. To this end, given the inter-tumor heterogeneity that GBM presents, several GSC lines derived from patients were used to identify possible therapeutic targets that affect these biological processes. Throughout this work, the migratory and invasive capacity of the GSC lines was evaluated, both under basal culture conditions (normoxia) and in response to hypoxia (1% O₂ for 72 hours) as hypoxia is a known inducer of migration in GBM.

In vitro migration assays revealed a high variability between the different GSC lines. Some cell lines exhibit a migratory capacity up to five times greater than that of others. Furthermore, we found that, in response to hypoxia, five of the eight lines analyzed increase their migratory capacity, one cell line is not affected and, strikingly, two others show decreased migration. Regarding the invasion capacity, it was not possible to establish a

direct relationship between invasion and migration. For example, a GSC line exhibited the lowest migratory capacity, and exhibited the highest invasive capacity.

To understand the variability observed in migration/invasion between tumor lines, high-throughput transcriptome sequencing was performed, both in normoxia and hypoxia in four GSC lines. Sequencing allowed us to analyze the heterogeneity between these lines in terms of the differential expression of genes and the participation of pathways associated to biological processes as well as transcription factors. With this analysis on the pathways, transcription factors and genes differentially expressed a list was made with numerous possible therapeutic targets. From this initial selection of genes, those that showed high expression and low variability between replicates were prioritized. According to these criteria, four candidate genes were chosen to be further evaluated: HIF1 α , HIF2 α , fibronectin 1 (FN1), and chondroitin sulfate proteoglycan 5 (CSPG5).

To evaluate the relevance of HIF1 α and HIF2 α in the migratory and invasive capacity of CMG, we carried out gene silencing of them using small interfering RNA (siRNA) and subsequently performed in vitro migration and invasion assays. In all CMG lines we could observe that HIF1 α and/or HIF2 α affect migration. Surprisingly, in some CMG lines the silencing of these transcription factors led to the inhibition of migration, while in others, to an increase in it. Similarly, silencing of CSPG5 also generated variable effects between CMG lines, since its silencing led to an increase in migration in only two of the CMG lines studied. The role of FN1 in migration was evaluated by adding defined concentrations of this protein to the components of the extracellular matrix used as substrate in the migratory assays. We were able to observe that low concentrations of recombinant fibronectin increase GSC migration, while higher concentrations inhibit it. It should be noted that this dual effect was observed in all CMG lines. The effect of LGALS1 silencing on migration was homogeneous in all the CMG lines tested; the decrease in its expression led to a lower migratory capacity. Silencing of LGALS3, on the other hand, decreased migration in all lines except one.

Finally, we evaluated whether CMG lines that exhibited a low migratory capacity in normoxia and hypoxia can increase their migration in the face of other stimuli. To this end, the effect

of conditioned media on the migratory capacity of CMG lines was evaluated. Two types of conditioned media were evaluated: medium conditioned by macrophages and medium conditioned by the same CMG line. It was observed that one of the CMG lines with low basal migration whose migratory and invasive capacity decreases with hypoxia, notably increases its migration with conditioned media. This result shows that the low migration of this line is not due to an inability to migrate but to the lack of precise external stimuli.

In conclusion, in this thesis we were able to identify numerous genes and signaling pathways that could represent possible therapeutic targets to interfere with GBM invasion, in particular, invasion in response to hypoxia. However, the results obtained were very variable between the cell lines studied, emphasizing the importance of considering inter-tumor heterogeneity when developing therapies, within the framework of precision medicine.

Key words: GLIOBLASTOMA, CANCER STEM CELLS, MIGRATION, INVASION, TRANSCRIPTOMICS, HYPOXIA

Agradecimientos

Esta tesis solamente fue posible por la ayuda incalculable que recibí en todos los ámbitos de mi vida.

En el FLENI quiero agradecer a mi director Willy por enseñarme y guiarme desde el primer momento. A Marie por su acompañamiento constante. Su experiencia y apoyo fueron fundamentales. Quiero agradecer al grupo del LIAN, fue maravilloso ver el grupo crecer y formar el equipo que es hoy. A Marian y Luisi por ser las mejores compañeras que me pudieron haber tocado. Al Dr. Gustavo Sevlever, gracias por las oportunidades y su apoyo a lo largo del proyecto. Del IBYME quiero agradecer a mi directora adjunta Dra. Paola Rojas y a todo el equipo de Dr. Gabriel Rabinovich, con quienes disfrute una colaboración enriquecedora.

Quiero también tomarme un espacio para agradecer a las instituciones que hicieron posible mi formación y mi trabajo. A la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, que me dio una formación de la cual puedo estar orgullosa y que fue mi segundo hogar por casi una década. Al CONICET gracias por el financiamiento que me permitió realizar este proyecto.

A Elba Vázquez, mi consejera de estudios, por su acompañamiento en este viaje complejo y largo, gracias por simplificarlo.

Quiero agradecer a mis papas y a mis hermanos que fueron pilares a lo largo de todo este viaje, gracias ustedes pude hacer esto. A Pili, no sé cómo explicar lo que significa que me hayas acompañado a lo largo de este viaje y estoy muy agradecida que no tuve que recorrerlo sola. A Mati, sería imposible enumerar lo que hiciste por mí para apoyarme con esta tesis y en este momento de mi vida. Estoy muy agradecida de saber que te tengo para siempre.

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo de todas estas maravillosas personas, y les estaré eternamente agradecida.

Índice

Resumen.....	2
Abstract	5
Agradecimientos.....	8
Índice.....	9
Introducción.....	13
Tumores del sistema nervioso central (SNC).....	13
Gliomas	13
Características diagnósticas del GBM	16
Epidemiología del GBM	18
Clasificación del GBM.....	18
Tratamientos para el GBM	20
Células madre tumorales	22
Células madre normales	22
Historia de células madre tumorales.....	23
Características de células madre tumorales.....	25
Capacidad tumorigénica de CMT	27
Plasticidad de CMT	27
Resistencia de CMT	30
Inmunosupresión de CMT	30
Modelos de células madre tumorales.....	31
Migración e invasión en glioblastoma	32
Carácter difuso del glioblastoma	33

Mecanismos de migración e invasión	34
Patrones de invasión en GBM	37
Composición de la matriz extracelular del parénquima cerebral	38
Composición de la MEC de las vías de materia blanca	42
Composición de la MEC de la zona perivascular	43
Proteasas extracelulares producidas por GBM.....	46
Transiciones fenotípicas asociadas a migración e invasión	47
La hipoxia como inductor de la migración e invasión	50
Consecuencias de la migración e invasión	53
Hipótesis y objetivos	54
Materiales y Métodos	56
Métodos de cultivo celular	56
Líneas celulares	56
Cultivo de las líneas CMG	56
Cultivo y diferenciación de la línea Thp1	57
Criopreservación de las líneas celulares	57
Ensayos de migración e invasión.....	58
Ensayo migratorio de esfera.....	58
Ensayo de herida	59
Ensayo invasivo de esfera.....	59
Ensayo de viabilidad por ioduro de propidio	60
Métodos para la secuenciación de ARN.....	60
Preparación de muestras para secuenciación de ARN	60
Secuenciación y alineamiento de muestras de ARN	61

Flujo de trabajo para el análisis de secuenciación	62
Ensayos de biología molecular	65
Extracción de ARN, retrotranscripción y PCR cuantitativa	65
Análisis de expresión por western blot	67
Silenciamiento génico transitorio mediante ARN de transferencia	69
Generación de medios condicionados	70
Resultados	72
Estudio de la capacidad migratoria e invasiva de distintas líneas de CMG derivadas de pacientes	72
Modelo de líneas de CMG derivadas de pacientes	72
Migración de CMG en condiciones de normoxia e hipoxia	75
Invasión en condiciones basales (normoxia) y de hipoxia	86
Adhesión en líneas de CMG	89
Viabilidad de líneas de CMG en normoxia e hipoxia	92
Conclusiones parciales	93
Secuenciación masiva de ARN bajo concentraciones de 20% y 1% de oxígeno	95
Análisis global de la secuenciación de ARN	95
Genes diferencialmente expresados entre líneas CMG	100
Genes diferencialmente expresados en líneas de CMG en respuesta a hipoxia	115
Análisis global de vías de señalización basado en la secuenciación de ARN	125
Análisis global de la actividad de factores de transcripción basado en la secuenciación de ARN	127
Vías diferencialmente enriquecidas entre líneas CMG	129
Enriquecimiento y disminución de vías en respuesta a hipoxia	136

Análisis de cambios en la vía de HIF1 en respuesta a hipoxia	145
Posibles blancos para interferir en la migración o invasión.....	149
Conclusiones del capítulo.....	151
Evaluación de posibles blancos para modular migración e invasión	153
Efecto del silenciamiento de HIF1 α y HIF2 α en la migración e invasión de las CMG	153
Efecto del silenciamiento de proteoglicano condroitín sulfato 5 en la migración e invasión de CMG	166
Rol de fibronectina 1 en la migración e invasión de CMG	172
Efecto de los silenciamientos de galectina-1 y galectina-3 en la migración e invasión de CMG	180
Migración frente a otros estímulos	189
Conclusiones del capítulo.....	192
Conclusiones	195
Bibliografía	204

Introducción

Tumores del sistema nervioso central (SNC)

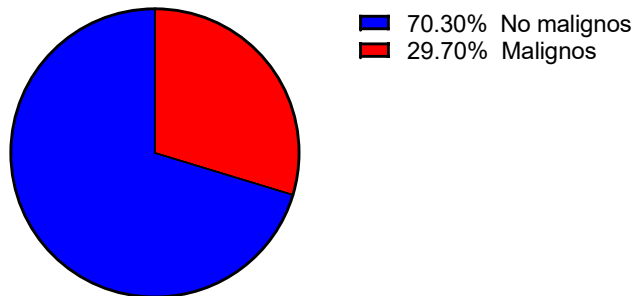
Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2% de todos los tumores diagnosticados^{1,2} pero son responsables del 7% de las muertes por cáncer en personas menores de 70 años³. Los tumores primarios del SNC, es decir tumores que se originan en el SNC, comprenden diversas entidades, incluyendo gliomas, meningiomas, adenomas hipofisarios y meduloblastomas. Estos tumores difieren entre sí en cuanto a sus orígenes celulares, características morfológicas, progresión y pronóstico. En la Figura 1 se puede observar que casi un 30% de los tumores del SNC son malignos, y dentro de estos, los gliomas (que incluye el glioblastoma) son la mayoría^{2,4}.

Gliomas

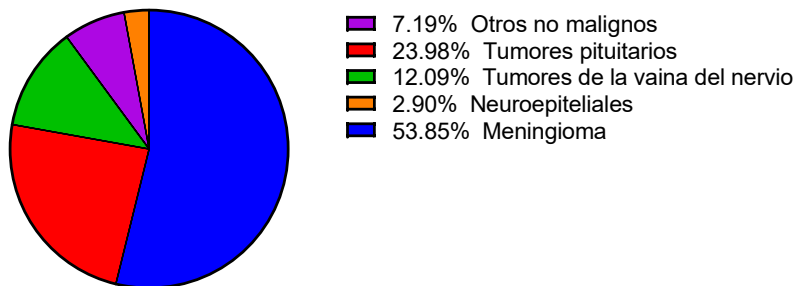
Glioma es un término que se refiere a una amplia variedad de tumores neuroepiteliales que derivan de las células gliales u otras células de origen neuroectodérmico, tales como células madre neurales y progenitores^{3,5}. Las células gliales son las células más abundantes del SNC e incluyen astrocitos, microglía, oligodendrocitos y sus progenitores. Las células microglía, aunque son consideradas células gliales, no se originan del mismo tejido ectodérmico del cual se originan las otras células gliales, sino que derivan de macrófagos primitivos del saco vitelino. Por lo tanto, no se las considera células de origen de los gliomas^{6,7}. Los astrocitos son las células gliales de mayor abundancia, y son responsable de una gran variedad de funciones, incluyendo el mantenimiento de homeostasis osmótica del cerebro, regulación de las sinapsis de las neuronas, y armado y

mantenimiento de la barrera hematoencefálica⁶. Los oligodendrocitos son las células responsables de producir la mielina en el SNC, una sustancia rica en lípidos que envuelve los axones de las neuronas, facilitando la rápida transmisión de impulsos eléctricos entre ellas ⁶.

Tumores primarios del SNC



Tumores primarios benignos del SNC



Tumores primarios malignos del SNC

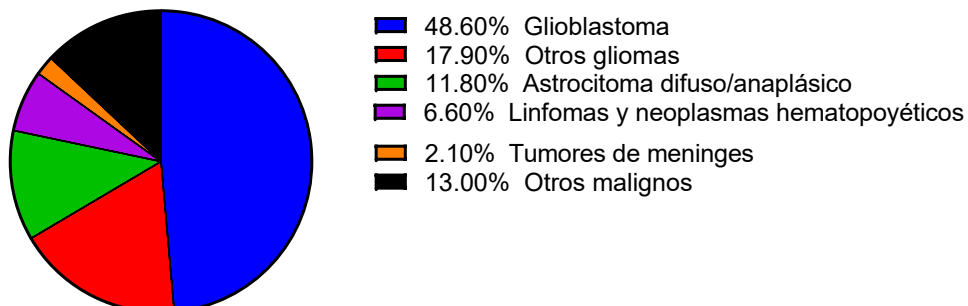


Figura 1. Tumores del SNC. Figura traducida y adaptada de Miller et al. ⁴

Como se puede observar en la Figura 1, los gliomas Pueden ser benignos, como el ependimoma, o malignos como el glioblastoma (GBM). Además, los gliomas constituyen la mayoría de los tumores malignos del SNC. Los gliomas se pueden clasificar según su histología y su perfil molecular utilizando la Clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central de la Organización Mundial de la Salud. En esta clasificación⁸, los gliomas de grado 1 se caracterizan por un crecimiento lento y una probabilidad baja de convertirse en malignos. Si bien los gliomas de grado 2 no poseen un comportamiento agresivo, suelen progresar con el tiempo a tumores de mayor grado. Los de grado 3, son más agresivos y conllevan un peor pronóstico, siendo tumores anaplásicos, con altas tasas de mitosis y una gran capacidad invasiva. La anaplasia se refiere a la pérdida de morfología específica del tejido y a la aparición de una morfología más indiferenciada. Finalmente, los gliomas de grado 4 son la forma de glioma más agresiva y maligna, e histológicamente están definidos por presencia de las características mencionadas para gliomas de grado 3, sumándose además la presencia de necrosis y proliferación microvascular⁸.

Los gliomas también se pueden categorizar por la definición de sus bordes. Mediante imágenes o durante la cirugía, estos tumores pueden definirse como gliomas circunscriptos o difusos (Figura 2). Los tumores circunscriptos crecen con bordes bien definidos con clara demarcación entre el tejido tumoral y el no tumoral. En cambio los tumores difusos no exhiben bordes definidos y tienen células que se infiltran dentro del parénquima no tumoral⁹. Por su parte, los gliomas difusos pueden ser de distintos grados (2, 3 o 4) según su velocidad de crecimiento y agresividad. Además, dada esta naturaleza difusa, estos tumores no pueden ser resecados completamente y la progresión de la enfermedad es prácticamente inevitable.

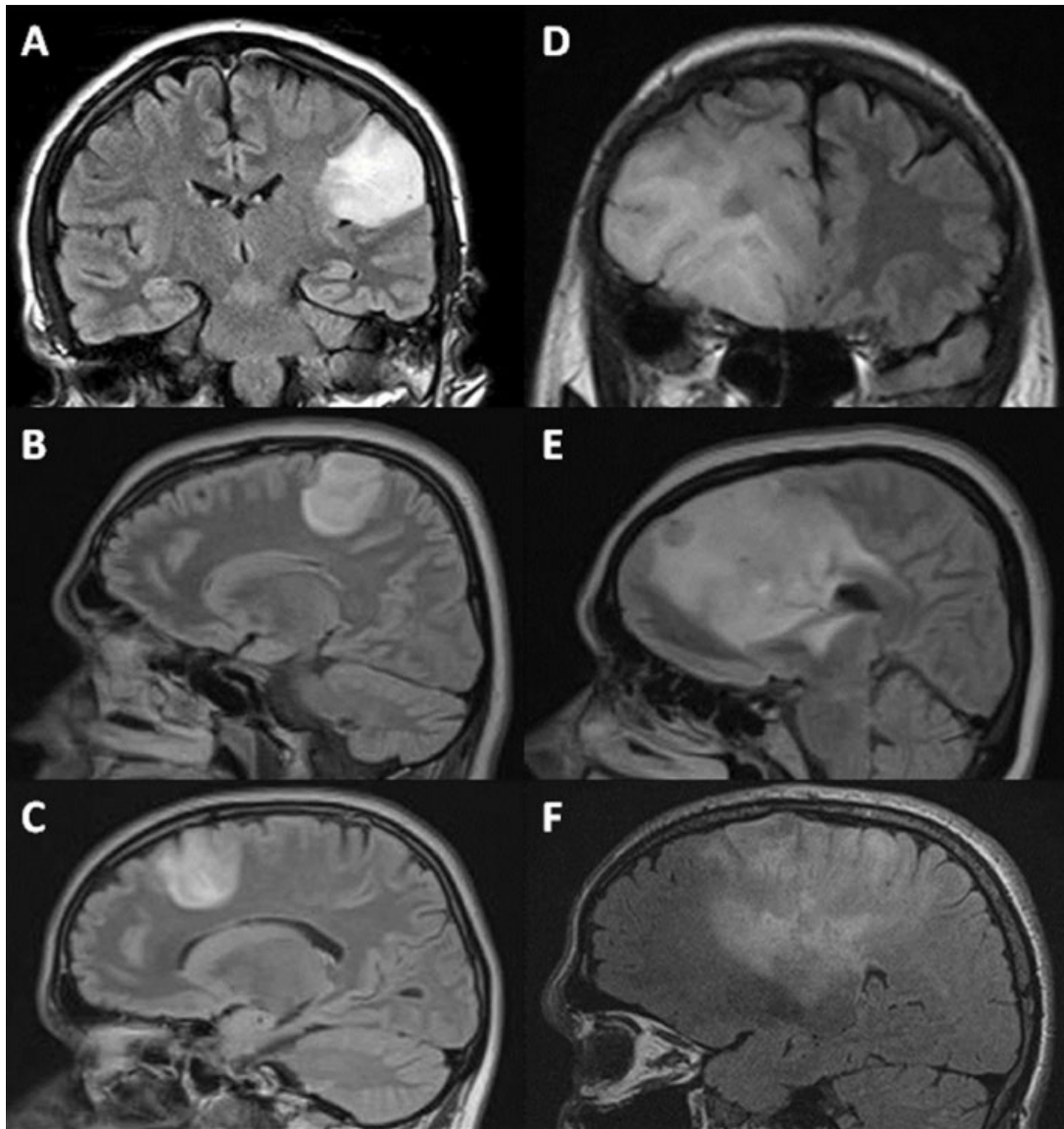


Figura 2. Imágenes de resonancia magnética nuclear de gliomas circunscriptos (A, B y C) y gliomas difusos (D, E y F). Imágenes extraídas de Khan et al.¹⁰

Características diagnósticas del GBM

El GBM es el tipo más común entre los gliomas de grado 4. Su clasificación depende de un perfil molecular particular que incluye: el gen de isocitrato deshidrogenasa (*IDH*) no mutado

(*wildtype*), mutaciones del promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), la combinación de ganancia del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10, la delección de CDKN2A y/o la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). No todos los GBM tienen todas estas características, pero, para su identificación como tal, se requieren varias. El perfil molecular se considera tan importante que actualmente un tumor con todas estas características se define como GBM (grado 4), independientemente de su histología¹¹.

Dos de las principales características histológicas distintivas del GBM son la proliferación vascular y la presencia de necrosis⁸, a menudo en pseudopalisada, una configuración celular asociada a células migrando alejándose de focos necróticos o hipóxicos¹². Además, los GBM exhiben una pronunciada heterogeneidad inter-tumoral e intra-tumoral, hecho que se refleja en su nombre original “glioblastoma multiforme”. Esta heterogeneidad se encuentra a nivel genotípico y fenotípico^{13,14}.

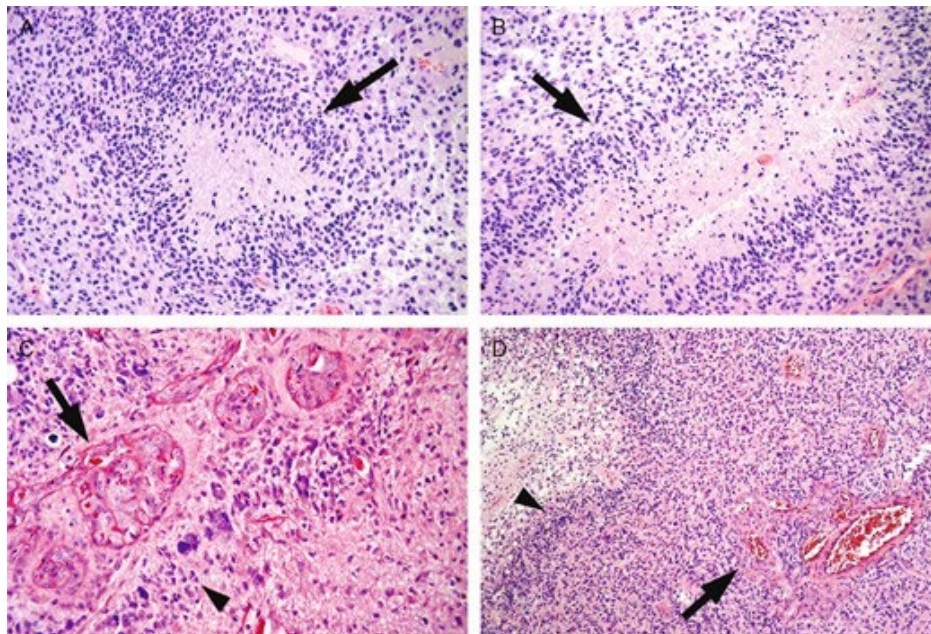


Figura 3. Características patológicas del GBM en cortes histológicos. (A) y (B) La flecha muestra células en estructura de pseudopalisada. (C) Microvasculatura. (D) Pseudopalisada con células migrando hacia la microvasculatura. Microfotografías tomadas de Rong et al¹⁵.

Epidemiología del GBM

Según un reporte estadístico del CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), entre 2016 y 2020 el GBM representó el 57 % de todos los gliomas, casi el 50 % de las neoplasias malignas primarias del SNC y tuvo una incidencia de 3,27 casos por cada 100.000 personas en la población de EE. UU. Notablemente, en la población identificada como hispanica en EE. UU. la incidencia observada fue significativamente menor, de 2,57 casos por cada 100.000 personas. Además, este tipo de tumor afectó primariamente a personas mayores, con una edad mediana de diagnóstico de 66 años². En 2023 Van't Hek *et al.* publicaron un trabajo analizando datos de casos clínicos de GBM en Latinoamérica entre 1985 y 2022 y encontraron que en Latinoamérica la edad media del diagnóstico de GBM era de 53,36 años, considerablemente más bajo que lo observado en EE. UU.¹⁶. Actualmente existen pocos reportes epidemiológicos de GBM en Argentina, aunque la existencia de reportes de gliomas en general indicaría que la información existe aunque no esté publicada¹⁷.

En varios estudios epidemiológicos en EE. UU. y en Latinoamérica se observan diferencias en la incidencia entre sexos. En EE. UU., según el reporte de CBTRUS, la incidencia en hombres fue 1,6 veces más alta que en mujeres², mientras que en el análisis de Van't Hek *et al.* la incidencia en hombres era 1,39 veces más alta que en mujeres¹⁶. También se reportó que el pronóstico en mujeres es levemente mejor que en hombres.^{2,18} Todavía no se pudieron elucidar las razones definitivas de estas diferencias, pero hay evidencias que apuntan a que las diferencias endocrinas, del metabolismo y las del sistema inmune entre los sexos, puedan ser responsables¹⁸.

Clasificación del GBM

Dentro del GBM existe una gran variabilidad inter-tumoral y, por lo tanto, se buscaron distintas formas de clasificar los tumores de GBM para poder trabajar con subtipos más homogéneos. En 2006 Phillips et al.¹⁹ propusieron tres subtipos: el subtipo proneural, el proliferativo y el mesenquimal basados en una firma transcripcional de 35 genes. En 2010 Verhaak et al.²⁰ establecieron una clasificación basada en 850 genes que ordenaba a los GBM en cuatro subtipos: clásico, neural, proneural y mesenquimal, y mostraba muchas similitudes con la clasificación de Phillips, pero definía a estos subtipos con más detalle. La clasificación de Verhaak se utilizó por muchos años pero, actualmente, en base a estudios mejorados basados en 150 genes, se han reclasificado los tumores en tres subtipos: clásico, proneural y mesenquimal^{21,22}. El grupo neural se descartó ya que, actualmente, su existencia se atribuye a la contaminación de muestras del tumor con células no cancerígenas. Si bien esta clasificación actualizada ha permitido en cierta medida tener pronósticos más fiables, principalmente ha facilitado el estudio de vías de señalización específicas y de la naturaleza de las células de GBM. Sin embargo, es difícil aplicar esta clasificación en todos los GBM ya que debido a su alta heterogeneidad intra-tumoral, es común encontrar tumores con características mixtas. Según esta clasificación, el subtipo proneural tiene la mediana de supervivencia más alta (17,0 meses), mientras que el subtipo mesenquimal tiene el peor pronóstico (11,5 meses). El subtipo clásico tiene una mediana de supervivencia intermedia (14,7 meses). Luego de recurrencias, se conserva el mismo subtipo solamente en el 55% de casos,²¹ lo que resalta la plasticidad del GBM y el hecho de que estos subtipos representan más el estado del tumor que de su identidad. En cuanto a las alteraciones, el subtipo clásico se caracteriza por la pérdida parcial del cromosoma 10, la amplificación del cromosoma 7, y del gen de EGFR y la ausencia de mutaciones en TP53. El subtipo proneural se destaca por alteraciones del receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α) y presencia de mutaciones en el gen TP53. Por último, el subtipo mesenquimal tiene mutaciones o pérdida de NF1 y una mayor presencia de células del sistema inmune²⁰.

Subtipo	Mediana de supervivencia	Marcadores
Proneural	17,0 meses	Alteraciones en PDGFR α TP53 mutado
Mesenquimal	11,5 meses	Mutación o pérdida NF1 Mayor infiltrado inmune
Clásico	14,7 meses	Pérdida parcial cromosoma 10 Amplificación cromosoma 7 Alta amplificación gen EGFR TP53 sin mutar

Tabla 1. Subtipos Verhaak et al. (2010) actualizados de GBM con su mediana de supervivencia con tratamiento según Wang et al. 2017 y los marcadores que caracterizan cada subtipo.

Anteriormente, los GBM se clasificaban como primarios o secundarios en base a si era un tumor *de novo* (GBM primario) o si se había desarrollado a partir de un glioma preexistente (GBM secundario). Debido a que la mayoría de los tumores clasificados anteriormente como GBM secundarios corresponden en realidad a tumores con mutaciones en IDH1/2, actualmente los GBM ya no se clasifican como primarios y secundarios, reservando el término GBM exclusivamente para los gliomas de alto grado con las alteraciones genéticas y cromosómicas descritas previamente y con ausencia de mutaciones en IDH1/2⁸. Resulta interesante que se ha descrito la formación de un GBM (IDH no mutado) a partir de un glioma de menor grado (IDH-mutado)²³.

Tratamientos para el GBM

Estos tumores son altamente resistentes a los distintos tratamientos y evolucionan rápidamente hasta la muerte del paciente. Distintos agentes terapéuticos apenas han

mejorado la supervivencia actual, que es de 11 meses después del diagnóstico²⁴, con una tasa de supervivencia a los 5 años menor al 7%². A pesar de varias décadas de importantes avances en neurocirugía, radioterapia y ensayos clínicos de distintos agentes terapéuticos, apenas ha mejorado este panorama.

Hoy en día, independientemente del subtipo, el tratamiento estándar para GBM es el protocolo de Stupp²⁵ publicado en 2005 por Stupp et al. El protocolo Stupp consiste en la mayor resección quirúrgica posible del tumor, seguida por la administración conjunta de radioterapia (60 Gy en 30 fracciones) y quimioterapia basada en temozolamida (TMZ) (75 mg/m²/día por 6 semanas)²⁶. Este protocolo logra mejorar la mediana de supervivencia a 14,6 meses²⁵. Aunque este es el protocolo más comúnmente usado en primera línea, es decir como primer tratamiento ante el diagnóstico de GBM, también se han usado otras drogas quimioterapéuticas como bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que se une e inhibe la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y carmustina, un agente alquilante. Estos son los tratamientos más empleados luego del protocolo de Stupp²⁷.

Se ha observado que el tratamiento con bevacizumab aumenta la supervivencia libre de progresión (10,7 meses vs. 7,3 meses) pero no la supervivencia global²⁸. La aplicación de carmustina en cambio, sí ha generado aumento de supervivencia global en pacientes con GBM pero su uso es limitado por la toxicidad aguda que genera en hígado, medula ósea y en riñones ²⁹. Actualmente, se están desarrollando estrategias de administración local de carmustina para evitar la toxicidad sistémica²⁹. Sumados a estos tratamientos de uso habitual, hay varias drogas en etapa de estudio clínico y terapias alternativas a la quimioterapia convencional en etapa de prueba o desarrollo. Estos incluyen tratamientos de inmunoterapia^{30,31}, de terapia viral³², y de terapia con TTFields, que consiste en aplicar un campo eléctrico al tumor para interferir en la replicación celular³³⁻³⁵. Aún con todos estos avances, no se ha desarrollado una terapia que reemplace la estándar y la progresión de la enfermedad es prácticamente inevitable.

Cuando el tumor vuelve a aparecer luego del tratamiento, se le conoce como GBM recurrente. A diferencia del GBM original, no hay tratamiento estándar para el GBM recurrente, que tiene una mediana de supervivencia libre de progresión de entre 1,5 y 6 meses y una supervivencia global de entre 2 y 9 meses³⁶. La cirugía puede mejorar la supervivencia entre 5 a 11 meses, pero esta sólo es posible en menos del 50% de los casos. La radioterapia³⁷, la TMZ³⁸, el bevacizumab y la lomustina³⁹ se utilizan como tratamientos pero sin grandes beneficios. A tal punto llega la falta de una terapia estándar, que la recomendación de tratamiento de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) de EEUU para el GBM recurrente es integrarse en un estudio clínico⁴⁰. Hasta ahora no se ha encontrado tratamiento bajo el cual el tumor no desarrolle resistencia.

La recurrencia de GBM se adjudica al carácter difuso del mismo (que imposibilita la resección total), a la heterogeneidad genotípica y fenotípica (que dificulta tratamientos que afecten a toda la población celular) y a la presencia de células madre de GBM (CMG), una subpoblación de células con características de células madre que muestran mayor radio- y quimio-resistencia y que tienen la habilidad de iniciar el tumor recurrente⁴¹.

Células madre tumorales

Células madre normales

Las células madre son células no especializadas capaces de diferenciarse a distintos tejidos y autorrenovarse. Su función es generar células de distintos linajes, que se diferencian a células especializadas⁴². Tienen un rol clave en el desarrollo embrionario pero también siguen siendo relevantes en los tejidos adultos para su mantenimiento⁴².

Las células madre se definen por su estado indiferenciado, su capacidad de autorrenovación y su capacidad de diferenciarse a distintos tejidos. Dentro de las células madre

se encuentran las totipotentes, células capaces de diferenciarse a cualquier célula del organismo, como por ejemplo el cigoto; las células madre pluripotentes, que pueden formar células de cualquiera de las capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo, pero no de los tejidos extraembrionarios; y las células madre multipotentes, que tienen menor capacidad de diferenciación, y se limitan a ciertos linajes (generalmente del tejido al cual pertenecen), por ejemplo, las células madre hematopoyéticas que se pueden diferenciar a células linfoides y células mieloides^{42,43} A medida que se van diferenciando, las células madre dan lugar a progenitores tempranos (que conservan cierto grado de multipotencia), los cuales luego generan progenitores tardíos (habitualmente oligopotentes), que por último precursores de tipos celulares específicos (bipotentes y unipotentes).

En los tejidos de adultos se establece una cierta jerarquía donde las células diferenciadas son funcionales, pero no pueden renovarse y las células más indiferenciadas, es decir células madre, progenitores y precursores, tienen mayor capacidad de auto renovación y pueden generar células diferenciadas por división asimétrica cuando es necesario mantener la homeostasis celular en los tejidos⁴². En los tejidos adultos se encuentran células multipotentes, progenitores y precursores, mientras que las células madre totipotentes se encuentran en el cigoto y las primeras divisiones celulares, y las células madre pluripotentes en el embrión⁴⁴.

Como se describió previamente, dentro de las distintas células madre, algunas muestran mayor *stemness*, palabra derivada del inglés que indica el potencial de las células para auto renovarse y diferenciarse a distintos tipos celulares.

Historia de células madre tumorales

Actualmente se reconoce que en ciertos cánceres existe una jerarquía similar a la observada en tejidos de adulto, en donde existe una subpoblación de células con características de células madre que puede autorrenovarse y diferenciarse a distintos

tejidos⁴⁵. Mucho de los estudios con células madre empezaron en los años noventa pero los orígenes de estas teorías pueden encontrarse mucho más atrás en el tiempo⁴⁶.

Las teorías que asocian a las células madre con los tumores son casi tan viejas como las teorías de células madre en sí. Ya desde 1838, Johannes Müller propuso que los tumores se debían a un crecimiento anormal de células embrionarias basado en parecidos morfológicos entre los tejidos embrionarios y tumorales⁴⁶. Estas teorías se expandieron con Rudolf Virchow, quien postuló una correspondencia entre el desarrollo embrionario y el tumoral ya que ambos procesos se basan en la multiplicación celular y pueden mostrar diferenciación celular. Su sucesor, Julius Conheim, postuló en 1877 su teoría embrionaria del cáncer de que existen dejes de células embrionarias, que quedaron inutilizadas durante el desarrollo, y estas son responsables de generar tumores. Sus teorías se consideraban una alternativa válida a las teorías parasíticas o químicas del cáncer. Aun así, tuvieron aceptación limitada ya que intentos de inyectar células embrionarias en ratones no llevaban a la generación de tumores en la mayoría de casos.⁴⁶

Max Askanazy en el 1907 desarrolló una idea complementaria a las de Virchow y Conheim basada en su trabajo con teratomas de rata en donde se veían tumores capaces de generar tejidos de las tres capas germinales. Fue el primero en usar el término Stamzellen (célula madre) en conexión al origen tumoral⁴⁷.

Una idea espejada apareció con Theodor Boveri, quien observó que células con aberraciones cromosómicas perdían su control proliferativo y generaban tumores. El propuso la primera teoría cromosómica del cáncer, opuesta a la de Virchow y Conheim, en la que estas aberraciones llevaban a una dediferenciación celular, es decir un fenómeno donde células diferenciadas adquirirían un fenotipo embrionario. Es interesante ver que, aunque las teorías postulan un diferente origen del tumor, ambas resaltan que los tumores tienen características de células embrionarias. Por muchos años esta teoría tuvo mucha influencia y desplazó teorías embrionarias, pero en los 1950, trabajos en cáncer de testículo demostraron que ciertos tumores tenían como origen células indiferenciadas germinales y que estos tumores mostraban características de células indiferenciadas^{48,49}. Entre 1960 y

1990 se avanzó con el estudio de carcinomas embrionarios, especialmente carcinomas embrionarios humanos⁴⁹ y con el de leucemia aguda mieloide (AML)⁵⁰. En el estudio del AML, Bonnet y Dirk⁵⁰ generan el concepto de célula madre tumoral (CMT), aunque en su trabajo se refieren a ellas como células iniciadoras de SCID-leucemia por su capacidad de generar leucemia en ratones NOD/SCID, aún en cantidades muy bajas. Estas células mostraron una gran capacidad de auto renovación y potencial para diferenciarse a tejidos diversos^{46,50}. Desde entonces se ha podido establecer la presencia de CMT en tumores sólidos⁵¹, comenzando con cáncer de mama⁵² y rápidamente seguida por cáncer de cerebro⁵³ y colon⁵⁴. Estos estudios y la caracterización de CMT permitieron refinar el modelo de CMT, donde existe una jerarquía parecida a la encontrada en tejido normal adulto compuesta por, células madre, células progenitoras y células diferenciadas. A pesar de las similitudes entre la organización de un tejido adulto y un tumor, una diferencia clave es que en el modelo de CMT se han descrito eventos de desdiferenciación, es decir, eventos en los que las células más diferenciadas dan lugar a células menos diferenciadas⁵⁵. Por su parte, al igual que en tejidos normales, el microambiente juega un rol clave en mantener las propiedades de células madre tumorales y en definir como se diferencian estas células.

Características de células madre tumorales

En base a resultados que mostraron que las CMT existen en varios tumores y que exhiben una elevada tumorigenicidad, las CMT se postularon como posibles blancos terapéuticos y su estudio fue volviéndose cada vez más relevante. Las características que comparten las CMT con células madre normales son las que las hacen tan peligrosas: su capacidad elevada para la auto renovación (por lo tanto también su capacidad de tumorigénesis), su plasticidad fenotípica (mediante la cual otorga heterogeneidad al tumor), su resistencia a radio- y quimioterapia, y su habilidad inmunosupresora⁴⁵. Aunque el modelo de CMT no se aplica igualmente a todos los tipos de cáncer, sí ha servido como modelo útil en el marco del GBM, en donde la subpoblación de células madre de glioma (CMG) ha sido un foco de

estudio durante los últimos veinte años. En la Figura 4 se puede ver como las teorías que postulan a las CMT como blanco de tratamientos postulan que tratamientos clásicos que tienen como blanco células no CMT llevan a la recurrencia del tumor, ya que las CMT sobrevivientes pueden recapitular el tumor. En cambio, tratamientos que maten a las CMT, por más que no afecten al resto de las células tumorales, podrían llevar a la degeneración del tumor.

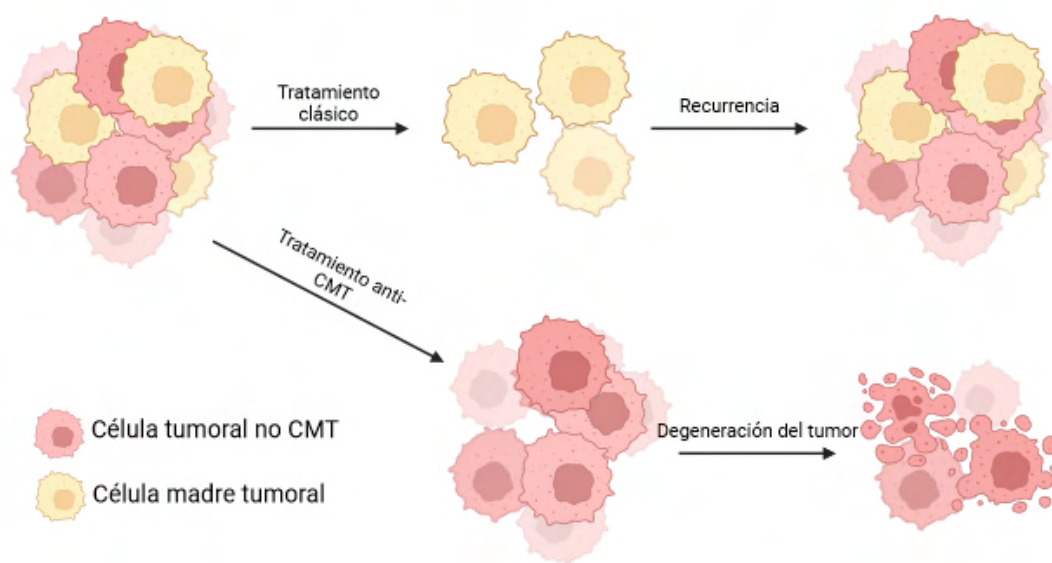


Figura 4. Hipótesis de CMT y sus implicancias en tratamientos. Tratamientos clásicos que eliminan a células diferenciadas llevan a la recurrencia del tumor mientras que el tratamiento hipotético que tenga como blanco a las CMT llevaría a la degeneración del tumor. Figura generada en BioRender.

Las CMG son muy heterogéneas a nivel inter-tumoral, y esto ha dificultado encontrar un marcador único binario para definir las. El marcador más común, CD133, es altamente específico como marcador de CMT, pero su expresión debe evaluarse críticamente ya que existen CMG negativas para este marcador. Otros marcadores como CD15, INTEGRINA α 6, ALDH, NESTINA, SOX2, OLIG2 y NANOG permiten enriquecer poblaciones tumorales de CMG, pero ninguno de ellos sirve individualmente como marcador universal de CMG⁵⁶.

Capacidad tumorigénica de CMT

La capacidad tumorigénica de las CMT es la primera característica que se estudió en las CMT ya que justamente se descubrieron gracias a este potencial. Bonnet y Dirk, en su trabajo con AML⁵⁰, revelaron que con sólo 100 CMT se podía generar la enfermedad en un ratón sano, mientras que con miles de células tumorales, excluyendo las CMT, esto no era posible. Esta alta tumorigenicidad las hace responsables de nuevos focos de tumor en el caso de tumores sólidos, sean en el marco de metástasis, en otro sitio dentro del mismo órgano o en el mismo sitio luego de la resección.

Las subpoblaciones de CMT no se han identificado en todos los tipos tumorales, pero en 2004, Singh *et al.* comprobaron que en GBM existe una subpoblación de CMT CD133⁺ que, al inyectarse en ratones inmunosuprimidos, podían recapitular el tumor original, manteniendo su heterogeneidad. Es notable que con solamente 100 células CD133⁺ fue posible recapitular el tumor original, mientras que con 10.000 células CD133⁻ esto no fue posible⁵³. El año anterior, Singh *et al.* habían observado que esta misma población CD133⁺ podía diferenciarse a distintos tejidos observados en el tumor⁵⁷. Estas CMT se conocen como CMG.

Plasticidad de CMT

Como se mencionó anteriormente, más allá de la tumorigenicidad, la plasticidad es otra característica clave de las CMT que además es compartida con las células madre normales. El término “ruido” aplicado a expresión génica comenzó a usarse para describir la variabilidad en expresión génica de células genéticamente homogéneas en un entorno homogéneo. Este concepto es clave en la caracterización de las células madre, que naturalmente muestran variabilidad en la expresión de muchos genes incluyendo algunos

genes claves asociados al *stemness* como NANOG⁵⁸. La expresión de NANOG varía no solamente entre células supuestamente homogéneas, sino que también en una misma célula a distintos tiempos. Esta heterogeneidad se considera una característica esencial de las células madre que permite que distintas células de una población homogénea pueda diferenciarse a distintos tejidos o mantener su *stemness* bajo las mismas condiciones⁵⁹. Este concepto también aplica a CMT, donde se ve esta misma heterogeneidad, muchas veces aún más marcada. Se ha observado que tumores con mayor índice de *stemness* muestran una mayor heterogeneidad intratumoral⁶⁰.

En GBM, un tipo de cáncer altamente heterogéneo, se ha encontrado diversidad genotípica y diversidad fenotípica. Parte de esta diversidad genotípica se explica por el modelo clásico de evolución clonal. Este modelo implica que a medida que las células del tumor se dividen y proliferan, acumulan mutaciones que se heredan y se seleccionan. Por lo tanto, en un momento dado, la población del tumoral se compone de varias subpoblaciones clonales con mutaciones particulares. En cuanto a la diversidad fenotípica, parte es el reflejo de la variabilidad genotípica, pero también se considera que las CMG son responsables por la alta diversidad fenotípica, ya que de ellas se originan distintos tipos celulares⁵⁶. Esta población de células, en sí heterogéneas, tiene la capacidad de diferenciarse en respuesta al microambiente a distintos destinos. En el 2019 Neftel *et al.* realizaron estudios a nivel de células individuales (*single-cell*) en varias muestras de GBM y lograron identificar distintas poblaciones con distintos perfiles transcriptómicos (perfil de progenitor neuronal, de progenitor oligodendroglial, astrogial y mesenquimal) sumado a un gradiente de diferente grado de *stemness*. Mediante este estudio se encontró que distintos tumores tienen estas mismas poblaciones pero en distintas proporciones⁶¹. Estas subpoblaciones parecen ser estados con distintos grados de diferenciación que pueden cambiar en respuesta al microambiente.

Más allá de los estados caracterizados por Neftel *et al.* también se ha logrado observar que las CMG pueden diferenciarse a células de tejidos no gliales o neuronales. Se han observado casos de transdiferenciación de CMG a células del endotelio⁶² y a pericitos⁶³. Modelos actuales, como el que se presenta en la Figura 5, postulan que los gliomas tienen

una población de CMG dinámica que es capaz de responder a distintos inductores o “atractores” presentes en el microambiente y, de este modo, pueden diferenciarse a distintos estados. Estos atractores pueden ser, por ejemplo, factores como BMP4 o NOGGIN, condiciones tales como la hipoxia, o nichos como el nicho perivascular, pero en cualquier caso, los atractores se definen por su habilidad de influenciar la diferenciación celular en cierta dirección^{56,64}. Aun así, retomando el concepto de ruido mencionado anteriormente, incluso con los mismos atractores, células individuales de CMG pueden responder en distintas formas. Todo esto conlleva a una alta heterogeneidad intra-tumoral que se aprecia espacial y temporalmente en el tumor.

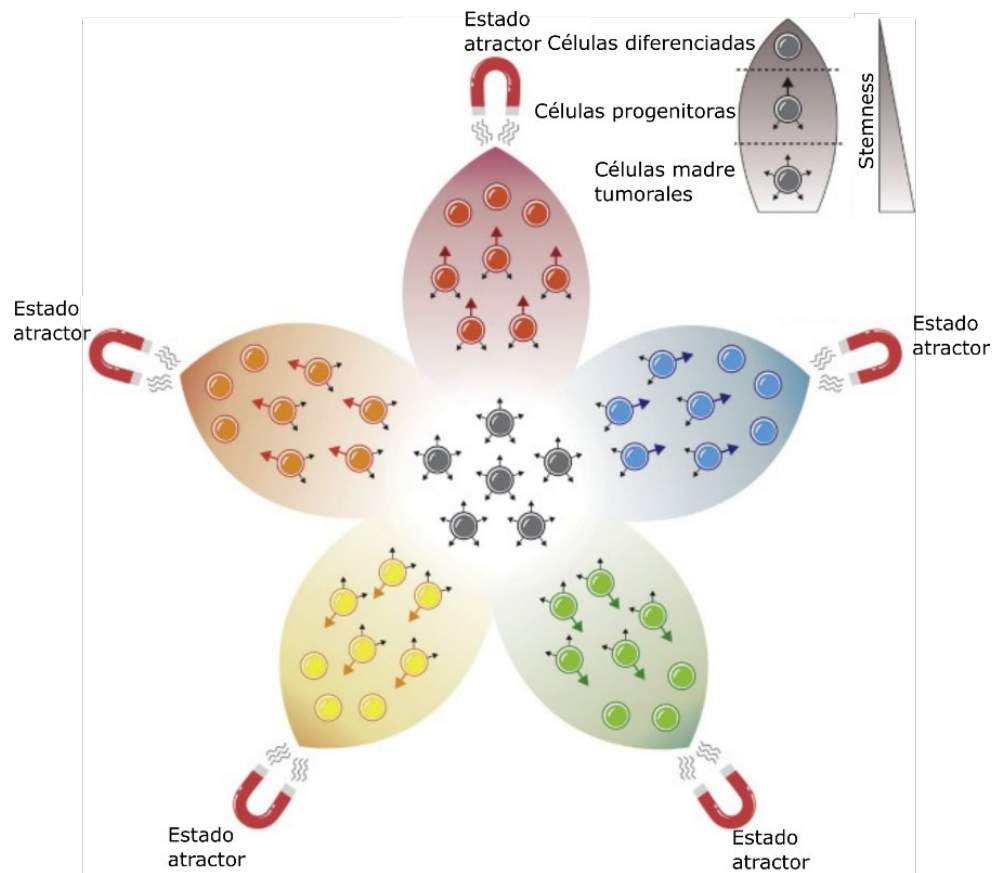


Figura 5. Concepto de atractores que influyen sobre la diferenciación de células madre tumorales a diferentes linajes. Figura traducida y adaptada de Prager et al.⁵⁶

Resistencia de CMT

Se ha encontrado que las CMT, al igual que las células madre normales, tienen mayor resistencia a apoptosis. Una de las razones consiste en que las CMT, incluyendo las CMG, expresan mayores niveles del factor anti-apoptótico survivina, que las células más diferenciadas⁶⁵. Esta subpoblación es, por lo tanto, más resistente a tratamientos que inducen apoptosis como la radio- y quimioterapia^{45,66}. También se encontró que CMG expresan bajos niveles de caspasa-8 debido a la hipermetilación de su promotor, muestran niveles de expresión elevados de Bcl-2 y Bcl-XL (factores anti-apoptóticos), y son más resistentes a apoptosis inducida por FAS, en comparación con células tumorales no CMG⁶⁷.

Más allá de que muestran programas apoptóticos alterados, las CMT también muestran más resistencia a las terapias gracias a la alta expresión de bombas de eflujo que permiten expulsar quimioterapéuticos, una elevada actividad de reparación de ADN y un estado de quiescencia en el que pueden entrar, que las protege tanto de terapias que tienen como blanco células proliferativas, como del sistema inmune⁶⁸.

Por último, cabe mencionar que los GBM se tratan principalmente con radioterapia y TMZ, dos terapias que dañan al ADN. Las CMG muestran mayor resistencia a estos tratamientos en parte gracias a que poseen un sistema eficiente de reparación de ADN. Por ejemplo, en tumores sin metilación del promotor de la metilguanina-ADN metil-transferasa (MGMT), un gen que codifica una enzima reparadora del ADN, las CMG muestran expresión más alta de este gen comparado con células tumorales no CMG⁶⁹. Otros mecanismos moleculares que también parecen estar involucrados en esta resistencia son Ckh1/Ckh2⁷⁰, NOTCH⁷¹, PARP⁷² y EZH2⁷³.

Inmunosupresión de CMT

Se ha encontrado que las CMT también pueden estar involucradas en generar inmunosupresión, protegiendo al tumor del sistema inmune. Se ha observado una correlación negativa entre cantidad de infiltrado inmune, es decir la cantidad de células del sistema inmune en el tumor, y el *stemness* del tumor⁶⁰. En los GBM no se han desarrollado inmunoterapias exitosas como en los casos de cáncer de pulmón y melanoma. Las CMG pueden ser, en parte, responsables de este fenómeno por crear el microambiente inmunosupresor que se observa en estos tumores. Se ha observado que las CMG muestran una expresión reducida del receptor tipo Toll 4 (TLR4) y en parte gracias a esto evaden mecanismos del sistema inmune⁷⁴. También, pueden suprimir la acción de células T citotóxicas mediante la producción de vesículas extracelulares con PD-L1⁷⁵. En forma más indirecta, reclutan macrófagos asociados a tumores del tipo inmunosupresor M2⁷⁶, y células supresoras de origen mieloide⁷⁷. Estas células generan factores que contribuyen al microambiente inmunosupresor.

Modelos de células madre tumorales

Todos estos resultados, que muestran la tumorigenicidad de las CMT, su plasticidad y su resistencia, demuestran lo importante que es poner a las CMG como blanco de las terapias y como foco del estudio de la biología tumoral. El primer modelo *in vitro* basado en CMG fue desarrollado por Singh *et al.* en 2003⁵⁷, quienes lograron aislar y caracterizar una subpoblación de CMG de gliomas humanos. Desde entonces se han publicado protocolos⁷⁸ que permiten establecer estas células *in vitro*, desarrollando líneas celulares derivadas de pacientes enriquecidas en CMT.

En el modelo utilizado en esta tesis se utilizó el protocolo descrito por Pollard *et al.*⁷⁸ en 2009, en el cual se establecen líneas celulares enriquecidas en CMG a partir de biopsias. Este protocolo contempla el uso de laminina como sustrato para la adherencia de los cultivos. Usando este protocolo (Figura 6) en nuestro laboratorio se lograron derivar varias

líneas de CMG de pacientes que luego fueron caracterizadas⁷⁹. En esta tesis se utiliza este modelo ya que permite trabajar con una variedad de líneas enriquecidas en CMG, y, por lo tanto, reflejar la heterogeneidad inter-tumoral de los gliomas de alto grado. Se modificó el protocolo original creciendo las líneas celulares de CMG sobre placas tratadas con Geltrex (una mezcla de proteínas que incluye laminina, colágeno, enactina y proteoglicanos heparin sulfato)⁸⁰, protocolo ya utilizado por otros investigadores⁸¹.

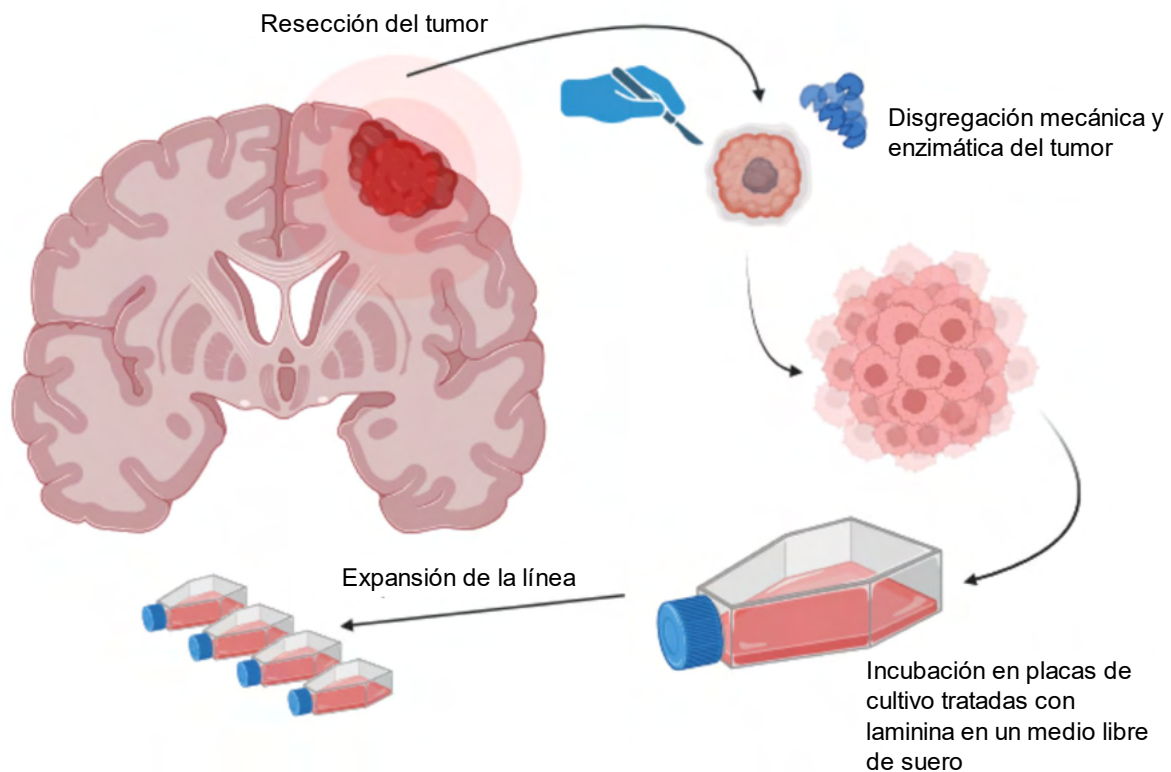


Figura 6. Modelo utilizado para derivación de líneas de CMG a partir de biopsias de paciente. Modelo publicado en Videla-Richardson et al.⁷⁹ Figura generada con BioRender.

Migración e invasión en glioblastoma

Carácter difuso del glioblastoma

Uno de los rasgos distintivos del GBM es su carácter difuso, el tumor no tiene límites claros y se encuentran células tumorales lejos de la principal masa tumoral. Este carácter difuso es una de las características más peligrosas de este tumor y, en última instancia, es la causa de muerte en la mayoría de los pacientes. Su naturaleza difusa hace que la resección quirúrgica total sea una imposibilidad práctica, dando lugar a recidivas a menudo adyacentes a los márgenes de resección, aunque también pueden aparecer como lesiones satélite distantes⁸².

A pesar de esta capacidad infiltrante, es decir de invadir el tejido adyacente, y a diferencia de otros tumores malignos, el GBM rara vez hace metástasis. Las metástasis extracraneales solamente se ven en 0.4-0.5% de pacientes con GBM^{83,84}. Hay varias explicaciones posibles por esta baja tasa de metástasis. Se puede deber, por un lado, al avance rápido de la enfermedad que no da tiempo a la generación de focos extracraneales. Validando esta hipótesis está el hecho que los pacientes con focos extracraneales son aquellos que muestran una sobrevida mediana mayor a los pacientes sin focos extracraneales⁶⁰.

Por otro lado, la falta de metástasis puede deberse a que las células tumorales necesiten el microambiente específico del cerebro y no pueden adaptarse fácilmente a otros tejidos en el cuerpo, por ejemplo, por tener dificultades para implantarse en matrices extracelulares con distinta composición o en sitios con otros factores de crecimiento y con interacciones con otros tipos celulares. Otra explicación posible para la ausencia de metástasis a distancia en GBM es que la forma de migrar de las células tumorales no favorece la migración a otros órganos. Se ha observado que las células de GBM no migran por dentro de los vasos sanguíneos y linfáticos como otros tumores,^{85,86} sino que viajan principalmente dentro del parénquima del cerebro, a lo largo de las zonas perivasculares y por los tractos de materia blanca⁸⁷.

A pesar de la falta de metástasis, el tumor es agresivo y su diseminación por el cerebro es suficiente para causar la muerte del paciente, generalmente dentro de los dos años desde su diagnóstico². Hasta ahora no se han usado terapias que tengan como blanco la migración e invasión de las células de GBM, sino que, por el contrario, algunos tratamientos aumentan sus capacidades infiltrantes⁸⁸.

Mecanismos de migración e invasión

Para comprender el movimiento de las células tumorales de GBM se necesita entender los distintos pasos y mecanismos involucrados. Estos comprenden básicamente dos procesos diferentes: la migración y la invasión. La migración hace referencia a la capacidad para moverse por un tejido, mientras que la invasión, hace referencia a la capacidad de atravesar barreras físicas como una membrana basal. Aun así, es importante tener presente que en el contexto fisiológico es común usar la palabra invasión para cualquier movimiento celular dentro de un tejido⁸⁹. En el contexto *in vitro*, en cambio, la migración se refiere habitualmente a la habilidad de las células para moverse sobre un sustrato en dos dimensiones. La invasión, por su parte, se refiere a la habilidad de las células para moverse dentro de una matriz proteica extracelular, generalmente degradándola y modificándola. Ambos mecanismos son empleados en simultáneo por las células infiltrantes, pero se pueden estudiar y analizar por separado. Estos mecanismos a su vez involucran diferentes procesos, por ejemplo, la adherencia y el despegado de las células, necesarios para la migración; y la degradación y el remodelación de la matriz extracelular (MEC), necesarios para la invasión⁹⁰.

Existen distintos tipos de migración (Figura 7). Los patrones de migración más frecuentes son la migración ameboide y la migración mesenquimal⁹¹. La migración ameboide, empleada por ejemplo por leucocitos, implica la rápida extensión y retracción de protrusiones de membrana como lamelipodia, filopodia y “*blebs*” y se observa una

morfología celular más redondeada. Hay interacción débil con el sustrato y puede llegar a una velocidad de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ ^{92,93}. La migración mesenquimal, presente en fibroblastos y varios tipos de células madre, es una migración más lenta que la ameboide (menos de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$) con una fuerte dependencia de la adhesión a la MEC. En esta migración la célula tiene una polaridad menos definida⁹⁴. Las células también pueden migrar en forma colectiva. En este tipo de migración las células dependen, no solamente de las interacciones con la MEC, sino también con otras células. Este fenómeno se ha observado, por ejemplo, en heridas en células epiteliales. Se caracteriza por la formación de una monocapa, en la cual se observan células líder en su extremo anterior que forman lamelipodia y arrastran al resto de la monocapa⁹⁵. También existe la migración colectiva de células mesenquimales, donde la interacción célula-célula también tiene un rol clave. Se ha observado que esta migración está favorecida por N-cadherina mientras que la migración individual mesenquimal depende de E-cadherina⁹⁶. Estos métodos de migración no son excluyentes y hay evidencia de que las células, especialmente las tumorales, pueden alternar entre ellas en respuesta a señales del microambiente^{97,98}.

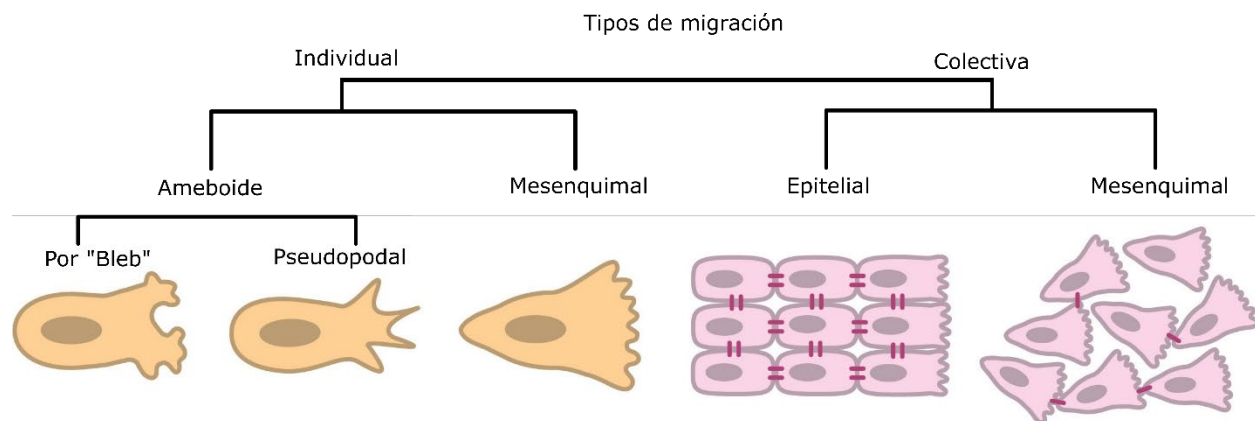


Figura 7. Tipos de migración encontrados en células de GBM. Figura traducida y adaptada de imagen de Cytosmart.com⁹⁹.

El mecanismo más descrito en células de GBM es la migración mesenquimal¹⁰⁰, aunque también se ha observado migración ameboide¹⁰¹ y migración colectiva¹⁰². Es posible que esto sea una consecuencia de la heterogeneidad inter-tumoral, es decir que distintos

tumores utilicen distintos mecanismos. Sin embargo, parece más probable que esto sea un reflejo de la heterogeneidad intra-tumoral y que todos los GBM puedan migrar por más de un mecanismo, dependiendo del microambiente y del estado celular en un momento dado.

La neurogénesis, es decir, la formación de nuevas neuronas a partir de neuro-progenitores o células madre neurales, ocurre durante la embriogénesis pero también en el cerebro adulto¹⁰³. En el GBM, se considera que las células tumorales emplean programas conservados de neurogénesis para migrar a través del cerebro¹⁰⁴. Al igual que las células gliales y progenitores neurales, las células de GBM migran usando como sustratos los tractos de materia blanca y el lado externo de vasos sanguíneos. Además, la miosina II, que tiene un rol clave en la translocación de progenitores neurales durante el desarrollo del cerebro, también se encuentra sobre expresada en células de glioma. Varios quimio-atractivos, como pleiotrofina (PTN), presentan efectos similares sobre progenitores neurales y células de glioma¹⁰⁴. En base a estas observaciones se han desarrollado teorías que establecen que la migración de GBM está asociada a su grado de *stemness* o de indiferenciación.

Volovetz y colaboradores han encontrado que en las CMG se observa entre 2 y 5 veces más migración *in vitro* que en las células de GBM que no son CMG. En este mismo estudio se observaron diferentes mecanismos de migración, individuales y colectivos¹⁰². Por otra parte, en CMG también se encuentra incrementada la expresión de distintos miembros de las familias proteicas involucradas en la invasión tales como metaloproteasas de matriz (MMP), desintegrinas y metaloproteasas (ADAM) y ADAM con motivo trombospondina (ADAMT) respecto a otras células de GBM, indicando una mayor capacidad de las CMG para invadir^{105,106}. En este sentido, se ha encontrado que las células de glioma presentes en los bordes del tumor expresan mayores niveles de marcadores de células madre de glioma: L1CAM (*L1 Cell Adhesion Molecule*), nucleostemina y nestina¹⁰⁶. Por lo tanto, esta evidencia en conjunto indica que las CMG están dotadas de una mayor capacidad migratoria e invasiva que el resto de las células tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Patrones de invasión en GBM

A través de análisis histológicos y mediante imágenes moleculares se puede observar que las células de GBM migran por el parénquima cerebral, por espacios perivasculares y por tractos de materia blanca^{87,107}. El parénquima cerebral se refiere al tejido funcional del cerebro compuesto principalmente por neuronas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, microglía, etc.). El espacio perivascular se refiere a una zona adyacente a capilares, vénulas y arteriolas en el cerebro, que se encuentra envuelto por pies de astrocitos. Los tractos de materia blanca son fibras de axones que conectan distintas partes del cerebro.

La invasión dentro del parénquima cerebral por parte de las células tumorales se puede dar en forma colectiva o en forma individual. La forma colectiva es más lenta pero más direccionada mientras que la invasión de células individuales es menos direccionada pero más rápida¹⁰⁸. En la migración, resulta clave no solo la interacción con la MEC, sino también la interacción con otras células, particularmente con los astrocitos¹⁰⁹. Se ha encontrado que las interacciones hetero-celulares (células de GBM-astrocitos) favorecen la migración, mientras que interacciones homo-celulares (entre células de GBM) favorecen la adhesión y conllevan una menor migración¹⁰⁹. Más allá de las interacciones clásicas entre células, también se ha encontrado que las células de gliomas, incluyendo las de GBM, pueden conectarse a astrocitos mediante microtubos, generando una red hetero-celular que confiere protección a las células de glioma y favorece su capacidad invasiva¹¹⁰. También se han encontrado interacciones de células de glioma con microglía, las cuales también favorecen la invasión mediante la secreción del factor de crecimiento epidérmico (EGF)¹¹¹. Como se mencionó previamente, la migración por zonas perivasculares se puede observar mediante imágenes de GBM de pacientes y por histología¹¹². En estudios *in vitro* se ha visto que células vasculares, particularmente pericitos, atraen células de GBM¹¹³. Estudios *in vivo* en ratón indican que las células de GBM se asocian más a capilares (<7µm de diámetro) que a arteriolas o vénulas, y que cuando lo hacen, es con las de menor tamaño¹¹⁴.

Llamativamente, se encontró que la mayoría de las asociaciones entre vasos y células de GBM ocurren en el límite entre el tumor y el tejido no tumoral¹¹⁴. Las células de GBM pueden asociarse a los vasos sanguíneos en forma individual o en forma colectiva. En 2020 Seana y Jane¹¹² encontraron que la invasión colectiva por la zona perivascular se asocia con tumores más astrocíticos, mientras que la invasión de células individuales se asocia con tumores con fenotipo más oligodendrocítico. Este mismo estudio encontró que los factores asociados a esta interacción incluyen bradicinina, *CXCR4* (*C-X-C motif chemokine receptor 4*), angiopoietina-2, interleuquina-8, EGFRvIII (Epidermal Growth Factor Receptor III) y *CDC42* (*Cell Division Cycle 42*)¹¹².

Las zonas de materia blanca en el cerebro son zonas de axones mielinizados que se encuentran frecuentemente en un arreglo alineado de fibras nerviosas. La materia blanca constituye cerca de un 50 % del cerebro humano y puede conectar distintas partes del cerebro incluyendo los hemisferios. Notablemente, en 2021 Buyanova y Arsalidou¹¹⁵ encontraron que los GBM frecuentemente usan vías de materia blanca para migrar y hasta cruzar de hemisferio¹¹⁵. Wang et al. han encontrado que las CMG (CD133⁺) muestran tropismo por fibras nerviosas en forma dependiente de *NOTCH1* (*Notch receptor1*) y *SOX2* (*SRY-Box Transcription Factor 2*)¹¹⁶.

Composición de la matriz extracelular del parénquima cerebral

La migración y la invasión son procesos que dependen fuertemente de las interacciones de las células con la MEC. Por lo tanto, las características de ésta pueden tener una influencia muy importante sobre dichos procesos y sus mecanismos. Consecuentemente, es de suma importancia tener en cuenta la composición del cerebro en el análisis de la migración y la invasión. La composición afecta las interacciones moleculares que tiene una célula con su entorno, y afecta a las características físicas, incluyendo la rigidez. La rigidez del tejido

cerebral está muy por debajo de la de otros tejidos, con excepción del tejido adiposo, contando con una rigidez por debajo de 1 kPa¹¹⁷.

La MEC presente en el parénquima cerebral tiene una composición única. Está compuesta, principalmente, por proteoglicanos y las moléculas con los que estos interactúan: ácido hialurónico (HA), tenascinas y proteínas específicas del cerebro¹¹⁸. En la Figura 8 pueden observarse los distintos componentes de la MEC del cerebro.

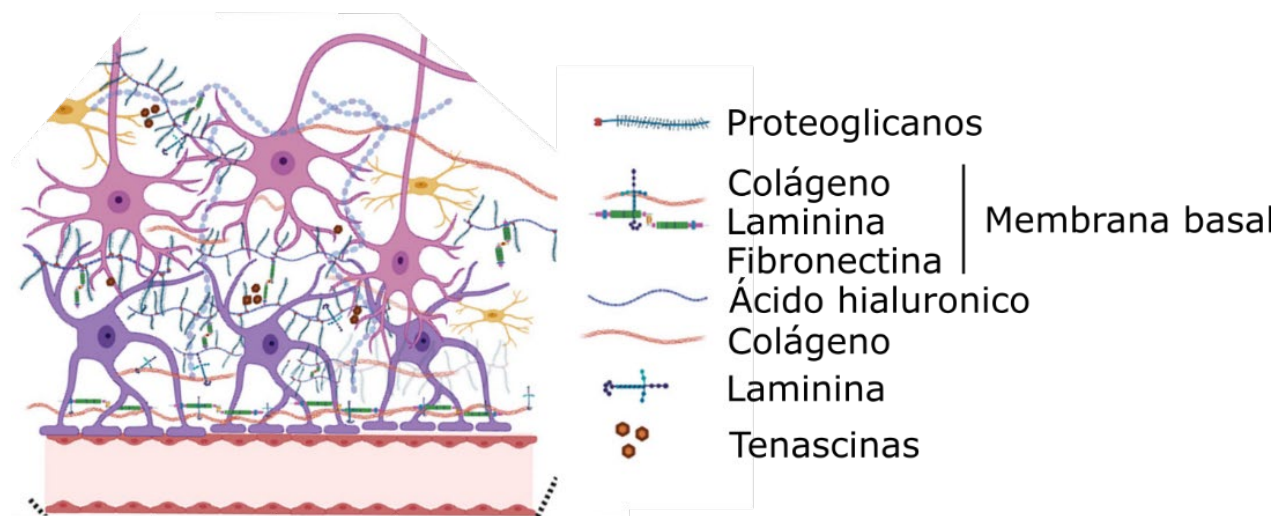


Figura 8. Esquema de la MEC del tejido cerebral sano presente en el parénquima y adyacente a vasos sanguíneos. Figura adaptada y traducida de Aguilera-Márquez et al.¹¹⁹.

El compuesto considerado más importante de la MEC del cerebro es el HA. El HA es una molécula con carga negativa de relativa abundancia en el tejido cerebral. Este compuesto corresponde a un glicosaminoglicano (GAG) no sulfatado, es decir un mucopolisacárido compuesto de repeticiones de disacáridos, con hasta decenas de miles de repeticiones. Comúnmente se encuentra libre en la MEC, pero también se puede encontrar anclado a las membranas celulares. El HA tienen diversas funciones, pero es, principalmente, un polisacárido estructural que ayuda a formar mallas hidrofílicas en el espacio extracelular, generando una red elástica y firme¹²⁰. Esto se debe a su estructura física y química y a sus interacciones con otras proteínas estructurales como proteoglicanos y tenascinas¹²⁰.

Sumado a su rol estructural, también se ha observado que tiene funciones de señalización¹²¹. Se ha observado que al interactuar con CD44, uno de sus receptores, promueve diferentes procesos, tales como el tráfico celular, la migración y la activación de linfocitos¹²⁰. Otro receptor importante del HA es RHAMM (receptor de movilidad mediada por HA), una proteína involucrada en la inflamación, la fibrosis, el control del ciclo celular y la movilidad celular¹²². Tanto CD44 como RHAMM están sobre expresadas en GBM¹²³.

En cuanto al efecto del HA sobre la migración no hay consenso y hay distintas observaciones que resultan discordantes. En 2018, Chen *et al.* analizaron el efecto de agregar HA de distintos tamaños (de 10 kDa a 500 kDa) a hidrogeles sobre la capacidad de invasión celular *in vitro*. Observaron que al agregar HA de mayor tamaño había una menor invasión¹²⁴. Hayen *et al.*, en cambio, observaron que incorporar HA durante la polimerización de fibrina generaba una matriz con poros de mayor diámetro que en matrices polimerizadas sin HA, y que, al analizar la migración celular dentro de estas matrices, se observaba mayor migración en las que el HA había sido incorporado. Encontró también que si se agregaba HA después de la polimerización no había efecto sobre la migración¹²⁵. Otro estudio, de Park *et al.*, demostró que el HA induce la invasión celular mediante la regulación de MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase 9*), una proteasa, y osteopontina, una proteína involucrada en múltiples vías de señalización¹²⁶. Esta variabilidad en los resultados indica que el rol del HA en la migración e invasión celular es complejo y que, probablemente, dependa de condiciones del entorno, del tamaño de la molécula de HA y de otras moléculas con las que interactúa¹²⁰.

Como se mencionó anteriormente, otras moléculas de gran abundancia y relevancia que conforman la MEC del cerebro son los proteoglicanos. Estas son proteínas con un componente GAG sulfatado unido covalentemente al dominio proteico. En el cerebro, los proteoglicanos más comunes son los de tipo condroitín sulfato proteoglicano (CSPG) y los del tipo heparansulfato proteoglicano (HSPG). Ambos pueden encontrarse secretados o anclados a la membrana celular¹²⁷.

Los CSPG de mayor expresión en el cerebro son el agrecano, el versicano, el neurocano y el brevicano, y son comúnmente conocidos como hialectanos por su capacidad para unirse al HA¹²⁸. Los CSPG, además de unirse al HA, también pueden interaccionar con tenascinas, sulfoglucuronil glicolípidos y entre ellos mismos. Por su parte, los HSPG de mayor expresión en el cerebro, son el sindecano, el glipicano, el agrin y el perlecano¹²⁷.

Los proteoglicanos se han asociado con varios procesos, incluyendo la plasticidad celular, la regeneración neuronal, la proliferación y la migración celular. En GBM, se ha observado que algunos proteoglicanos se encuentran sobre expresados respecto a los niveles presentes en tejido cerebral normal¹²⁹. Mediante estudios realizados por Logun et al., se ha observado que la incorporación de CSPG en la MEC *in vitro* aumenta la expresión de proteínas de adhesión focales tal como FAK y vinculina por parte de células de GBM, y genera un aumento en la invasión de CMG¹²⁹. Otro resultado interesante fue publicado por Onken *et al.* sobre el rol del CSPG, versicano, en la migración. Observaron que la inhibición de este CSPG con lleva una reducción importante de la proliferación y la migración¹³⁰. En 2016 Lugon *et al.* encontraron que es concretamente la sulfatación de los proteoglicanos la que genera el efecto sobre la migración e invasión, ya que al remover la sulfatación, la relevancia de los CSPG en estos procesos disminuye¹³¹.

Contradictoriamente, hay estudios que muestran que concentraciones muy altas de CSPG llevan a una inhibición de la migración e invasión¹³². El efecto inhibitorio de CSPG parece darse mediante la interacción con el receptor LAR (*Leukocyte common antigen-related*), cuya expresión correlaciona con la expresión de CSPG. Cuando CSPG y LAR interactúan en concentraciones altas, las células exhiben una mayor adhesión y una menor migración¹³³. Entonces, las posibles contradicciones reportadas en la literatura pueden deberse a que el efecto de CSGP en la capacidad migratoria depende de la concentración, del modelo celular estudiado, y posiblemente a las diferencias en los roles de los distintos integrantes de la familia de CSPG. A pesar de no haber consenso sobre el rol/efecto de CSPG, la evidencia indica que los CSPG afectan y modulan, en distintas formas, la migración y la invasión de las células de GBM.

En cuanto a los HSPG en GBM, tanto el sindecano como el glipicano se encuentran sobre expresados en el microambiente tumoral. Se ha planteado la hipótesis que el sindecano induce la invasión tumoral a través de la inducción de trombospondina-1¹³⁴.

Continuando con el análisis de los componentes de la MEC del cerebro, las tenascinas son glicoproteínas oligoméricas que forman complejos multiméricos. Están compuestas por varios dominios: un dominio de tipo fibronectina-3, dominios de repetición de EGF y un dominio fibrinógeno¹³². En vertebrados existen cuatro tenascinas, pero en el cerebro humano se encuentran cantidades altas de tenascina C (TNC) y tenascina R (TNR)¹³⁵. Estas proteínas pueden entrelazar los proteoglicanos (CSPG y HSPG), facilitando así las uniones entre ellos. Las tenascinas son producidas normalmente por células de la glía y por neuronas¹²¹. En GBM, TNC se encuentra sobre expresada y se ha observado en estudios *in vitro* que TNC induce la migración^{136,137}. También, en un estudio *in vivo* en el que se utilizó un modelo murino de GBM, se halló que tumores con TNC silenciada eran menos difusos respecto de los tumores control¹³⁸. Por otra parte, en el cerebro normal se sabe que la TNR influye sobre la diferenciación, la adhesión y la migración de varios tipos celulares incluyendo neuronas, microglía, y oligodendrocitos. Sin embargo, a la fecha no existen muchos trabajos publicados sobre el rol de esta proteína en GBM¹³⁹. Aun así, la evidencia indica que la expresión de TNR es mayor en gliomas menos invasivos y que TNR correlaciona positivamente con un mejor pronóstico, indicando un rol diferente del de la TNC¹⁴⁰. Por último, las HAPLN (denominadas proteínas de enlace a HA y proteoglicanos) son proteínas de unión al HA que ayudan a generar la red de moléculas de la MEC del cerebro y estabilizan la unión de HA a proteoglicanos¹⁴¹. La expresión de las HAPLN se encuentra disminuida en gliomas pero, notablemente, el aumento de su expresión conlleva un incremento de la capacidad migratoria¹⁴². Esto sugiere que, a pesar de tener un efecto pro-migratorio, no son responsables de la migración en GBM ya que su expresión es baja.

Composición de la MEC de las vías de materia blanca

La composición de la MEC presente en los tractos de materia blanca se asemeja a la del parénquima de la materia gris: HA, CSPG y HSPG con tenascinas y proteínas de enlace (*link proteins*)¹⁴³. La particularidad que la diferencia es la presencia de alta cantidad de axones mielinizados. La mielina es una capa aislante que envuelve ciertos axones, es generada por oligodendrocitos, y está compuesta por glicolípidos y proteínas¹⁴⁴. Mediante estudios *in vitro*, se ha observado que las células de glioma pueden usar la mielina como sustrato para la migración¹⁴³.

Composición de la MEC de la zona perivascular

Como se mencionó anteriormente, las células de GBM frecuentemente migran por la zona perivascular. Esta zona, también conocida como espacio de Vichrow-Robin, corresponde a un espacio intersticial que rodea ciertos vasos sanguíneos en el cerebro. Está formado por la membrana basal, producida por pies de astrocitos que envuelven vasos (que lo separa del resto del cerebro), y por las capas de células endoteliales y pericitos (que lo separan del lumen del vaso sanguíneo). La membrana basal presente en el cerebro posee una composición característica. Tiene un grosor de entre 50-100 nm y recubre el exterior de los vasos sanguíneos. Está compuesta por perlecano, agrin, lamininas, colágenos, nidógenos, y fibronectina¹⁴⁵.

El perlecano y el agrin son HSPGs con rol estructural y de señalización en la membrana basal¹⁴⁵. Ambas están involucradas con la acumulación de factores de crecimiento como FGF (*fibroblast growth factor*), GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) y VEGF (*vascular endothelial growth factor*). También se unen a lipoproteínas de membranas celulares¹⁴⁵. La expresión de perlecano en la MEC está asociada a un peor pronóstico en GBM, aunque aún no se conoce mucho sobre su rol en el desarrollo y el avance de esta enfermedad¹⁴⁶. Agrin es normalmente expresado por astrocitos y células endoteliales, pero se ha reportado que su expresión se encuentra muy disminuida en los espacios

perivasculares de GBM^{137,147}. Esta disminución se atribuye a la expresión aumentada de metaloproteasas de matriz (MMP), en particular la de MMP-3¹⁴⁸, la cual se encuentra sobre expresada en GBM¹⁴⁷, y es capaz de degradar a agrin. Se ha reportado que la disminución de agrin lleva a la disrupción de la barrera hematoencefálica. Un aspecto llamativo es que parece haber una relación inversa entre la cantidad de tenascinas y agrin en el espacio perivascular. Esta correlación negativa indica una posible relación en su regulación¹⁴⁹.

Otros componentes de la MEC presentes en la zona perivascular del cerebro son las lamininas. Estas son glicoproteínas heterotriméricas compuestas de tres polipéptidos (alfa, beta y gama). Si bien son poco abundante en el tejido del parénquima cerebral, son de alta expresión en la membrana basal de la zona perivascular¹⁴⁵. Un estudio de Ljubimova *et al.* donde se analizaron genes asociados a peor pronóstico en gliomas, determinó que la laminina-8 se encuentra sobre expresada en GBM, mientras que la laminina-9 exhibe mayores niveles de expresión en el tejido normal. También, encontraron que la laminina-8 estaba asociada a un peor pronóstico, ya que tumores con alta expresión de esta proteína tenían asociado un menor tiempo de recaída que tumores con alta expresión de laminina-9¹⁵⁰. En otro trabajo se observó que el silenciamiento génico de la laminina-8 disminuyó la capacidad invasiva de líneas celulares de GBM *in vitro* ¹⁵¹. Además, fue reportado que la expresión de la laminina-411 correlaciona con un peor pronóstico en GBM y correlaciona con marcadores de CMT. En experimentos *in vivo* en ratones, los autores de este trabajo también observaron que la depleción de la laminina-411 resultaba en una mayor supervivencia y una menor recurrencia tumoral¹⁵².

El colágeno es una glicoproteína con estructura de triple hélice que se auto polimeriza y forma una red en los tejidos conectivos, incluyendo las membranas basales. Wang y colaboradores observaron que en GBM se encuentra aumentada la abundancia de colágeno en la MEC, en particular la expresión de la cadena alfa-2(I) (COL1A2), y que su expresión correlaciona con peor pronóstico. Además, el silenciamiento de la cadena COL1A2 en líneas celulares de GBM *in vitro* generó una disminución de la capacidad invasiva y promovió el arresto del ciclo celular¹⁵³. En otro trabajo, se observó que el colágeno III (COL3A1) también induce migración e invasión en líneas de GBM, aunque las concentraciones muy

altas de esta proteína producen una inhibición de la invasión¹⁵⁴. Otros autores notaron que el colágeno XVI se encuentra sobre expresado en GBM en las zonas perivasculares y en el parénquima tumoral. Observaron que el silenciamiento de este colágeno afecta la adhesión de células de glioma aunque no afecta su migración *in vitro*¹⁵⁵. Los nidógenos son proteínas que se unen a laminina y a colágeno, formando un puente entre estas dos moléculas. Zhang y colaboradores observaron que nidogeno-1 se encuentra sobre expresado en gliomas y que correlaciona con peor pronóstico en gliomas de bajo grado. En GBM, si bien también se encuentra sobre expresada, su expresión no correlaciona con el pronóstico¹⁵⁶. En células de glioma Xu y colaboradores observaron que la inhibición de nidogeno-1 vía el microARN-1298-3p inhibe la proliferación y la migración celular¹⁵⁷. También se determinó que en células normales de cerebro, la actividad de la vía de NOTCH aumenta la expresión de nidógeno y esto promueve la adhesión de células gliales normales a laminina¹⁵⁸. Resultaría interesante indagar en esta relación en un contexto tumoral.

En la zona perivascular también está descripta la presencia de fibronectina (FN), que se estima tiene un rol estructural y de almacenamiento de factores de crecimiento¹⁵⁹. La FN es una glicoproteína de alto peso molecular que se encuentra sobre expresada en el microambiente del GBM, en particular cerca de vasos sanguíneos¹²⁷, y su expresión correlaciona con un peor pronóstico¹⁶⁰. Seres y colaboradores observaron que la depleción *in vitro* de FN aumenta la migración de células individuales, pero disminuye la migración colectiva y la cohesión celular¹⁶¹. Por otro lado, Huang *et al.* encontraron que la interacción de FN con la integrina $\beta 1$ aumenta la migración, y que la disrupción de esta interacción inhibe tanto la migración como la invasión³⁴. En el GBM, el rol pro-invasivo de FN parece estar regulado por los factores GBP2 y STAT3¹⁶².

Por último, la periostina es una proteína de la MEC encontrada en la zona perivascular, particularmente en gliomas. En gliomas, se ha observado que se encuentra sobre expresada en comparación con los niveles expresados en el tejido de cerebro normal y que esta expresión correlaciona con el grado tumoral. Mikheev y colaboradores observaron, mediante estudios *in vitro*, que la periostina induce la invasión, y que es necesaria para la adhesión celular de líneas celulares de GBM. Más aún, se observó que este efecto se da en

CMG y en células de glioma en general¹⁶³. Huizer *et al.* también observaron que en GBM hay una sobre expresión de periostina pero, notablemente, encontraron que las células que expresan más periostina son los pericitos asociados al tumor¹⁶⁴. El estudio no esclareció si estos pericitos, que expresaban periostina, son pericitos normales cuya expresión de periostina está inducida por el microambiente tumoral, o si se trata de pericitos de origen tumoral (los cuales han sido descriptos en la literatura¹⁶⁵).

Proteasas extracelulares producidas por GBM

Como se mencionó, el GBM puede producir componentes de la MEC y por lo tanto modular sus características. Además, las células tumorales también expresan proteasas que pueden degradar, activar o modificar esta MEC.

Entre las proteasas más relevantes se encuentran los miembros de la superfamilia Metzincin de proteasas, de la familia de peptidasas relacionadas a kallikreinas (KLKs) y las peptidasas lisosomales conocidas como catepsinas¹⁶⁶.

La familia Metzincin de proteasas abarca una gran variedad de endoproteasas caracterizadas por una metionina conservada en su sitio activo. Esta familia está compuesta por tres subgrupos, las MMPs, y las adamlisinas: integrantes de la familia ADAM e integrantes de la familia ADAMTS¹⁶⁶. Las MMPs, son un grupo de endopeptidasas dependiente de zinc que pueden degradar diferentes componentes de la MEC, tales como el colágeno, la laminina y la FN. También se ha descrito que puedan clivar factores E-cadherina, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*, etc.)¹⁶⁷ y otras MMPs. En el cerebro sano MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP, también conocida como MMP-14, son expresadas en forma constitutiva, mientras que otras MMPs son activadas sólo en situaciones particulares como la inflamación¹⁶⁷. En GBM, se ha observado que la expresión de MMP-9 y MMP-2 se encuentra aumentada y que estos aumentos correlacionan con un peor pronóstico^{70,168,169}. Diversos estudios *in vitro* han

demostrado que estas proteasas facilitan y favorecen la capacidad invasiva de distintas líneas celulares de GBM¹⁷⁰⁻¹⁷³. Estas dos proteasas (MMP-2 y MMP-9) degradan principalmente colágenos de la membrana basal y elastina¹⁶⁶. MT1-MMP, o MMP-14, es una MMP con dominio transmembrana, Shiomi y Okada han observado una correlación entre la expresión de esta proteasa y la progresión tumoral en varios tipos de cáncer, incluyendo gliomas¹⁷⁴. Los integrantes de la subfamilia ADAM son a su vez integrantes de la familia Metzincin de proteínas, las cuales se encuentran ancladas a las membranas celulares y contienen un dominio desintegrina¹⁶⁶. Este dominio permite que la proteasa interactúe con integrinas y se ha observado que esta interacción puede ser importante para la adhesión célula-célula¹⁷⁵. También tienen un dominio de metaloproteasa y pueden degradar una variedad de sustratos incluyendo la proteína básica de mielina¹⁷⁶ y una gran diversidad de factores asociados a la señalización tales como EGFR, insulina, TNF, ciclinas y CD47¹⁷⁷. En el microambiente del GBM, ADAM-10 y ADAM-17 se encuentran sobre expresadas y están asociadas con la migración y diferenciación en GBM, específicamente de CMG¹⁷⁸. La familia de ADAMTS son proteínas similares a las proteínas ADAMs pero sin el dominio de anclaje a la membrana y con un motivo de trombospondina¹⁷⁷. ADAMTS-1 y ADAMTS-5 están involucradas en el procesamiento y la regulación de proteoglicanos, tal como el versicano y el brevicano¹⁷⁷. Se ha encontrado que ADAMTS-4 y ADAMTS-5 se encuentran sobre expresadas en el microambiente de GBM¹⁷⁹. En el análisis de las proteasas de la familia Metzincin, es importante considerar que el efecto que tienen sobre la migración y la invasión puede deberse a su actividad de remodelación de la MEC, pero también se puede dar por el rol que tienen activando y desactivando factores de señalización. Varias miembros de esta familia, especialmente ADAMS, están involucrados en la activación proteolítica de factores de crecimiento tales como HB-EGF (*heparin-binding endothelial growth factor*), insulina, NOTCH, cadherinas y TNF¹⁸⁰.

Transiciones fenotípicas asociadas a migración e invasión

Como se ha mencionado anteriormente, las CMG tienen una gran plasticidad fenotípica. Se hipotetiza que esta habilidad les permite adaptarse al microambiente y cambiar de estado, incluyendo un cambio hacia un estado más invasivo. Estos cambios de estado se denominan transiciones fenotípicas y hay varias descritas en GBM: transición epitelio-mesenquimal, transición proneural-mesenquimal, transición glial-mesenquimal, dicotomía migración/proliferación y transición angiogénesis-invasión^{181,182}. Es importante reconocer que estos conceptos son marcos teóricos para estudiar patrones de cambios de estado en células y no necesariamente son procesos independientes, sino que hay superposición entre ellos.

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) fue originalmente descrita en la diferenciación embrionaria. Implica la transformación de una célula epitelial polarizada y adherida a una membrana basal a una célula con fenotipo mesenquimal, con capacidad migratoria, resistencia a apoptosis y elevada producción de componentes de la MEC. Esta transformación es reversible y el proceso inverso se denomina transición mesenquimal-epitelio¹⁸³. Aunque anteriormente a esta transición se la consideraba como binaria, actualmente se reconoce que las células pueden adquirir fenotipos intermedios¹⁸⁴. En células de GBM se encuentra una correlación positiva entre los niveles de expresión de genes asociados con la TEM (Twist, Snail, Slug y Zeb) y la invasividad¹⁸⁵. En el 50% de GBM se encuentra aumentada la actividad de la vía PI3K/AKT, esta vía está asociada con TEM y particularmente con la expresión de MMPs que pueden degradar la MEC^{186,187}.

La transición proneural-mesenquimal (TPM) ha sido descrita en GBM en respuesta a la radioterapia. Se encontró que la radioterapia conduce a una disminución de marcadores proneurales y a un aumento de marcadores mesenquimales. Este mecanismo se encuentra mediado por las vías NFκB y JAK/STAT, dos vías asociadas con la TEM¹⁸⁸. Al momento, no queda claro si esta transición y la TEM en GBM son dos marcos de estudio para el mismo proceso o si son distintas transiciones con vías en común.

En el 2014 se propuso otra transición: la transición glial-mesenquimal (TGM)¹⁸². Al igual que la TEM y la TPM, esta transición implica la adquisición de marcadores mesenquimales tal

como Snail en respuesta a irradiación y un fenotipo mesenquimal acompañante. Se observó, también, un incremento en la capacidad migratoria de estas células¹⁸². La TGM también parece estar superpuesta, en gran medida, con la TEM. Muy posiblemente, en un futuro, estas tres transiciones (TEM, TPM y TGM) se unifiquen dentro de una misma.

Otra transición fenotípica relevante en GBM es la dicotomía migración/proliferación, “*Go or Grow*”. Esta transición se basa en estudios que observaron que las células alternan entre estados más proliferativos, pero de migración baja, y estados de baja proliferación y alta migración, es decir, que no tienen los dos procesos activos a la vez¹⁸⁹. En GBM se describió este fenómeno en el 2003¹⁹⁰ y en el 2010 Godlewski *et al.* encontraron un microARN (microRNA 451) que regula el fenómeno en respuesta a la cantidad de glucosa en el ambiente¹⁹¹. También se encontró que la hipoxia modula esta dicotomía: en presencia de altas cantidades de oxígeno las células de GBM tienden a proliferar y en su ausencia a incrementar su migración¹⁸⁹. La habilidad de cambiar rápidamente entre estados explicaría como células invasivas pueden, en poco tiempo, generar nuevos tumores satélites.

Por último, también existe la transición angiogénesis/invasión. Angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos nuevos. Es un proceso cooptado por tumores para asegurar la llegada de oxígeno y nutrientes al tumor en crecimiento. En base a esto, la angiogénesis ha sido un blanco de tratamiento en varios tipos de cáncer. VEGF y su vía, han sido identificados como moléculas clave para la angiogénesis, y se han desarrollado varias terapias en consecuencia. Bevacizumab, mencionado anteriormente, es un anticuerpo monoclonal de unión a VEGF y se utiliza en GBM. A pesar de ciertos estudios con resultados prometedores, todavía tiene limitaciones, una de las cuales es que la terapia anti-VEGF puede aumentar la progresión tumoral promoviendo un fenotipo más invasivo¹⁹². Hay estudios que evidencian que pacientes tratados con bevacizumab muestran un tumor recurrente con mayor invasividad aunque con una mediana de supervivencia general igual^{193,194}. Estudios que indagaron en este fenómeno postulan que éste estaría causado por la hipoxia intra-tumoral que genera el tratamiento con bevacizumab, que a su vez induce la migración e invasión¹⁹⁵.

La hipoxia como inductor de la migración e invasión

Dos características claves para identificar al GBM a nivel histológico son la necrosis y la proliferación microvascular, dos signos de hipoxia tumoral⁸. A pesar de que generalmente se observa una gran vascularización en GBM, la mayoría de estos tumores muestran hipoxia moderada (0,5%-2,5% O₂, 4 mm Hg – 20 mm Hg) y el nivel de hipoxia correlaciona con un peor pronóstico¹⁹⁶. Esto se debe a que la microvasculatura en el tumor es ineficiente y no alcanza para proveer al tumor con suficiente oxígeno y nutrientes.¹⁹⁷ La vasculatura en GBM es errática, altamente permeable, y, a diferencia de la vasculatura normal de cerebro, comúnmente carece de la cobertura de pericitos. Su membrana basal está engrosada comparada a la de vasculatura sana, y tienden a tener vasos de mayor diámetro. También, en esta microvasculatura, ocurren frecuentemente trombos, que generan aún más hipoxia^{15,198}. Todas estas características forman un tumor que tiende a ser altamente vascularizado, con la barrera hematoencefálica comprometida, pero con varios focos hipóxicos. En estos focos hipóxicos, las células tumorales y no tumorales responden principalmente mediante las moléculas HIF (factores inducibles por hipoxia).

HIF1, el primer HIF descubierto¹⁹⁹, está compuesto por dos subunidades: α y β . La subunidad β no es dependiente del oxígeno, pero la subunidad α sí lo es. HIF-1 α se expresa en forma constitutiva, pero, en presencia de oxígeno es degradado rápidamente gracias a su marcación mediada por la enzima proil hidroxilasa (PHD) la unión a la proteína Von Hippel-Lindau (pVHL) y la ubiquitinación por E3-ubiquitin ligasa. En hipoxia la actividad PHD se inhibe y los niveles de HIF-1 α se estabilizan. Luego, se transloca al núcleo donde se une a HIF1 β y funciona como factor de transcripción de cientos de genes involucrados en angiogénesis, glicolisis, TEM, proliferación, inflamación e invasión²⁰⁰. Más allá de la regulación por PHD, HIF1 también es regulado por el factor de inhibición de HIF (FIH) que puede bloquear la unión de HIF-1 con activadoras transcripcionales p300/CREB¹⁹⁷. GBM es uno de los tumores que muestra mayor expresión de HIF1 α , donde se expresa en promedio tres veces más que en tejido normal²⁰¹. Esta expresión aumentada se puede dar por la

deleción del gen fosfatasa con homología a tensina (PTEN), una pérdida común en GBM, que conlleva la activación persistente de la vía PI3K/AKT/mTOR. También, puede deberse a la perdida de p53, proteína que inhibe a HIF1, promoviendo la ubiquitinación medida por MDM2²⁰².

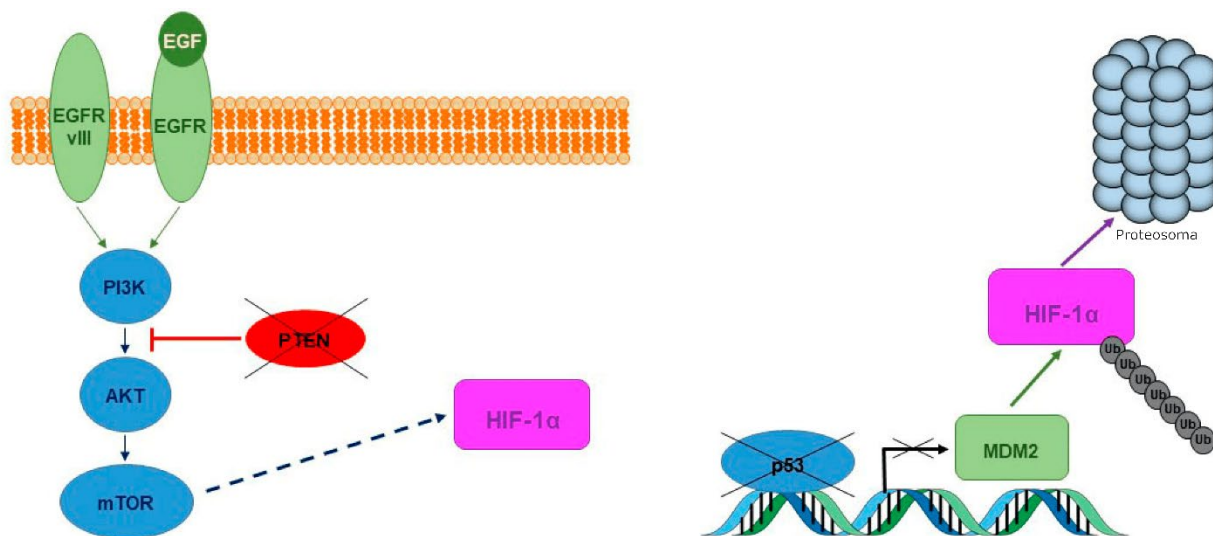


Figura 9. Efecto de la deleción de PTEN y perdida de p53 sobre cantidades de HIF-1α en GBM. Figura traducida y adaptada de Monteiro et al.²⁰²

Mientras que HIF1α está asociado a hipoxia aguda, HIF2α está asociado a hipoxia crónica²⁰³. Esta proteína tiene el mismo sistema de regulación que HIF1, en donde HIF2α se estabiliza en normoxia, transloca al núcleo, y se une a HIF1β y actúa como factor de transcripción sobre sus propios genes blancos que se superponen en gran medida con los blancos de HIF-1. También hay evidencia que HIF2α se puede estabilizar en condiciones normóxicas si hay células hipóxicas cerca. Al igual que HIF1α funciona como un factor de transcripción que afecta genes de TEM, resistencia a quimioterapéuticos, angiogénesis e invasión²⁰³. HIF2α tiene un patrón diferente de expresión al de HIF1α, en GBM se vio que se expresa predominantemente en CMG²⁰⁴. GBM es uno de los pocos tumores donde se ve mayor expresión de HIF-2α que en tejido normal²⁰¹.

Por último, HIF3 α es una proteína parecida a HIF1 α y HIF2 α , pero sin el dominio de unión al ADN. Por lo tanto funciona como secuestrador de HIF β 1, regulando negativamente a HIF1 α y HIF2 α ²⁰⁵. También funciona en sí como un factor de transcripción con sus propios genes blancos²⁰⁶. En un análisis usando datos de secuenciación de ARN, pacientes con mayor expresión de HIF3 α tuvieron mejor pronóstico, a diferencia de HIF1 α y HIF2 α , donde se observa lo contrario. En GBM por lo general se detecta menos expresión de HIF3 α que en tejido normal²⁰¹.

Se ha notado que la hipoxia ayuda a mantener el *stemness* de las CMG y que este fenómeno depende de las HIFs. Silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α reducen las características “*stem*” de las CMG²⁰⁴. Hay estudios que postulan que esto se da por la activación de la vía NOTCH por HIF1 α ²⁰⁷, mientras que otros postulan que es por la activación de CD133, Oct4 y Sox2 por HIF2 α ²⁰⁸.

Varios experimentos *in vitro* muestran que la hipoxia aumenta la migración en líneas comerciales de GBM^{209,210}. A su vez, la hipoxia, mediante HIF-1 y HIF-2, aumenta la expresión de varios genes y vías asociadas a la invasión. Entre éstos están las MMPs, endoproteasas que son moduladores de la MEC. En GBM la hipoxia conduce al aumento de la expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9 en forma dependiente de HIF-1 α ²¹¹. También se encuentran modulados por hipoxia otros genes que modulan la MEC como la anhidrasa carbónica,²¹² y la procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa2 (PLOD2)²¹³. Se ha observado que ciertas integrinas como $\alpha\beta$ 3 y $\alpha\beta$ 5 son reclutadas a la membrana celular de líneas celulares de GBM e interaccionan con EGFRvIII en condiciones hipóxicas, e influyen sobre la adhesión celular a la MEC^{214,215}.

También, se ha observado que la hipoxia puede afectar las transiciones fenotípicas. Se ha encontrado que CBF1 (*C-repeat-binding factor-1*) y ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*), genes asociados con la TEM, están aumentados en focos hipóxicos del tumor. Estudios demuestran que la inducción de TEM por hipoxia se da de manera HIF-dependiente y HIF-independiente²¹⁶. En cuanto a la dicotomía migración/proliferación ya se mencionó como la presencia de oxígeno lleva hacia el polo de proliferación mientras que la hipoxia

hacia migración¹⁸⁹. La transición angiogénesis/invasión es de gran interés porque la hipoxia en sí favorece estos dos estados, pero si uno está comprometido por inhibición, como en el caso de terapias anti-angiogénicas, se promueve el otro estado. Toda esta evidencia apoya un modelo en el cual la hipoxia, mediante estabilización de los HIF, tiene un rol clave en promover la infiltración de GBM.

Consecuencias de la migración e invasión

La infiltración de células tumorales en el parénquima cerebral, en las zonas perivasculares y en las vías de materia blanca lleva a la propagación de la enfermedad debido a que pueden generar nuevos focos de tumor satelitales. Esta capacidad infiltrativa también hace imposible la resección total aun cuando hay una resección macroscópica completa. Hay que sumar a estas consecuencias que las células infiltrantes en sí causan problemas en el cerebro aun antes de generar focos nuevos de tumor.

En un cerebro sano, los pies de los astrocitos envuelven la mayoría de los vasos sanguíneos. Esta configuración es necesaria para mantener la homeostasis tisular y la integridad de la barrera hematoencefálica¹¹⁴. Cuando las células de glioma invaden por el espacio perivascular degradan la matriz, frecuentemente separan a los procesos astrocíticos de los vasos. Las células tumorales también pueden afectar a las células endoteliales y a las uniones intercelulares tipo GAP. Esto lleva a la disrupción de la barrera hematoencefálica y permite la entrada de moléculas y células generalmente filtradas, y, aunque es útil en el marco de la quimioterapia, puede ser desastroso cuando toxinas entran y afectan neuronas normales en el cerebro. Esta separación también puede afectar a la vasculatura en sí ya que los astrocitos a menudo regulan la dilatación y contracción de los vasos sanguíneos y en su ausencia este proceso se desregula^{85,114}.

En las vías de materia blanca, las células tumorales se introducen entre las fibras de axones mielinizados y pueden alterar la posición y orientación de las fibras, afectando su función²¹⁷.

También se ha observado que la infiltración del GBM en las vías de materia blanca puede afectar la integridad axonal²¹⁸.

Por lo antes mencionado, consideramos que profundizar el conocimiento que se tiene sobre la heterogeneidad inter-tumoral de los GBM y cómo ésta se ve reflejada en los mecanismos que regulan la invasión celular permitirá el desarrollo de terapias destinadas a mitigar la infiltración tumoral.

Hipótesis y objetivos

Debido a la heterogeneidad inter-tumoral exhibida por los GBM, se propone como hipótesis que las distintas líneas de CMG derivadas de pacientes presentan diferentes capacidades migratorias e invasivas, las cuales estarían determinadas, al menos en parte, por sus respectivos estatus transcriptómicos. Proponemos también que la hipoxia constituye un estímulo que aumenta la capacidad migratoria de las CMG.

Para poner a prueba esta hipótesis, en esta tesis planteamos como objetivo general caracterizar la migración e invasión en distintas líneas de CMG derivadas de biopsias de pacientes y, paralelamente, estudiar la variabilidad molecular relacionada al comportamiento migratorio/invasivo. También nos propusimos estudiar estos procesos y los cambios transcriptómicos en respuesta a hipoxia.

Como objetivos específicos se propusieron:

1. Caracterizar la migración y la invasión de distintas líneas de CMG derivadas de pacientes
2. Analizar mediante secuenciación del ARN (RNAseq) la heterogeneidad a nivel transcriptómico de las diferentes líneas de CMG
3. Mediante el análisis bioinformático de los datos de secuenciación obtenidos en el objetivo anterior, analizar diferencias en vías y genes asociados a procesos de

migración e invasión, tanto entre las diferentes líneas de CMG como en la respuesta de cada una de ellas a condiciones de hipoxia.

4. En base a los resultados anteriores, proponer posibles blancos terapéuticos que afecten la migración y la invasión.
5. Evaluar los posibles blancos terapéuticos mediante técnicas de silenciamiento génico y ensayos *in vitro* de migración y de invasión celular.

Materiales y Métodos

Métodos de cultivo celular

Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron líneas de células madre de glioma (CMG) derivadas de biopsias quirúrgicas de gliomas que fueron aisladas y establecidas previamente en el Laboratorio de Investigación Aplicada a las Neurociencias (LIAN) de la Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia FLENI⁷⁹. Las líneas CMG se conocen como G01, G02, G03, G04, G05, G07, G08 y G09.

Para obtener los medios condicionados de macrófagos se utilizaron monocitos THP1 (ACTT TB-202) diferenciados. THP1 es una línea comercial de monocitos humanos derivada de la sangre periférica de un paciente con leucemia aguda monocítica.

Cultivo de las líneas CMG

Las líneas de CMG fueron cultivadas sobre placas de cultivo pre-tratadas con extractos solubles de membrana basal (1:100 Geltrex, Thermo Fisher). El medio de cultivo, libre de suero, utilizado se denomina TSM y está compuesto por Neurobasal (Thermo Fisher), los suplementos B27 y N2 (Thermo Fisher), 75 µg/ml de albúmina sérica bovina baja en endotoxinas (Sigma), 2 mM L-Glutamina (Thermo Fisher), 50 U/ml Penicilina/Estreptomicina (P/E) (Thermo Fisher), 2 mM de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher), 1mM piruvato de sodio (Gibco), 20 ng/ml EGF (Thermo Fisher) y 20 ng/ml bFGF (Thermo Fisher). Para la

expansión de las líneas, los pasajes de células se realizaron cuando los cultivos alcanzaron una confluencia cercana al 100%, aspirando el medio, lavando con PBS e incubando las células con 15µl/cm² de la enzima StemPro Accutase (ThermoFisher) durante 3-5 minutos a 37°C. Luego de la incubación, la enzima se diluyó en PBS 1:5, la suspensión celular se colocó en un tubo cónico y fue centrifugada por 5 minutos a 200xg. Al finalizar la centrifugación el pellet celular fue resuspendido en TSM y la suspensión celular transferida a placas pre-tratadas con Geltrex. En términos generales las líneas de CMT fueron expandidas 1:2 o 1:3 cada cinco a siete días aproximadamente.

Cultivo y diferenciación de la línea Thp1

La línea THP1 se creció en suspensión en medio RPMI compuesto de medio RPMI 1640 (Gibco) con 10% suero fetal bovino (Gibco), 50 U/ml Penicilina/Estreptomicina (P/E) (Thermo Fisher), y 1mM piruvato de sodio (Gibco). La expansión de las líneas se realizó aproximadamente cada 48 horas, para eso se toma la suspensión de células, se centrifuga 5 minutos a 200xg y se resuspende en medio fresco diluyendo las células 1:3 a 1:5.

Para la diferenciación de los monocitos THP1 a macrófagos M0 se trataron con 200 nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) por 48hs. Para obtener macrófagos M1 se trataron macrófagos M0 con 100 ng/ml LPS (lipopolysaccharides) y 20 ng/ml INF-γ (interferón gamma) por 24 h. Para obtener macrófagos M2 se trataron los macrófagos M0 con 20 ng/ml IL4 (Interleukin 4) y 20ng/ml IL13 (Interleukin 13) por 24h.

Criopreservación de las líneas celulares

Para la criopreservación de las células, las líneas CMG fueron dissociadas de la placa de cultivo del mismo modo que para su propagación, pero tras la centrifugación fueron

resuspendidas en medio TSM (líneas CMG) o conteniendo 10% v/v DMSO. La línea de THP1 se centrifugaron directamente y se resuspendieron en RPMI conteniendo 10% v/v DMSO. Ambas fueron almacenadas en criotubos. Los criotubos se preservaron en un contenedor para congelamiento con isopropanol en un freezer a -80°C por 24 horas para lograr un congelamiento lento y luego guardados en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelamiento los viales fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido y colocados en un baño termostático a 37°C. Una vez descongeladas, las células fueron transferidas a un tubo cónico conteniendo 10 ml de PBS y se centrifugadas por 5 minutos a 200xg. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en TSM (líneas CMG) o RPMI (línea THP1) y colocadas en placas pre-tratadas con Geltrex (líneas CMG) o en suspensión (THP1).

Ensayos de migración e invasión

Ensayo migratorio de esfera

Para la formación de esferas se utilizaron placas fondo en v de 96 pocillos pretratadas con solución antiadherente (STEMCELL technologies) por 20 minutos, luego lavadas tres veces con solución PBS. Las células se disociaron como se detalló en el sector de Métodos de cultivo celular y se plaquearon 8000 células por pocillo con 200 µl de medio TSM. Luego se centrifugó la placa por 5 minutos a 200xg y se dejó 24 horas en estufa a 37°C y 5% CO₂ para que se formen las esferas. Luego de las 24 horas la esfera se pasó a un pocillo de placa de 48 pocillos previamente tratada con Geltrex. Este momento se consideró en tiempo cero del ensayo. La placa se incubó en estufa a 37°C con 5% CO₂, con oxígeno atmosférico (condiciones normoxia) o con 1% de oxígeno (condiciones hipoxia). Al finalizar el ensayo se sacaron fotos con un microscopio con una magnificación 40x y el área de migración se

calculó utilizando el programa Fiji (ImageJ) versión 1.35. Cada replica consiste en seis replicas esferas medidas.

Ensayo de herida

Para el ensayo migratorio de herida se plaquearon las células sobre plástico tratado con Geltrex en una confluencia alta (40.000 células/cm²). Al día siguiente con un tip de 200 µl se realizó una herida rasguñando el fondo de la placa a través del medio del pocillo. Inmediatamente después se realizó un lavado con solución PBS y se agregó Geltrex (1:100) al pocillo. Se incubó la placa por 1 hora en estufa a 37°C con 5% CO₂ y luego se retiró el Geltrex y se agregó medio TSM. Después del tiempo indicado se tomaron fotos en un microscopio con una magnificación 40x. Cada replica consiste en cuatro fotos promediadas.

Ensayo invasivo de esfera

Para realizar el ensayo invasivo de esfera se prepararon las esferas siguiendo el mismo protocolo indicado para el ensayo migratorio de esfera. Luego de preparar la esfera se pasaron a pocillos con fondo en U en placa de 96 pocillos con 30 µl de medio acompañantes. Esta placa se incubo 10 minutos sobre hielo. Dentro de estos pocillos se agregó 10 µl de Geltrex puro frio, el cual se mezcló con la pipeta, generando una dilución de Geltrex de 1/4. Se incubó la placa 15 minutos el hielo, golpeando la placa suavemente para asegurar la distribución correcta de las esferas en el medio del pocillo. Luego la placa se incubó a 37°C en estufa con 5% de CO₂ por una hora. Al finalizar la incubación se agregaron 150 µl de medio TSM a cada pocillo. Las fotos se sacaron al tiempo indicado en cada

experimento en un microscopio con la magnificación 40x. cada replica consiste en tres esferas medidas.

Ensayo de viabilidad por ioduro de propidio

Las células fueron disociadas enzimáticamente con Accutase, siguiendo el protocolo descrito para su propagación. Se recolectó también el medio de cultivo y el líquido de los lavados para recuperar las células en flotación (células muertas). Luego de centrifugar las células (adheridas y en flotación), éstas fueron resuspendidas en 400µl de PBS junto con 20µl de ioduro de propidio (50 µg/ml), el cual solo se incorpora en células que hayan perdido la integridad de su membrana plasmática (células muertas). Para cuantificar la proporción que incorporo ioduro de propidio se adquirieron las células en un citómetro Accuri C6 (Becton Dickinson) de flujo donde se midió la fluorescencia de cada evento en el canal FL2-A (585/40 nm). En base a esto se cuantificó el porcentaje de células que habían incorporado ioduro de propidio. Se tomaron un mínimo de 40.000 células por medida.

Métodos para la secuenciación de ARN

Preparación de muestras para secuenciación de ARN

Para realizar la secuenciación de ARN de incubaron 500.000 células de cada línea celular en normoxia o hipoxia (1% de oxígeno) por 96 horas (por triplicado). A las 96 horas las células se incubaron con el reactivo Trizol (Thermo Fisher) durante 10 minutos. El ARN se extrajo agregando cloroformo (Merck) en una relación 1:5 con el trizol. Se recuperó la fase acuosa, se precipitó el ARN con isopropanol 100% (Merck) y se lavó con etanol 75%. El pellet se

resuspendió en agua desionizada y se agregó ADNasa (Thermo Fisher) en una concentración de 0,1 u/μL y se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego se calentó a 65°C por 10 minutos para inactivar la enzima. Se realizó un control de calidad sobre la muestra para comprobar la integridad de ARN y la falta de ADNg en la muestra. Para lograr esto se corrieron parte de las muestras en un gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio y se confirmó la presencia de las bandas correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S.

Luego la concentración de ARN (ng/μl) se determinó utilizando el espectrofotómetro automático NanoDrop 2000 y el software ND-2000. Se tomó 1μg de ARN de cada muestra y se precipitó con etanol 70% m/m.

Las muestras se enviaron a Macrogen en Seoul, Korea del Sur para su secuenciación con frío packs previamente enfriados a -80°C.

Secuenciación y alineamiento de muestras de ARN

Las muestras se secuenciaron en un dispositivo Illumina, con el kit *TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit* y la biblioteca *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Guide, Part #15031047 Rev. E*. El detalle del protocolo se puede encontrar en Martin & Wang²¹⁹, brevemente se fragmentó el ARN y se realizó una transcripción reversa a ADNc. Se ligaron adaptadores a los extremos de los ADNc y se amplificaron las secuencias por PCR. Luego se secuenciaron ambos extremos (pair-ended) de la secuencia. Luego se realizó un control de calidad sobre la secuenciación y se descartaron dos muestras (G02H3 y G08H3).

Las secuencias se mapearon al genoma referencia GRCh37 con HISAT2²²⁰ y se ensambló con StringTie²²¹ y las lecturas se normalizaron en base a largo de transcripto para obtener un valor de cuentas de lecturas por millón de lecturas por gen (CPM).

Flujo de trabajo para el análisis de secuenciación

Las CPM de lecturas para cada gen fue analizado con el paquete edgeR²²² de R, normalizando entre muestras utilizando el método TMM^{223,224}. Los factores de normalización para cada muestra se presentan en la Tabla 2:

Muestra	Factor de Normalización
G02N1	1.018
G02N2	1.043
G02N3	1.088
G02H1	0.656
G02H2	0.640
G03N1	0.983
G03N2	1.031
G03N3	1.080
G03H1	1.000
G03H2	1.004
G03H3	1.032
G08N1	1.074
G08N2	1.064
G08H1	1.047
G08H2	1.028
G08H3	1.052
G09N1	1.011
G09N2	1.087
G09N3	1.115
G09H1	1.033
G09H2	0.987
G09H3	1.126

Tabla 2. Factor de normalización calculado por muestra por método TMM.

Luego de normalizar se retiraron todos los genes sin lecturas del análisis, obteniendo 16.719 genes para analizar. Por último, se realizó una transformación logarítmica base 2 a las CPM de cada gen.

Análisis de clustering no jerarquizado: MDS

Para generar el gráfico de MDS (multi-dimensional scaling) se utilizó el paquete plotMDS de limma²²⁵, eligiendo los 5000 genes más expresados. El algoritmo produjo una matriz de distancias en base a las similitudes y diferencias entre las muestras, que se graficó en las primeras cuatro dimensiones (dimension1 vs dimensión 2, y dimensión 3 vs dimensión 4).

Análisis de clustering jerarquizado: dendograma

Para generar el dendrograma de clustering jerarquizado se calcularon las distancias euclidianas entre las muestras con la función dist²²⁶ del paquete cluster, luego se realizó un clustering de las muestras en base a estas distancias utilizando el paquete hclust con el método *completo*²²⁷.

Análisis de clustering jerarquizado: heatmap

Para generar el heatmap se utilizó el Log₂ CPM para calcular un z-score, que es un valor que permite comparar el nivel de expresión de genes de una muestra con la expresión de ese gen en el conjunto de muestras. En base a estos valores de z-score se generó una matriz de distancias entre las muestras y entre los genes. En base a estas distancias se utilizó hclust para generar un dendrograma para las muestras y para los genes.

Genes diferencialmente expresados

Para combatir la heteroscedasticidad inherente encontrada en resultados de RNAseq se realizó una conversión Voom sobre los CPM, que aplica una transformación logarítmica base 2 y corrige por la relación varianza/media de expresión de los genes²²⁸. Con esto se pudo armar un modelo lineal ponderado ajustando los datos a los modelos utilizados. En esta tesis se utilizaron dos modelos lineales: 1) $\sim 0 + \text{línea celular}$ para las comparaciones

entre líneas en normoxia y 2) $\sim 0 + \text{línea celular} + \text{tratamiento}$ para evaluar el efecto de hipoxia en cada línea. Luego del ajuste al modelo se realizaron comparaciones para buscar genes significativamente diferencialmente expresados. Para el análisis de las líneas basalmente se utilizaron las comparaciones entre cada línea en normoxia y la mediana de las cuatro líneas en normoxia. Para el análisis de genes diferencialmente expresados con hipoxia se realizaron comparaciones en cada línea entre la condición de hipoxia y la de normoxia.

Luego de realizar estas comparaciones se aplicó una función bayesiana empírica para mejorar la precisión de las estimaciones estadísticas del modelo lineal combinando las estimaciones de la varianza de cada gen con la varianza global de todos los genes²²⁹. A partir de esto se pudo contar con el valor de Log₂ Fold Change (tasa de cambio) para cada gen en cada comparación, con un p valor ajustado por comparaciones múltiples.

Análisis de PROGENy

Para realizar en análisis de PROGENy se tomaron los datos de CPM y se realizó un análisis DESeq2²³⁰ para calcular los genes diferencialmente expresados, normalizando y corriendo la varianza durante el análisis. Para este análisis se utilizó en el modelo lineal $\sim 0 + \text{línea celular} + \text{tratamiento}$. Con la matriz de expresión de genes se aplicó la función Progeny del paquete PROGENy²³¹ para calcular los valores normalizados de enriquecimiento de 14 vías utilizando los 1000 genes con menor p valor. El heatmap se armó en base a los valores normalizados de enriquecimiento.

Análisis de DoRothEA

Para realizar el análisis de enriquecimiento de vías de factores de transcripción se utilizó el paquete DoRothEA²³² y viper²³³. Utilizando la matriz de expresión de genes de DESeq2

explicado anteriormente, se aplicó la función `run_viper` para obtener una matriz de los valores de enriquecimiento normalizado para cada factor de transcripción. Se utilizó la base de datos DoRothEA que contiene 1395 factores de transcripción asociado a los genes blancos, solamente se utilizaron las asociaciones con alta confianza (A y B). Se definió un mínimo de 4 genes blancos por factor de transcripción y se utilizó el método “scale”.

Vías diferencialmente enriquecidas

Para identificar conjunto de genes diferencialmente enriquecidas entre condiciones se utilizó la función `fgsea`²³⁴, filtrando por vías con un mínimo de 15 genes asociados y un máximo de 500. Se evaluaron conjunto de genes de los conjuntos de la enciclopedia KEGG, REACTOME, GSEA Procesos biológicos, GSEA compartimientos celulares, GSEA funciones moleculares y HALLMARKS. Luego se filtraron los conjuntos de genes con p valor ajustado menor a 0.05. Con este análisis se obtuvo los valores de enriquecimiento normalizado para cada conjunto de genes en cada condición.

Ensayos de biología molecular

Extracción de ARN, retrotranscripción y PCR cuantitativa

La expresión relativa de ARN mensajeros fue determinada mediante la técnica de RT-qPCR utilizando primers específicos. Las células se incubaron con el reactivo Trizol (Thermo Fisher) durante unos minutos. El ARN se extrajo agregando cloroformo (Merck) en una relación 1:5 con el trizol. Se recuperó la fase acuosa, se precipitó el ARN con isopropanol (Merck) y se lavó con etanol 75%. El pellet se resuspendió en agua desionizada y la

concentración de ARN (ng/μl) se determinó utilizando el espectrofotómetro automático NanoDrop 2000 y el software ND-2000. Solamente se emplearon las muestras que mostraron un valor de la relación OD260/OD280 mayor a 1,8.

Para efectuar la retro-transcripción se utilizaron 500 ng de ARN total, 10 ng/ml de oligonucleótidos al azar (random primers) (ThermoFisher), dNTPs 1 mM y 200 U de la transcriptasa reversa MMLV (Promega). A cada una de las muestras de ARN se les agregó los dNTPs y los random primers, se completó el volumen final de reacción a 15 μl con agua desionizada libre de RNAsas y luego se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 5 minutos. Para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se incubaron durante 2 minutos. Finalmente, en cada tubo se agregó la transcriptasa reversa y un buffer adecuado para su funcionamiento y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en el termociclador:

1. Retrotranscripción del ARN: 60 minutos a 37°C
2. Inactivación de la enzima MMLV: 15 minutos a 70°C

Al finalizar la reacción, las muestras de ADNc fueron diluidas 1/5 utilizando agua desionizada libre de RNAsas y almacenadas a - 20°C hasta su utilización.

Los primers utilizados para la qPCR fueron diseñados con el programa Beacon Designer (Premier Biosoft international), definiendo como Tm a una temperatura de 60°C. Para evitar la amplificación espuria de ADN genómico, los primers fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y anti-sentido fuese complementario a secuencias presentes en exones diferentes del gen blanco. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 3.

Gen blanco	Primer sentido	Primer anti-sentido
HIF1A	ACCCACCGCTGAAACGCCAA	GGTGTCTGATCCTGAATCTGGGGC
EPAS1 (HIF2A)	AAAACGAGTCCGAAGCCGAA	TGACAGAAAGATCATGTGCGCA
CSPG5	CAGTGTGCGACCTCTTCC	TGTAGTCCTGCGTGTTC
FN1	CGAGGAGAGTGGAAGTGTGAGAG	GGGTGAGGCTGCGGTTGG

LGALS1	ATGGCTTGTGGTCTGGTC	AGGTTGTTGCTGTCTTTGC
LGALS3	CTGATTGTGCCTTATAACCTG	ATGACTCTCCTGTTGTTCTC
RPL7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados como primers para PCR cuantitativa.

Cada reacción de PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un volumen total de 20µl compuestos por 10 µl del SYBR-Green máster mix (Thermo Fisher); 0,4µl del tinte de referencia ROX (Thermo Fisher); 3,6 µl del primer sentido (5µM); 3,6 µl del primer anti-sentido (5µM); 0,4 µl de agua y 2 µl del ADNc. Se utilizó el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). Cada muestra fue analizada por triplicado.

En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 94°C
2. Apareamiento y extensión: 30 segundos a 60°C
3. Desnaturalización: 40 segundos a 94°C
4. Se repiten los pasos 2 y 3 por 40 ciclos
5. Curva de temperatura de apareamiento

El protocolo de curva de temperatura de apareamiento sirvió para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando la aparición de una única banda.

Para el análisis de los datos se utilizó el método del $\Delta\Delta C_t^{235}$ donde se usó como gen referencia RPL7 (un componente de la subunidad 60S del ribosoma).

Análisis de expresión por western blot

Aproximadamente 1×10^6 células cultivadas en placas de 60 mm se lavaron dos veces con PBS frío, se cosecharon en tubos con 1 ml de PBS y se centrifugaron durante 10 minutos. EL pellet celular se resuspendió en RIPA buffer (20 mM Tris HCl pH=7,4, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS), 0,5% deoxicolato de sodio y 1 % tritón X100) conteniendo inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA, USA) e inhibidores de fosfatasas (1mM NaF, 1 mM Na_2VO_4). Las muestras se incubaron 10 minutos en hielo y luego se centrifugaron 5 minutos a 4°C a 10000xg. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce) empleando albúmina sérica bovina como patrón. A los lisados proteicos se les agregó solución de siembra 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2 %, Azul bromofenol 0,3%, β -mercaptoetanol) 0,28 M) y luego se los hirvió durante 5 minutos.

Las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel separador se preparó al 10% (1,6 ml de agua destilada estéril, 2 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 1,3 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 μl de SDS 10%, 20 μl de persulfato de amonio 25% y 2 μl de TEMED para 5 ml de solución). El gel concentrador se preparó, en ambos casos, al 4% (2,17 ml de agua destilada estéril, 0,4 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,375 ml de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 0 μl de SDS 10%, 12 μl de persulfato de amonio 25% y 2 μl de TEMED para 3 ml de solución). En todos los experimentos se sembraron aproximadamente 15-20 μg de lisado proteico por pocillo. Luego se realizó la electroforesis, a 100 V, en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Tris base 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%). Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF durante 1h minutos a 100 V.

Finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución 5% leche en PBS-Tween. La membrana se incubó durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos (tabla 2) preparados en 3% leche en PBS-Tween.

Blanco	Origen animal	No Catalogo
Actina	Cabra (goat) IgG	SC-1616
HIF1A	Conejo (rabbit) IgG	SC-10790
HIF2A (EPAS1)	Ratón (mouse) IgG	MAB3472

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para western blot.

Luego, se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno y 1 lavado de 20 minutos en PBS-Tween. Seguidamente, se incubó la membrana con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP (horse raddish protein). Finalmente, se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno y 1 lavado de 20 minutos con PBS-Tween.

Blanco	Origen animal	No Catalogo
Cabra (Goat)	Burro (Donkey)	ab6885
Conejo (Rabbit)	Cabra (Goat)	ab97200
Ratón (Mouse)	Cabra (Goat)	P0447

Tabla 5. Anticuerpos secundarios conjugados con HRP utilizados para western blot.

Por último, el Western blot se reveló mediante una reacción quimioluminiscente utilizanso el reactivo SuperSignal West Femto System (Thermo Scientific) y empleando un equipo ImageQuant LAS 4000mini. El análisis de las imágenes se realizó por medio del software ImageJ 1.34.

Silenciamiento génico transitorio mediante ARN de transferencia

Con el objetivo de silenciar la expresión de los genes blancos las células fueron transfectadas utilizando ARNs pequeños de interferencia (siRNA). Para ello se utilizó lipofectamina RNAiMAX (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, las células fueron sembradas en una confluencia cercana al 50% y luego

fueron incubadas con los complejos siRNA-lipofectamina (siRNA 10pmol/ml; lipofectamina 3µl/ml). Para permitir la formación de estos complejos en un pocillo se preparó primero una solución 20X de siRNA en el medio basal (Neurobasal), y en otro una solución 20X de lipofectamina, también en medio basal. Luego, el contenido de ambos pocillos se mezcló y se incubó durante 5 minutos para que se formen los complejos correspondientes. Luego de esto, los complejos fueron agregados a los pocillos que contenían las células (logrando una dilución 1/20 de los complejos en medio TSM).

Las células se incubaron en presencia de los complejos a 37°C durante 5 horas, tras las cuales el medio fue cambiado. Todos los tratamientos fueron realizados 24 horas post-transfección.

Gen blanco	No Catalogo
NT	4390846
HIF1A	4390824/s6539
EPAS1 (HIF2A)	4390824/s4699
CSPG5	4392420/s20996
FN1	4392420/s223585
LGALS1	4392424/s194592
LGALS3	4392424/s8148

Tabla 6. ARN cortos de interferencia (siRNA) utilizado para silenciar la expresión génica de los genes blancos.

Generación de medios condicionados

Para obtener el medio condicionado se plaquearon $1 \cdot 10^6$ células de la línea celular correspondiente con 1,5 ml de medio RPMI. En el caso de los macrófagos esto se realizó inmediatamente después de la diferenciación. Se incubaron las células por 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al finalizar la incubación se centrifugó el medio a 500xg 5 minutos y se conservó a -80°C hasta su uso. Para tratar a las células CMG se utilizó una mezcla 1:1 v/v del medio condicionado y medio TSM frescos.

Resultados

Estudio de la capacidad migratoria e invasiva de distintas líneas de CMG derivadas de pacientes

Modelo de líneas de CMG derivadas de pacientes

Para este trabajo se utilizaron líneas de células madre de glioma (CMG) establecidas previamente en nuestro laboratorio por el Dr. Videla-Richardson y colaboradores⁷⁹. Brevemente, se tomó una fracción del tumor extraído en la cirugía, se realizaron cortes con bisturí en secciones de aproximadamente 1 mm³ y se incubaron con enzimas colagenolíticas (Accutase) a 37°C por 15 minutos. Luego se centrifugó la suspensión celular, y las células se transfirieron a una placa recubierta con laminina en el medio TSM (descrito en Materiales y Métodos), el cual favorece la proliferación y supervivencia de las CMG^{78,79}.

Las líneas así generadas, se encuentran enriquecidas en células madre tumorales y, por lo tanto, permiten estudiar particularmente esta subpoblación tumoral. Además, mediante protocolos de diferenciación, se pueden diferenciar estas células a distintos linajes tales como el neuronal, el astrogial y el mesenquimal. Dada la heterogeneidad inter-tumoral que presentan los GBM, disponer de múltiples líneas de CMG derivadas de pacientes permite evaluar las características celulares distintivas de cada tumor

Las características de las líneas celulares de CMG empleadas en esta tesis fueron publicadas en numerosos trabajos,^{79,236,237} donde se estudiaron su ciclo celular, su capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, su dependencia a factores anti-apoptóticos y su respuesta a drogas quimioterapéuticas.

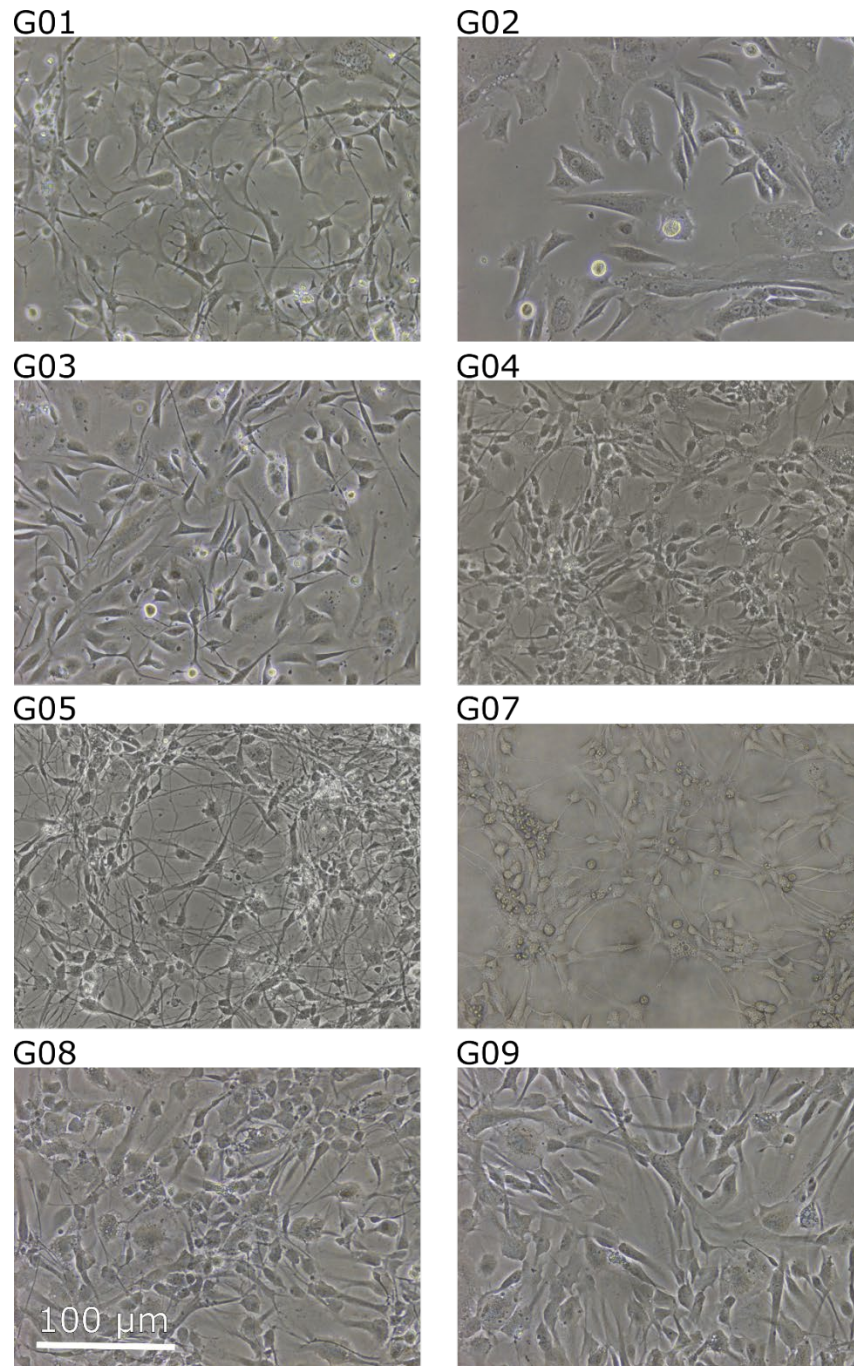
En la Tabla 7 se pueden ver características de las ocho líneas de CMG empleadas en esta tesis y los datos de los pacientes y de los tumores, incluyendo las modificaciones genéticas y epigenéticas presentes en cada una de las muestras. Como se puede observar, existe cierta variabilidad en algunas alteraciones tales como la metilación del promotor del gen de MGMT y el grado de amplificación del gen EGFR, y poca variabilidad en otras, como por ejemplo en la delección de CDKN2.

	Línea CMG	G01	G02	G03	G04	G05	G07	G08	G09
Paciente	Sexo	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>
	Edad	26	61	52	60	52	72	62	59
Localización del tumor		<i>Frontal</i>	<i>Parietal</i>	<i>Temporal</i>	<i>Frontal</i>	<i>Temporal</i>	<i>Temporal</i>	<i>Occipital</i>	<i>Fronto-temporal</i>
Metilación de MGMT		<i>No</i>	<i>Sí</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Mutación de IDH1		<i>R132H</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
Delección	10q	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>
	19q	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>
	1p	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Parcial</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Sí</i>	<i>No</i>
	CDKN 2	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>
Mutación activante de EGFRvIII		<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Sí</i>	<i>Sí</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
Amplificación de EGFR en líneas CMG		<i>No</i>	<i>x3</i>	<i>x4</i>	<i>x18</i>	<i>x44</i>	<i>x4</i>	<i>x20</i>	<i>No</i>

Tabla 7. Tabla de datos de los pacientes y de los tumores correspondientes a las líneas de CMG utilizadas con las modificaciones epigenéticas y genéticas de las líneas derivadas.

En la Figura 10 se presentan fotomicrografías de las ocho líneas de CMG. Un primer análisis permite identificar una gran variación en cuanto a la morfología de las líneas. Además, como

se mencionó previamente, esta variabilidad también se observa en su capacidad para diferenciarse a distintos tejidos y para responder a diferentes estímulos⁷⁹. Por lo tanto, este modelo resulta adecuado para estudiar la capacidad migratoria e invasiva de las CMG, sin dejar de contemplar la posible variabilidad inter-tumoral de estos procesos.



*Figura 10. Microfotografías de las líneas de CMG utilizadas en esta tesis creciendo en adherencia.
Magnificación 200x.*

Migración de CMG en condiciones de normoxia e hipoxia

La migración celular consiste en un abanico de procesos que incluyen cualquier movimiento dirigido. La invasión celular, por su parte, se refiere a una migración que también involucra la penetración de barreras presentes en diferentes tejidos, tales como las membranas basales de los epitelios. Muchas veces, existe una gran superposición entre el uso de los términos migración e invasión e incluso en ocasiones se utilizan indistintamente⁸⁹. Sin embargo, en el campo de la biología celular experimental, estos dos términos tienen definiciones precisas. Migración, se refiere al movimiento de células en un formato de dos dimensiones, sobre sustratos proteicos o plásticos, mientras que invasión se refiere al movimiento de células a través de una matriz tipo MEC en las tres dimensiones. La invasión, para la biología celular, implica la interacción con esta matriz y su remodelación.

En este trabajo, la migración de las líneas de CMG se estudió tanto en condiciones basales (normoxia) como en respuesta a hipoxia. Cabe aclarar que en este proyecto denominamos “normoxia” a la condición de cultivo bajo una concentración de oxígeno ambiental de aproximadamente 20% e “hipoxia” a la de una concentración de oxígeno de 1%.

A la fecha, existen tratamientos para el GBM en los que se tiene como objetivo generar hipoxia, y de esta forma reducir el tamaño tumoral. Sin embargo, como ya se mencionó en la introducción, la hipoxia es un conocido inductor de la migración, tanto en general como en GBM en particular. En estos tumores, la migración inducida por hipoxia induce a que las células tumorales se desplacen a regiones ricas en oxígeno y nutrientes. Entonces, en estos casos, un aumento de la capacidad migratoria en respuesta a hipoxia representaría un mecanismo de escape tumoral por el cual las células tumorales no sólo logran sobrevivir, sino también invadir el parénquima circundante. Por lo tanto, con el fin de establecer tratamientos orientados a combatir este mecanismo de escape, resulta fundamental

estudiar si la hipoxia es capaz de inducir la migración de las CMG. La hipoxia de 1% de oxígeno utilizada en esta tesis es una aproximación experimental a la presión parcial de oxígeno encontrada en focos hipóxicos de GBM.

Existen varios métodos desarrollados para medir la migración y/o la invasión celular²³⁸, pero no todos resultan adecuados para los objetivos de esta tesis y para el modelo utilizado en ella. La elección del ensayo dependerá del tipo celular que será evaluado, ya que distintas células habitualmente muestran diferencias en el tipo de migración que exhiben, en la velocidad de migración, en la adherencia celular y en las interacciones intercelulares particulares. Varios métodos reportados en la literatura, como el método transwell, utilizan quimio-atractantes y, por lo tanto, miden migración en respuesta a un estímulo químico particular. En esta tesis se optaron por ensayos que no dependan de quimio-atractantes. El ensayo de extensión de esfera (o de *cell spreading*, en inglés), de ahora en más referido como ensayo migratorio de esfera, implica formar una esfera de células en suspensión y luego transferirla a una placa recubierta de una matriz con componentes de la MEC (Geltrex), en dónde la esfera se adhiere al fondo de dicha placa y las células comienzan a migrar desde la esfera hacia afuera. El Geltrex es membrana basal extraída de sarcomas murinos Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) y sus principales componentes incluyen laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicanos de sulfato de heparina.

Este ensayo, que no requiere de quimio-atractantes, es útil para líneas celulares que se pueden cultivar en esferas, tales como las líneas de CMG utilizadas en esta tesis, las cuales forman las denominadas “neuroesferas”.

En la Figura 11 se pueden observar los resultados del ensayo migratorio de esfera realizado en cuatro líneas de CMG (G02, G03, G08, y G09) luego de tres días de migración. Es posible observar una elevada variabilidad entre las líneas tanto en la capacidad migratoria como en la apariencia de las esferas. En la línea G03, por ejemplo, las esferas se mantienen con bordes definidos aún después de tres días, mientras que en la línea G08, que exhibe una mayor capacidad migratoria basal, se observan bordes mucho más difusos.

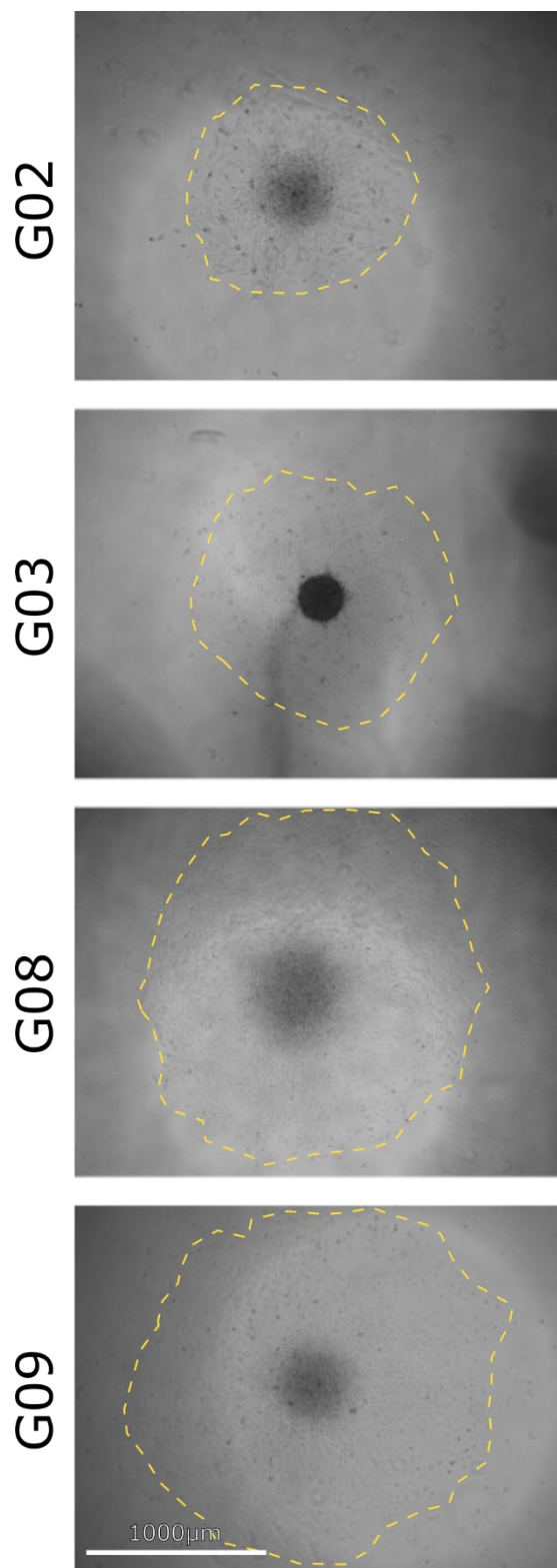


Figura 11. Fotomicrografías del ensayo migratorio de esfera luego de 72 horas de migración. Fotos tomadas con 40x de magnificación. La línea amarilla marca el borde de la migración celular. La barra mide 1000 μm .

Para evaluar la capacidad migratoria de todas las líneas de CMG utilizadas en esta tesis (G01, G02, G03, G04, G05, G07, G08 G09), se realizó este ensayo migratorio de esfera tanto en condiciones basales (normoxia) como en respuesta a hipoxia. Las esferas se cultivaron en adherencia durante 72 horas en ambas condiciones y luego se midió el área que ocupaban las células producto de su migración correspondiente.

Como se puede observar en la Figura 12, existe una elevada variabilidad entre líneas, no solamente en cuanto a su migración basal (en normoxia) sino también en la migración en respuesta a hipoxia. Analizando la migración en normoxia (azul), encontramos que la diferencia entre las líneas de menor y de mayor capacidad migratoria (G03 y G09 respectivamente) es de aproximadamente 5 veces. Esta variabilidad observada se encuentra en línea con la marcada heterogeneidad inter-tumoral que pueden presentar estos tumores.

En cuanto a la respuesta a la hipoxia (rojo), se observa que el efecto de la baja tensión de oxígeno sobre la migración tiene un efecto que depende de la línea de CMG analizada. Una prueba de dos factores de ANOVA, que evalúa la variación de la migración dada tanto por hipoxia como por línea de CMG, reveló que ambos factores tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la migración. También, se halló que la interacción entre ambos factores es significativa; es decir, que el efecto de hipoxia sobre la migración depende de la migración basal de cada línea CMG. En este sentido, y como se detalla a continuación, observamos que las líneas que mostraron una mayor capacidad migratoria basal fueron las que bajo condiciones de hipoxia, la aumentaron aún más. Por ejemplo, una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$) entre líneas en normoxia muestra que las líneas G02, G03 y G04 migran significativamente menos que el resto de las líneas de CMG evaluadas. Por otra parte, al evaluar el efecto de hipoxia sobre la migración, observamos que la hipoxia aumenta significativamente ($p < 0.05$) la migración celular sólo en las líneas G01, G07, G08 y G09, que coinciden con las líneas de mayor migración basal. Este es el resultado esperado basado en la literatura, el cual indica que la hipoxia sería un inductor de la migración y la invasión celular. Llamativamente, en la línea G05 se observa el comportamiento opuesto, en donde la hipoxia conlleva una disminución significativa de la

capacidad migratoria. Y si bien en las líneas G02 y G03 se observa una tendencia a disminuir la migración con hipoxia, esta no resultó significativa en ningún caso.

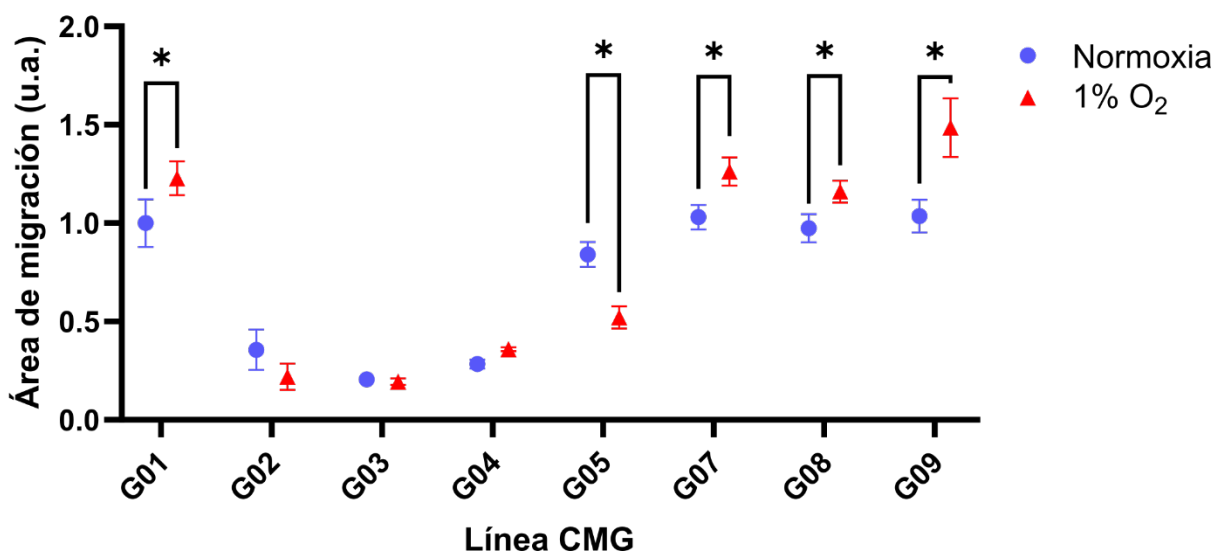


Figura 12. Área migratoria en unidades arbitrarias del ensayo migratorio de esfera de ocho líneas de CMG en normoxia y en 1% O₂ (hipoxia) a 72h de migración. Barras indican desvío estándar. Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Sidak con $p < 0,05$. Todos los puntos corresponden al promedio de tres replicas.

Con el fin de dilucidar si la tendencia observada en la migración de las líneas G02 y G03 en respuesta a hipoxia corresponde o no a una disminución verdadera, se repitió el ensayo, pero dejando migrar a las células por 96 horas. Como se puede ver en la Figura 13, bajo estas condiciones experimentales, la hipoxia induce una disminución significativa en la migración en la línea G02, pero no en la línea G03. La disminución observada en la línea G02, y en la línea G05, es sumamente interesante ya que no coincide con trabajos publicados sobre el efecto de hipoxia en GBM, en donde de acuerdo a nuestro conocimiento, sólo se la describe como inductora de migración^{209,210,213}. Sin embargo, hay que mencionar que existen trabajos

que describen que las condiciones de hipoxia son capaces de inhibir la migración de otros tipos celulares, como monocitos y sus células derivadas^{239–241}.

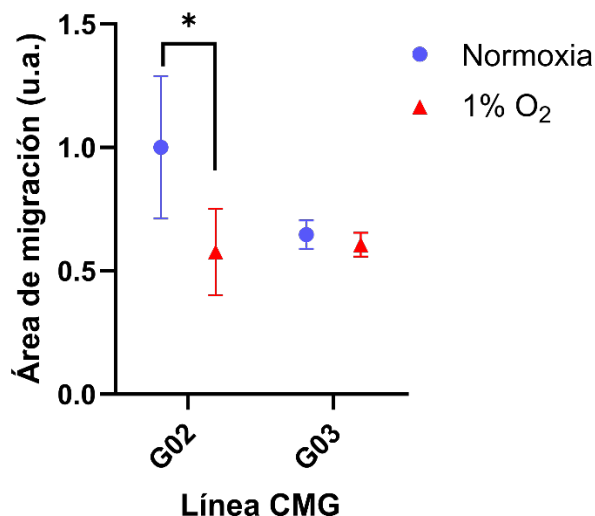


Figura 13. Área migratoria en unidades arbitrarias del ensayo migratorio de esfera de G02 y G03 en normoxia y en 1% O₂ (hipoxia) a 96h de migración. Las barras indican desvío estándar. Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Sidak con $p < 0,05$. Todos los puntos corresponden al promedio de tres replicas.

Luego de caracterizada la capacidad migratoria de las ocho líneas de CMG, se seleccionaron cuatro de ellas para profundizar el análisis. Se eligieron dos líneas de CMG de baja migración basal y que no muestren aumentos de migración en hipoxia (G02 y G03), y dos líneas de CMG de alta migración basal y que además muestran un aumento de la migración en hipoxia (G08 y G09). En estas cuatro líneas, se evaluó nuevamente la migración, pero en este caso empleando los denominados ensayos de herida.

Los ensayos de herida son utilizados con frecuencia para analizar la migración celular en células cultivadas en monocapa. Para realizar este ensayo se genera una herida, la cual corresponde a una sección de la monocapa en donde se levantan las células, habitualmente con la punta de un *tip*, y luego se mide como esta sección se cierra a medida que las células migran y rellenan la herida. Existen variaciones en donde la herida puede formarse *a priori*, impidiendo, por ejemplo, la adhesión de las células en una zona de la

placa mediante, un gel que luego se retira. En estos casos las células buscan llenar la superficie vacía y migran hasta lograrlo.

Estos ensayos no dependen del uso de quimio-atractantes y son técnicamente fáciles de realizar. Originalmente, esta técnica fue desarrollada para ser usada directamente sobre el plástico de las placas de cultivo, es decir, en ausencia de proteínas de la matriz extracelular. Dada la inhabilidad de las líneas de CMG para adherirse directamente al plástico, el ensayo de herida requiere ser adaptado para poder implementarlo con este tipo de células. En estos casos, al realizar las heridas en células en monocapa, adheridas a proteínas de matriz, no sólo se desprenden las células adheridas, sino que también se remueven las proteínas de matriz que estaban adheridas al plástico. Esto imposibilita luego el cierre de la herida ya que las CMG no migrarán ni se mantendrán adheridas a secciones de la placa que no estén cubiertas con estas proteínas de matriz. Entonces, para solucionar esto desarrollamos un protocolo (descrito en detalle en Materiales y Métodos) en donde luego de generar la herida, se vuelve a tratar la placa con Geltrex. Así, al agregar este paso las células pueden migrar hacia la zona de la herida y cubrirla. Por los tiempos del ensayo es importante considerar que las células no solo migran hacia la brecha, para cerrar la herida, sino que también proliferan por lo tanto se utilizaron las líneas en pasajes con tasas de proliferación (*doubling time*) similares.

En la Figura 14 se presentan los resultados del ensayo de herida luego de 72 horas de cultivo tras haber generado la herida. Se puede observar que todas las líneas de CMG muestran la capacidad de cerrar parcialmente la herida, pero que la línea G08 logra cerrarla completamente. En el otro extremo, la línea G02 no logra cubrir el 50% de la herida.

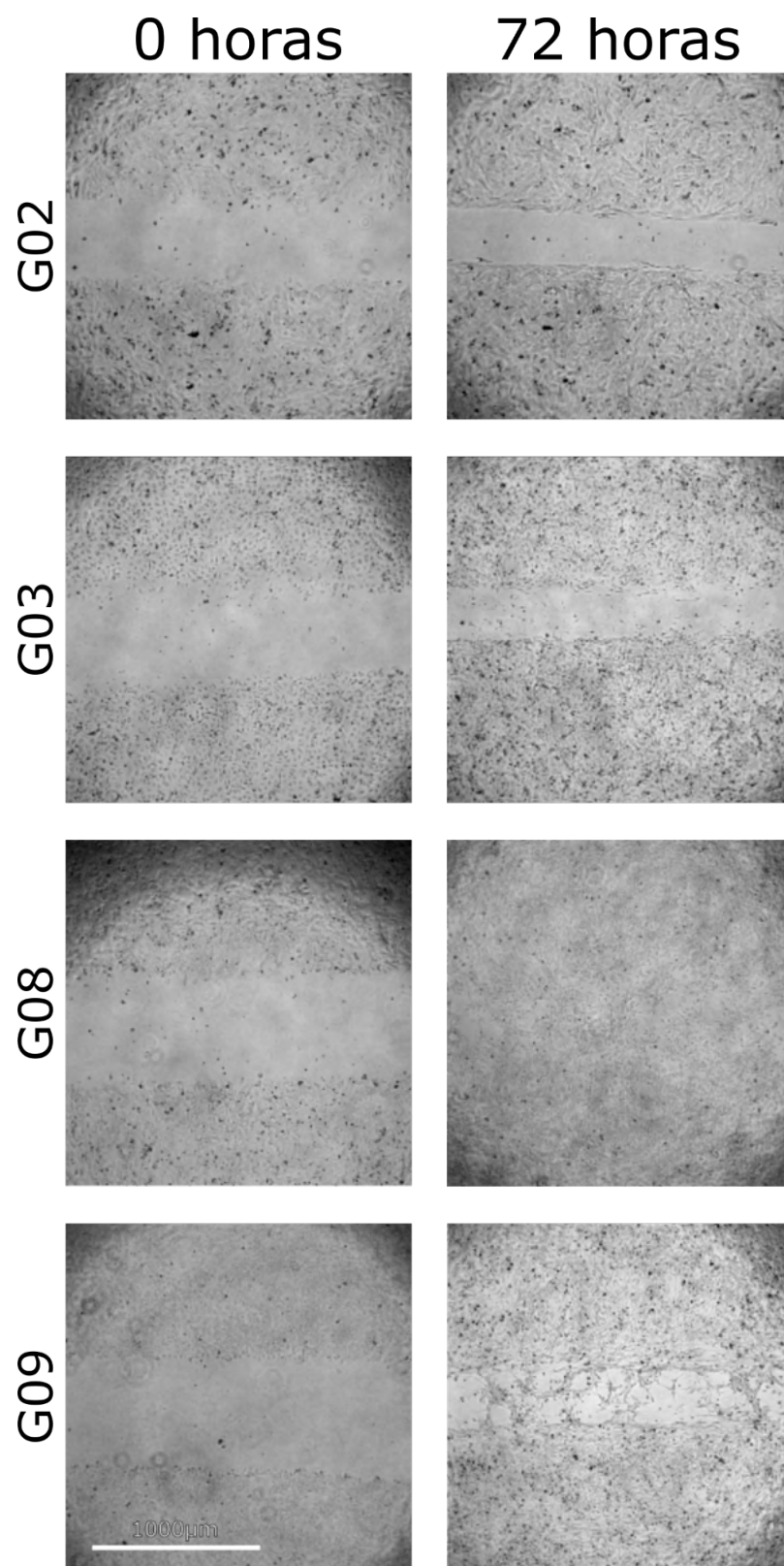


Figura 14. Microfotografías del ensayo de herida a 0 horas y a 72 horas de migración. Fotos tomadas con 40x de magnificación. La barra mide 1000 μm .

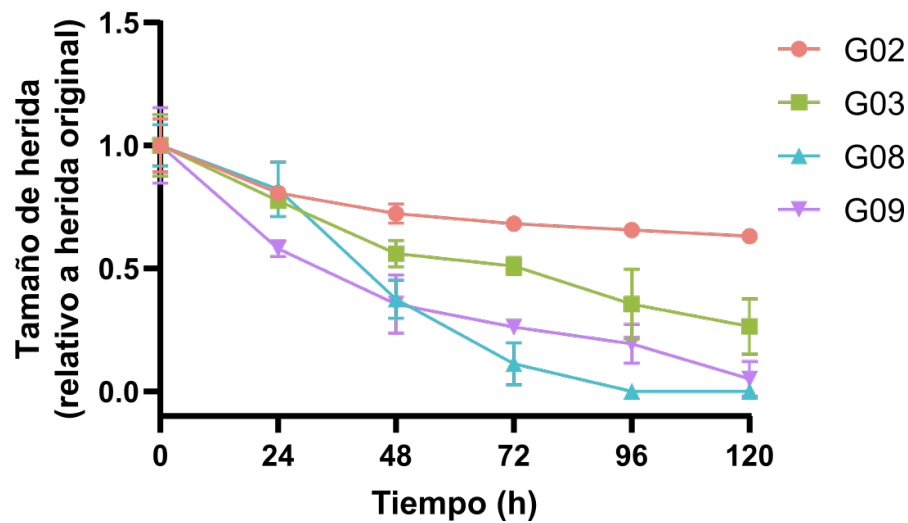


Figura 15. Área de herida en cuatro líneas de CMG a lo largo del tiempo en normoxia. Todos los puntos corresponden al promedio de tres réplicas.

Para cuantificar las diferencias entre líneas, se midió el cierre de la herida a lo largo del tiempo cada 24 horas hasta alcanzar las 120 horas (Figura 15). Al observar la velocidad de cierre de la herida se puede notar que las líneas G08 y G09 muestran las mayores velocidades de migración y que la línea G02 muestra la menor velocidad. En una primera aproximación, se estimó el tiempo necesario para cerrar el 50 % de la herida, empleando un modelo de regresión lineal. En la Tabla 8 se presentan los tiempos estimados con sus respectivos intervalos de confianza. Se puede observar que las líneas G08 y G09 cierran la herida en menos tiempo, la línea G03 tarda más que estas líneas, pero la línea G02 es sin duda la línea que más tarda en cerrar la herida y tarda más que el doble que las líneas G08 y G09 (113 horas versus 45 horas o 48 horas). Hay que considerar el efecto de proliferación sobre estos resultados, por más que se elijan pasajes con tasas proliferativas parecidas es posible que a tiempos largos estas diferencias tengan un efecto sobre lo observado.

Línea CMG	Tiempo para cerrar 50% de la herida	IC 95% límite inferior	IC 95% límite superior
--------------	--	---------------------------	---------------------------

G02	134h	113h	166h
G03	75h	67h	85h
G08	50h	45h	58h
G09	55h	48h	66h

Tabla 8. Tiempos en horas estimadas para cerrar 50% de herida en base a un ajuste lineal para cada línea de CMG con los límites del intervalo de confianza (IC) 95% para cada valor.

En la Figura 16 se graficó el tamaño de la herida a las 72 horas de migración post producción herida, tanto en normoxia como en hipoxia. Cabe aclarar que no se puede realizar una curva de tiempo del cierre de la herida en hipoxia, ya que, para no interrumpir dicha hipoxia, las células no pueden ser retiradas de la incubadora a distintos tiempos durante el ensayo. Por lo tanto, se eligió evaluar el tamaño de herida solamente a las 72 horas de ser generada.

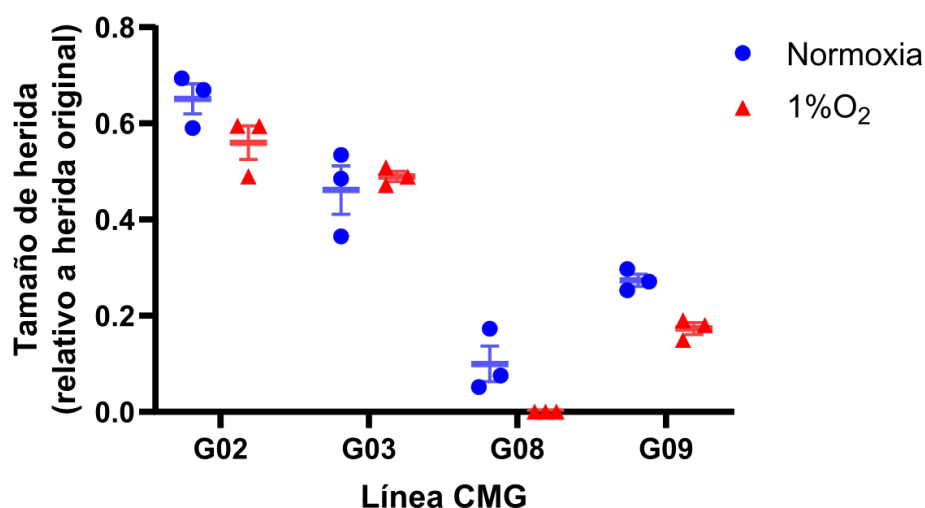


Figura 16. Área de herida en cuatro líneas de CMG a 72hs de tratamiento en normoxia e hipoxia (1% O₂). Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. No hubo diferencias significativas según una prueba de comparaciones múltiples de Sidak con $p < 0,05$.

Bajo las condiciones de hipoxia, se observó que las líneas G08 y G09 muestran una tendencia a aumentar su capacidad migratoria respecto a lo observado en normoxia. Al aplicar una prueba de ANOVA de dos factores (línea de CMG y tratamiento) se observa que

la línea celular y el tratamiento con hipoxia tiene un efecto significativo sobre el cierre de herida. Aun así, al realizar una prueba de comparaciones múltiples de Sidak ($p < 0,05$) en ninguna línea de CMG se llega a determinar una diferencia significativa con hipoxia.

Se puede observar que, en hipoxia, la línea G08 terminó de cerrar las heridas antes de las 72 horas, saturando la medición. Por este motivo, el ensayo se evaluó también a las 48 horas, donde efectivamente se observaron diferencias significativas entre normoxia e hipoxia.

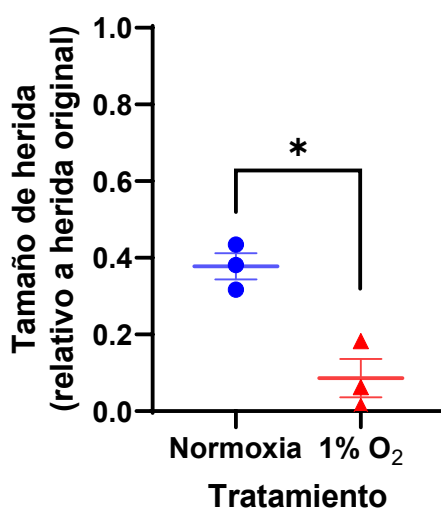


Figura 17. Área de herida en G08 a 48hs de tratamiento en normoxia e hipoxia (1% O₂). Se realizó prueba de T de Student con $p < 0,05$. El asterisco indica diferencias significativas.

Aunque el ensayo migratorio de esfera y el ensayo de herida son ensayos en dónde se evalúa cómo las células migran adheridas a plástico recubierto de Geltrex, existen ciertas diferencias entre ambos. En el ensayo de esfera, las células tienen que adherirse inicialmente al Geltrex, y desarmar sus uniones con otras células. En cambio, en el ensayo de herida, las células ya se encuentran adheridas al Geltrex, y tienen una menor adhesión célula-célula. Otra diferencia clave es que, en cada uno de estos ensayos, hay distintas señales en el microambiente. En el caso de la esfera hay células en el centro de la esfera que tienen un microambiente muy particular y diferente al que tienen las de la superficie (periferia) de la esfera. Incluso en esferas relativamente pequeñas se producen gradientes

de nutrientes y de oxígeno que pueden influir sobre el comportamiento de las células²⁴². Por último, en el caso del ensayo de herida, cuando se genera la herida, se produce una injuria sobre parte de las células. Estas, al morir, liberan sustancias que pueden tener efectos paracrinos sobre las células viables vecinas.

En conjunto, estos resultados, en línea con los obtenidos en ensayos migratorios de esferas, indican que las líneas G02 y G03 exhiben una menor capacidad migratoria basal que las líneas G08 y G09 y, que, bajo condiciones de hipoxia, sólo parece aumentar la migración de las líneas G08 y G09.

Invasión en condiciones basales (normoxia) y de hipoxia

Como se mencionó anteriormente, la invasión, en el contexto de la biología celular experimental, se refiere a un proceso distinto a la migración. La invasión implica el movimiento de células dentro de una matriz, por lo tanto, incluye la habilidad de modificar esta matriz. Es fundamental estudiar este aspecto porque muchos procesos de invasión *in vivo* también implican la remodelación de la MEC. Para evaluar la invasión celular se encuentran muchas de las mismas dificultades experimentales descritas para los ensayos de migración. En este caso, nuevamente se eligió un método que no dependiera del uso de quimio-atractantes.

El ensayo migratorio de esfera se puede adaptar fácilmente a un ensayo de invasión (ensayo invasivo de esfera) si previamente se embebe la esfera en una matriz de proteínas que luego gelifica inmediatamente. En esta matriz, las células necesitan poder degradar la MEC para lograr desplazarse. Así, se puede evaluar como células se alejan de la esfera, pero en este caso en tres dimensiones dentro del gel. En la Figura 18 es posible observar las diferencias en la capacidad invasiva de las líneas G02, G03, G08 y G09. Nótese que las líneas G02 y G09 han invadido mucho menos al gel en comparación con las líneas G03 y G08.

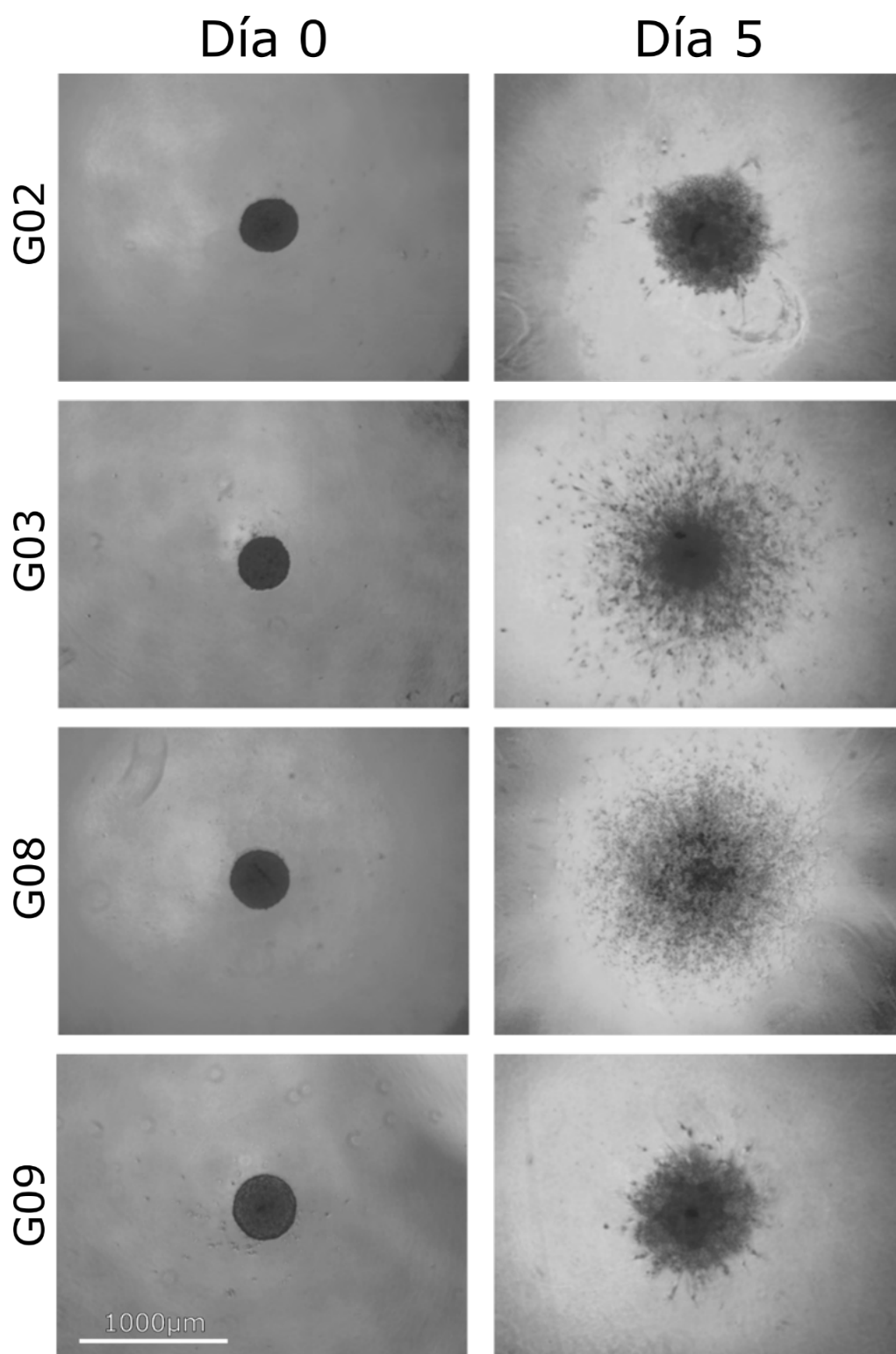


Figura 18. Fotomicrografías del ensayo invasivo de esfera a día cero y a día cinco con magnificación 40x para las cuatro líneas de CMG. La barra mide 1000 μm .

Los resultados cuantitativos del estudio de invasión se presentan en la Figura 19. En la línea G02 se observa una baja capacidad invasiva, coherente con la baja tasa de migración que muestran estas células. En cambio, en la línea G03, a pesar de mostrar una muy baja migración basal, se observa la capacidad invasiva basal más elevada de las cuatro líneas. La sigue la línea G08 y luego la línea G09, con una capacidad invasiva levemente superior a la de la línea G02. El comportamiento de las líneas G03 y G09 es sin duda llamativo ya que, en condiciones basales, la línea G09 es capaz de migrar 5 veces más que la línea G03 y en invasión, la línea G03 invade 4 veces más invasiva que la línea G09. Este notable fenómeno resalta la diferencia entre los procesos de migración e invasión.

Es importante destacar que los resultados de migración/invasión obtenidos no permiten concluir que la línea G03 tenga una baja capacidad innata para migrar y una alta capacidad para invadir. Se debe considerar que los ensayos, al someter a las esferas a microambientes distintos, pueden estar induciendo respuestas diferentes. El microambiente en el ensayo de invasión es distinto al microambiente en los ensayos de migración en varios aspectos. El Geltrex gelificado puede afectar la llegada de nutrientes a la esfera, generando señales de migración/invasión por la falta de nutrientes. Otro efecto importante es la rigidez del microambiente. Se ha reportado que la rigidez del entorno tiene efectos sobre el fenotipo celular. Incluso, se ha publicado que una mayor rigidez en el microambiente, induce la migración en líneas de GBM²⁴³. Más aun, se ha reportado que células de diferentes gliomas primarios difieren en sus preferencias para migrar sobre un sustrato, siendo algunas dependientes y otras independientes de la rigidez de éste²⁴³. En la matriz gelificada existe una rigidez mucho mayor a la de los ensayos de migración, aunque es menor que la rigidez de los tejidos del cerebro²⁴³. Es posible entonces que la mayor capacidad invasiva observada en G03 en este ensayo se deba a que en estas células, la matriz gelificada dispare señales que promuevan conjuntamente la migración y la invasión celular. Nuevamente, estos resultados vuelven a reflejar la notable heterogeneidad entre CMG provenientes de diferentes pacientes.

En cuanto a la respuesta a hipoxia, se observa que solamente algunas líneas presentaron cambios en esta condición. En las líneas G08 y G09 se observa que la invasión aumenta con

la hipoxia, pero en las líneas G02 y G03 no hay diferencias significativas. Este resultado concuerda con los resultados de migración dónde se halló un patrón similar. Si bien con hipoxia no se observó disminución de invasión en G02 (como si se observó en ensayos de migración de esferas), no descartamos que esto pueda observarse si se extiende el tiempo del ensayo. Cabe mencionar que extender durante periodos prolongados las condiciones de hipoxia es dificultoso puesto que, al realizar los cambios de medio de cultivo necesarios, la hipoxia es interrumpida.

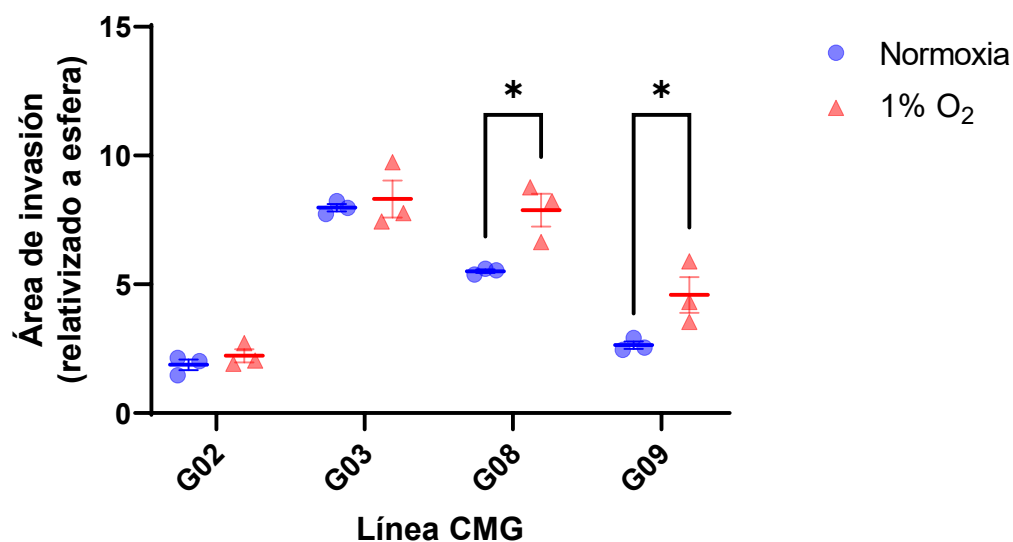


Figura 19. Invasión mediante ensayo de esfera en gel en cuatro líneas de CMG en normoxia e hipoxia (1% de O₂). Área de invasión medida después de 96h de invasión. Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Sidak con $p < 0,05$.

Adhesión en líneas de CMG

La capacidad de adherirse a la MEC es una característica fundamental en la migración e invasión. Una muy baja adherencia no permite que la célula traccione sobre la MEC, pero una adherencia muy elevada también puede inhibir la migración, ya que no permitirá que la célula se libere y por lo tanto no podrá desplazarse²⁴⁴. Por lo tanto, la mayor movilidad

celular se va a obtener con un equilibrio dinámico entre la capacidad de adherirse y la capacidad de desprenderse.

Para evaluar la capacidad de las CMG para adherirse, se realizaron dos tipos de ensayos. Uno de ellos, consiste en evaluar que tan rápidamente se adhieren las células a un sustrato de proteínas de la MEC. En este ensayo se introducen células en suspensión sobre un sustrato tratado con Geltrex y se evalúa en el tiempo la proporción de células que se van adheriendo. En la Figura 20A se observa la proporción de células adheridas de cada línea de CMG a lo largo del tiempo. La comparación de la adherencia entre las distintas líneas se realizó a los 10 minutos de sembrarse las células (Figura 20B). En este caso, se puede observar que la línea G03 logra la mayor proporción de células adheridas, mientras que la línea G09 exhibe la más baja. Mediante un ANOVA de un factor se determinó, con una confianza de 95%, que había efecto de la línea celular sobre la adhesión, es decir que la adhesión varía entre las distintas líneas de CMG, y, al hacer una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, se observa que la línea G03 mostró significativamente más proporción de células adheridas a los 10 minutos que la línea G09. Esta mayor adherencia observada en la línea G03 se puede deber a una mayor expresión de proteínas de adhesión, o a una producción propia de elementos de la MEC que lleva a una adhesión más rápida.

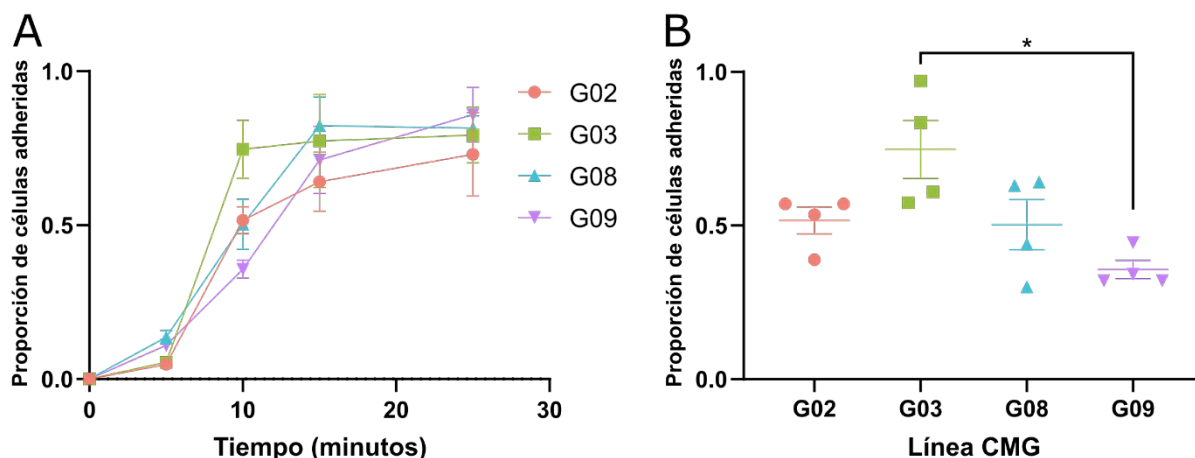


Figura 20. Ensayo de adherencia de distintas líneas de CMG. (A) Proporción de células adheridas a la placa con MEC en el tiempo después de su introducción a la placa tratada. (B) Proporción de células de células adheridas a la placa con MEC después a los 10 minutos. Se realizó un ANOVA de un factor donde se vio que la línea celular era un factor significativo para la adhesión, asterisco indica diferencia significativa según comparación múltiple de Tukey.

Otro tipo de ensayo de adhesión permite estudiar que tan rápido se desprenden las células de la MEC en presencia de enzimas de degradación de colágeno (Accutase). En la Figura 21 se observa que las líneas G08 y G09 tienen tasas de desprendimiento similares. Por otro lado, G02 es la línea con la tasa de desprendimiento más lenta. Se realizó un ANOVA de un factor y se observó que existe una variabilidad significativa entre las distintas líneas de CMG en este aspecto. Además, a los 4 minutos de tratamiento con la enzima hay significativamente más ($p < 0.05$) células G02 adheridas comparando con las líneas G08 o G09 (Figura 21B). En cuanto a la línea G03, muestra un comportamiento intermedio entre la línea G02 y las otras líneas de CMG (Figura 20B).

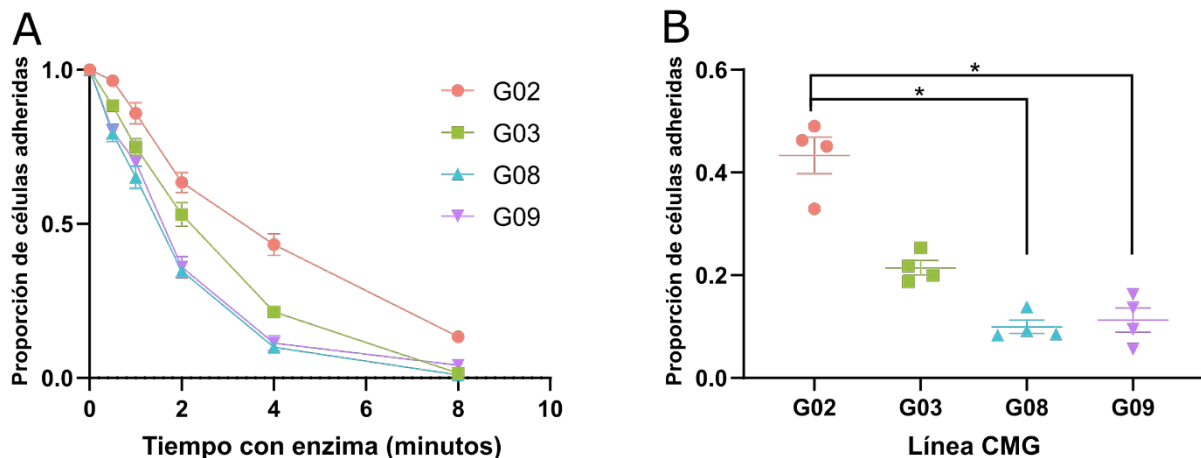


Figura 21. Ensayo de adherencia de distintas líneas de CMG. (A) Proporción de células adheridas en el tiempo durante tratamiento con enzimas de degradación de MEC. (B) Proporción de células adheridas luego de 4 minutos con enzimas de degradación de MEC. Se realizó un ANOVA de un factor donde se vio que la línea celular era un factor significativo para la adhesión, asterisco indica diferencia significativa según comparación múltiple de Tukey.

La línea G02 tarda más en desprenderse que las líneas G08 y G09, esto se puede deber a múltiples factores, entre ellos, uniones más fuertes o abundancia de uniones que no involucren al colágeno. Por sí solo este ensayo indica poco, pero sugiere que la dificultad de estas células para migrar podría deberse a una adherencia “demasiado” elevada.

Aun así, hay que tener ciertas consideraciones con estos ensayos. Por ejemplo, la velocidad de adhesión, no indica necesariamente la fuerza de adhesión. En cuanto al ensayo con enzimas de degradación de la MEC, en este ensayo se utilizó Accutase, una mezcla de proteasas y colagenolíticos particular. Es posible que diferentes líneas de CMG tengan uniones dependientes de distintas proteínas y que por lo tanto las enzimas Accutase tengan distinto efecto sobre ellas. Es decir que con otro conjunto de enzimas las distintas líneas de CMG sean más o menos susceptibles. Para confirmar esto se requeriría hacer más ensayos con distintas proteasas para confirmar, por ejemplo, si la línea G02 tiene uniones más fuertes o si estas son más resistentes a las enzimas de Accutase.

Viabilidad de líneas de CMG en normoxia e hipoxia

Para poder comprender los resultados de migración e invasión es importante tener en cuenta cómo se encuentran afectados otros factores de estas células tales como la viabilidad celular. En la Figura 22 se puede ver la muerte celular basal de las líneas y la muerte celular en respuesta a hipoxia.

Como se puede ver, la hipoxia no afecta significativamente a la viabilidad de las líneas de CMG en los tiempos experimentales utilizados. Este resultado arroja confianza sobre las observaciones realizadas en los experimentos de migración e invasión puesto que no se encontraron cambios en la mortalidad tal que generen cambios significativos en la cantidad final de células. G09 es la línea que presentó mayor inducción de muerte con hipoxia, sin embargo, esto no es un cambio significativo y, además, la línea G09 migra más con hipoxia. G02 es la línea con mayor muerte basal y se podría pensar que esto podría estar influenciando sobre algunos resultados, ya que a menor cantidad de células se vería menor células migrando. Aun así, esta alta mortalidad no explicaría la baja migración e invasión ya que las diferencias en mortalidad con las otras líneas son más pequeñas que las diferencias en migración.

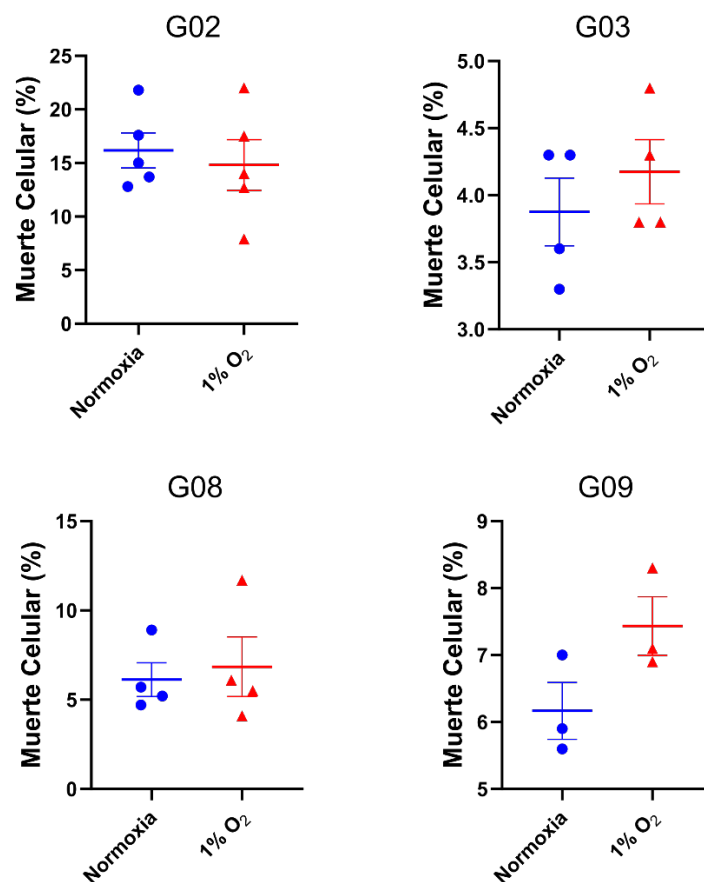


Figura 22. Muerte celular en cuatro líneas de CMG en condiciones basales (normoxia) y 72h de 1%O₂ (hipoxia). Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. No hubo diferencias significativas entre normoxia y 1% O₂ en ninguna línea.

Conclusiones del capítulo

En este capítulo se presentaron los resultados del estudio de la migración de las líneas de CMG empleando dos métodos de migración y uno de invasión. Tanto en la migración como en la invasión se encontró una elevada variabilidad entre las líneas de CMG. Esta heterogeneidad en el comportamiento concuerda con lo reportado en la literatura. Aun así, es interesante analizar las diferencias puntuales en cuanto a la migración basal. Notablemente, se encontró concordancia entre los resultados de ensayos de adherencia y

los ensayos de migración, sugiriendo que las diferencias entre las capacidades de migración en condiciones basales podrían deberse a diferencias en la adherencia.

En cuanto a la hipoxia se encontraron resultados que de alguna manera amplían lo reportado. En la literatura se postula que la hipoxia es un estímulo para la migración e invasión. Y si bien esto lo observamos en varias líneas, incluyendo las líneas G08 y G09, llamativamente, la línea G02 se comportó de manera opuesta, al menos en la migración.

Al comparar los ensayos de migración, no se observaron los mismos patrones de migración, particularmente en lo que es la respuesta a hipoxia. Es importante comparar estos métodos teniendo en cuenta sus limitaciones y que cada ensayo tiene ventajas y desventajas. Es por esto por lo que no es inesplicable ver diferencias entre estos ensayos, cada ensayo genera un microambiente distinto que puede influir sobre las respuestas medidas. A pesar de las diferencias, las tendencias observadas en las líneas CMG entre ensayos eran parecidas, mostrando que las líneas G08 y G09 son las que exhiben mayor capacidad migratoria la cual se ve aumentada aún más en hipoxia. Estas consideraciones resaltan la importancia de usar varios ensayos distintos *in vitro*. Otro resultado relevante consistió en que no se observó una correspondencia entre la capacidad de migración y la de invasión que presentan cada una de las distintas CMG. No queda claro aún si esto se debe a diferencias intrínsecas entre las capacidades de las líneas para migrar e invadir, o a diferencias en las respuestas a los microambientes particulares generados puntualmente en estos ensayos.

En conclusión, se observa en los resultados que hay heterogeneidad en el comportamiento celular en cuanto la migración e invasión entre las líneas de CMG y que también hay heterogeneidad en la respuesta a hipoxia en estas líneas. Además, en base a las diferencias vistas entre ensayos, donde lo que cambia principalmente es el microambiente, podemos concluir que las líneas de CMG responden en forma distinta a distintos microambientes.

Secuenciación masiva de ARN bajo concentraciones de 20% y 1% de oxígeno

Con el objetivo de poder analizar el transcriptoma de las líneas de CMG en normoxia e hipoxia, se secuenció el ARN de cuatro líneas derivadas de pacientes: G02, G03, G08 y G09 en ambas condiciones. Para ello, las líneas se incubaron en condiciones de normoxia o en hipoxia (1 % O₂) durante 96 horas y luego se realizó una extracción de ARN, el que luego se envió a secuenciar con los parámetros mencionados en Materiales y Métodos. Antes de la secuenciación se realizó un control de calidad en las muestras y sólo se continuó con las muestras que mostraron elevada calidad, descartando por esto a las muestras G08 N3 y G02 H3. Luego, se secuenciaron las muestras, haciendo una secuenciación con lecturas de 101 pares de bases y alineando al genoma humano GRCh37 como secuencia de referencia humana. Como resultado de la alineación se obtuvo la cantidad de lecturas por gen por un millón de lecturas totales (CPM).

Análisis global de la secuenciación de ARN

Para comenzar el análisis, se realizó un análisis de *clustering* no supervisado de las muestras. Estos análisis se basan en agrupar muestras en base a su similitud. Para el análisis de *clustering* no supervisado se realizó un análisis conocido como MDS (por sus siglas en inglés *multi dimensional scaling*) o de escalado multidimensional. Este análisis permite comparar la similitud de las muestras en base a la expresión de genes (cuentas por millón de lecturas). El método reduce el número de dimensiones para poder visualizar la semejanza de las muestras en pocos ejes. Las distancias entre los puntos representan la inversa de la similitud entre muestras; es decir, muestras más similares en su expresión

génica presentarán puntos más cercanos en el gráfico. Cada dimensión es un eje abstracto que permite representar gráficamente las similitudes o diferencias entre las muestras.

Como puede verse en la Figura 23A, la variabilidad dentro de cada línea celular (o variabilidad intra-línea celular) es menor que la variabilidad entre líneas celulares. Esto es así, pues las muestras se encuentran agrupadas por línea celular en la primera dimensión (dimensión 1) que es la dimensión que representa la mayor cantidad de variabilidad entre las muestras (39% de la varianza). En otras palabras, la mayor variabilidad observada entre las muestras se debe a la variabilidad entre líneas celulares. En la dimensión 2, que representa el 22% de la varianza entre muestras, las líneas G08 y G09 se agrupan juntas, mientras que las líneas G03 y G02 se ubican de manera individual. Además, en esta dimensión, las muestras de G02 de normoxia e hipoxia se separan en forma clara. Esto es interesante, ya que indicaría que la hipoxia genera un gran cambio transcriptómico en la línea G02, al punto tal que las líneas G08 y G09 se parecen más entre sí de lo que se parecen la línea G02 en normoxia y la línea G02 en hipoxia. La separación entre normoxia e hipoxia comienza a ser evidente en el resto de las líneas (G03, G08, y G09) recién en la dimensión 4. En esta dimensión se observa mayor separación entre muestras según el tratamiento, aunque las muestras siguen agrupándose por línea antes de que por tratamiento. Esto es esperable dada la elevada heterogeneidad inter-tumoral propia de los GBM, que se refleja directamente en la heterogeneidad entre las líneas de CMG^{245–247}.

El hecho de que las líneas G08 y G09 tengan una transcriptómica más parecida entre ellas respecto de las otras líneas, refleja lo observado en los ensayos de migración, en dónde se observaron capacidades migratorias similares en ambas líneas. Sin embargo, a pesar de que los transcriptomas de la línea G02 en normoxia y de la línea G02 en hipoxia resultaron muy diferentes (Figura 1A), no se observaron grandes cambios en la capacidad migratoria de esta línea en dichas condiciones experimentales.

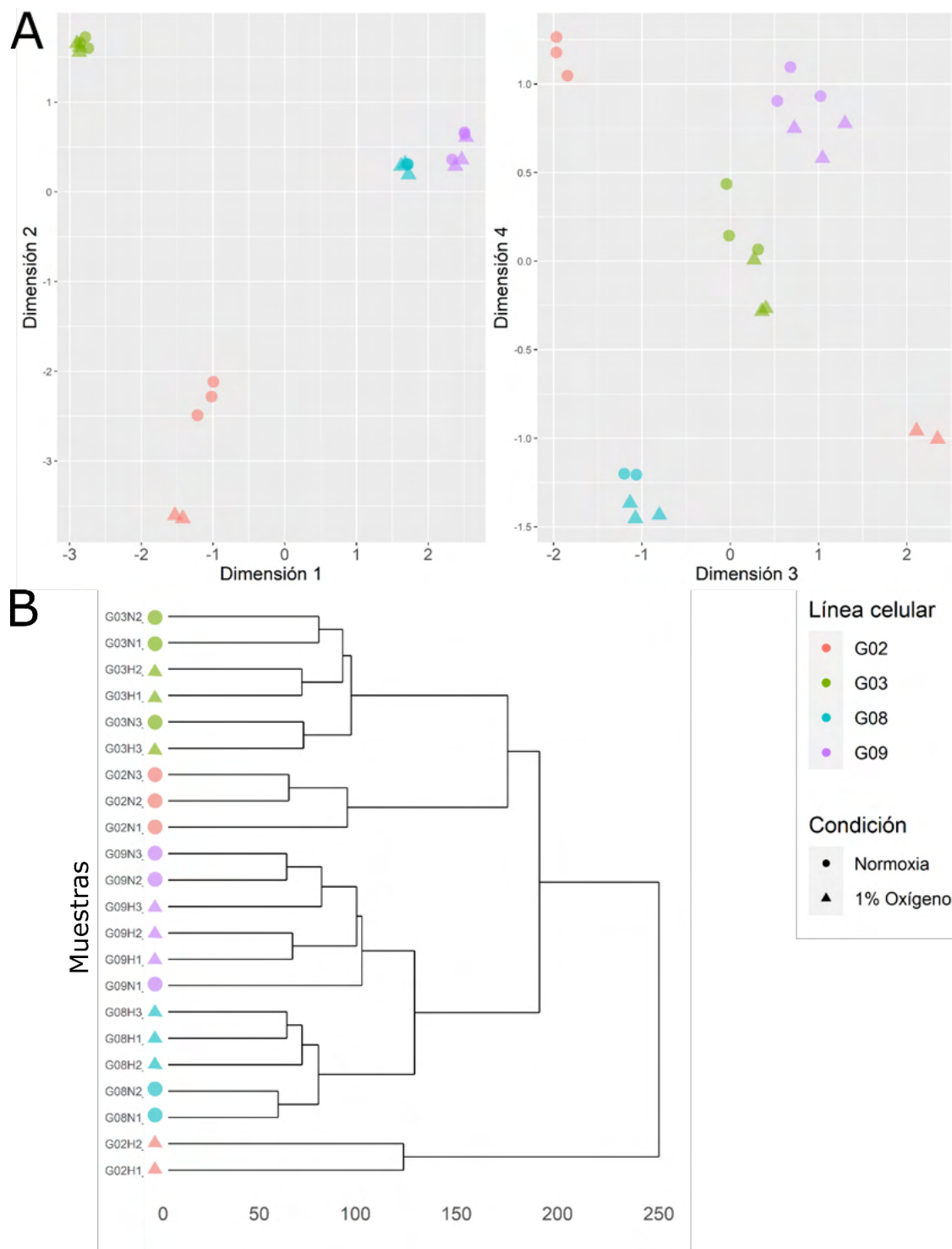


Figura 23. Análisis de clustering no supervisado. (A) Clustering no jerarquizado MDS mostrando Dimensión 1 vs Dimensión 2 y Dimensión 3 vs Dimensión 4. (B) árbol de clustering jerarquizado utilizando hclust.

Luego, sobre las muestras se realizó un análisis de *clustering* no supervisado jerarquizado. Estos métodos generan un árbol jerárquico que define relaciones entre las muestras (Figura 23C). Al igual que en el análisis de MDS, puede verse que en los casos de las líneas G03, G08 y G09, las muestras se agrupan según la línea celular. Incluso, en las líneas G03 y G09 las muestras de ambas condiciones (normoxia e hipoxia) se encuentran entremezcladas. En la línea G02, en cambio, las muestras se agrupan según las condiciones experimentales de normoxia e hipoxia. De hecho, las muestras de G02 en hipoxia se separan de todas las demás, incluso de la línea G02 en normoxia, indicando que tienen un transcriptoma particular, muy diferente al resto de las CMG estudiadas. Esto último es coherente con lo que se observó en el análisis de MDS (Figura 23A). Notablemente, en este análisis jerárquico, las líneas G08 y G09 se parecen más entre sí y la línea G03 se asemeja más a las muestras de normoxia de la línea G02. Esto resulta relevante, ya que el resultado coincide con lo observado en respecto a la capacidad migratoria basal de las líneas (Figura 12).

Continuando con el análisis, se realizó un estudio de *clustering* de las muestras y de los genes en base a la cantidad de lecturas en cada gen. En la Figura 24, en el eje horizontal, puede verse un agrupamiento de muestras muy similar al observado en la Figura 23. Las muestras de las líneas G08 y G09 nuevamente se encuentran agrupadas, lo que confirma su similitud transcriptómica. A su vez, la línea G02 en hipoxia, se diferencia notablemente del resto de las muestras. En el caso de la línea G02 en normoxia, en este análisis, se encuentran agrupadas con las muestras de las líneas G08 y G09 y no con las de la línea G03, como en la Figura 23. En la Figura 24, en el eje vertical se observan los agrupamientos de genes según los niveles de expresión en cada muestra. La línea G02, en comparación al resto de las líneas, presentó niveles de expresión más extremos, tanto para los genes de alta expresión, como para los de baja expresión. Esto es evidente al observar los valores de z-score de la línea G02 en hipoxia y concuerda con el patrón observado para la línea G02 en hipoxia en los otros análisis de *clustering*, en dónde también presentó grandes diferencias respecto de las otras muestras.

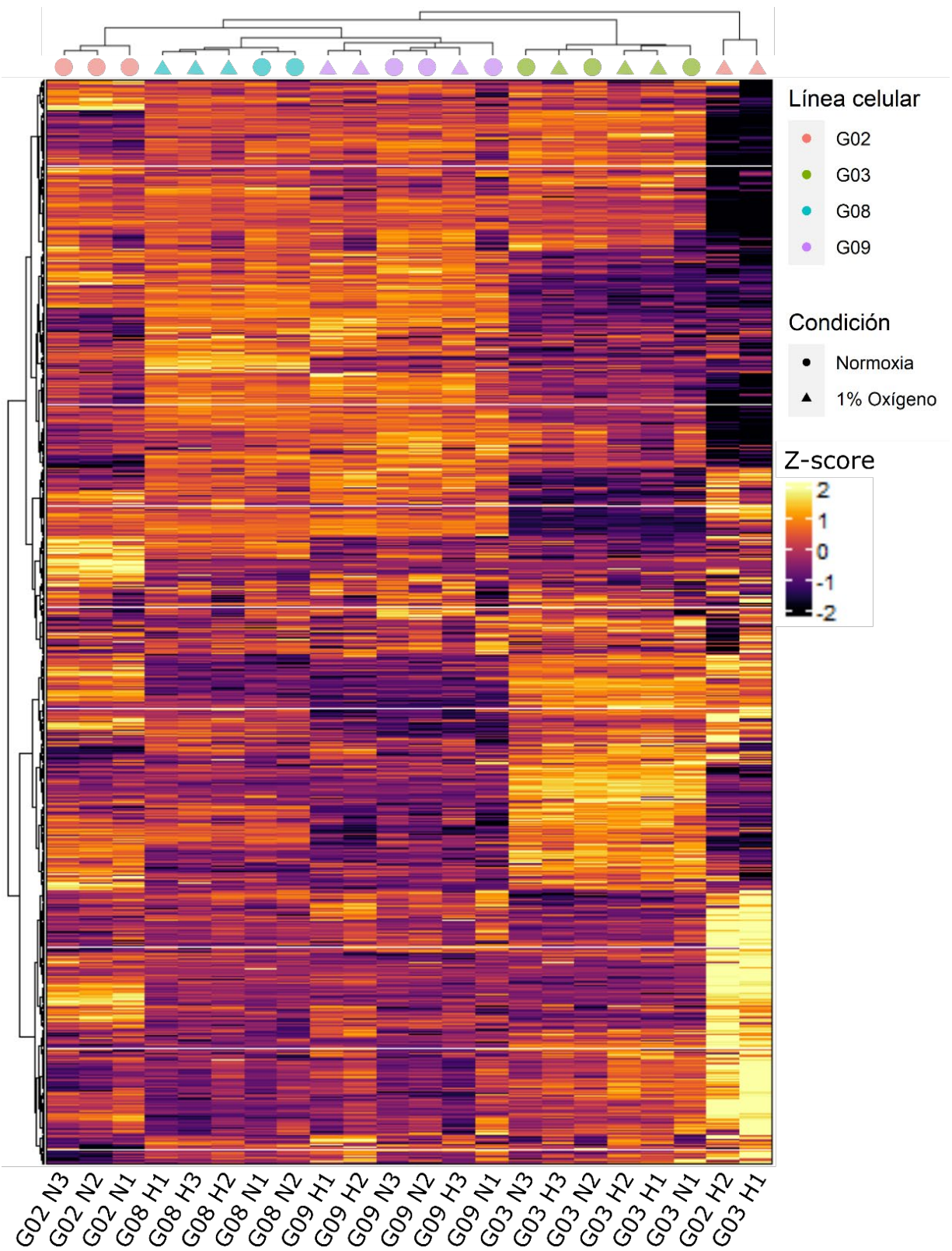


Figura 24. Heatmap con clustering jerarquizado de muestras y genes utilizando el método Ward.D2. Intensidad del color corresponde al z-score, una medida representante del nivel de expresión del gen.

Genes diferencialmente expresados entre líneas CMG

La secuenciación permite evaluar las diferencias entre los transcriptomas de las líneas de CMG. Esto resulta de utilidad para intentar comprender, al menos en parte, el origen de las diferencias en las capacidades de migración e invasión de las diferentes líneas de CMG y, a su vez, identificar posibles blancos terapéuticos que puedan interferir en estos procesos. Para ello, en una primera instancia, se realizó un análisis de genes que se expresan diferencialmente utilizando sólo las muestras en normoxia. Para lograr esto, se obtuvo para cada gen la mediana de la expresión génica entre muestras. Luego, en cada línea de CMG se realizó una prueba estadística con el fin de detectar qué genes se expresan diferencialmente,²⁴⁸ es decir que genes mostraron una diferencia entre su expresión en la línea CMG con la mediana. Esta mediana es un artefacto que nos permite comparar las líneas entre sí y no es una representación general de líneas de CMG. En la Tabla 9 se pueden ver los genes que difieren significativamente en cada línea entre su expresión en esa línea y la mediana expresión entre líneas.

Línea CMG				
	G02	G03	G08	G09
Disminuidos	849	1645	576	1383
No significativos	14042	13210	14773	13923
Aumentados	1104	1140	646	689

Tabla 9. Cantidad de genes disminuidos, aumentados o sin cambios significativos comprado a la mediana en cada línea CMG. Valor *p* ajustado < 0.05.

En cada línea en particular se encontraron numerosos genes expresados diferencialmente (es decir, genes que no mostraron una expresión similar en el resto de las líneas). En la Figura 25 se presentan los *volcano plots* de los niveles de expresión génica en comparación a la mediana de cada línea. En los mismos, se destacan en rojo los genes que cumplen dos condiciones: (i) que su nivel de expresión sea significativamente distinto respecto de la mediana y (ii) que presenten al menos el doble o la mitad del nivel de expresión de la mediana. En azul se indican los genes que exhiben una expresión significativamente

diferente a la de la mediana, pero no cumplen con la condición (ii) y en verde los genes que cumplen con la condición (ii) pero no la condición (i).

Además, las líneas G03 y G09 muestran una mayor proporción de genes con expresión reducida, mientras que en la línea G02 se observa una mayor abundancia de genes con expresión aumentada. En la Figura 25 se identificaron genes particulares en cada línea que tienen una diferencia de expresión (veces de cambios de expresión o *Fold Change*) particularmente alta. En la línea G08, KLHL9 (*Kelch Like Family Member 9*) y ATP5MC3 (*ATP Synthase Membrane Subunit C Locus 3*) presentaron los valores más extremos en cuanto a las veces de cambio de expresión. Estos mismos genes presentaron cambios extremos también en el caso de la línea G09, lo cual refleja la semejanza entre estas dos líneas. Más en detalle, KLHL9 es un gen involucrado en mitosis, mientras que ATP5MC3 es un gen que codifica para una subunidad de la ATP sintetasa. Al observar los genes expresados diferencialmente en cada línea de CMG, es importante analizar a los genes con mayor fold change, que a su vez puedan estar involucrados en procesos relacionados, directa o indirectamente a la migración/invasión celular. En el caso de la línea G02 (Tabla 10) resulta llamativo que el gen FLG (*Filaggrin*), que codifica para un microfilamento de queratina involucrado en la adhesión célula-célula, es el de mayor fold change de expresión comparado con la mediana²⁴⁹. Por su parte, TENM3 (*Teneurin Transmembrane Protein 3*) codifica una teneurina inducida por la vía Wnt, específicamente Wnt3A. Cabe notar que TENM3 está asociado con metástasis en varios tipos de cáncer, por lo tanto su inhibición por este gen anti-sentido podría estar asociado a la baja migración/invasión de G02²⁵⁰. En cuanto a los genes disminuidos en la línea G02 en comparación con la mediana, FOCAD (*Focadhesin*) y PCDHA13 (*Protocadherin Alpha 13*) son notables por su asociación con la adhesión celular.

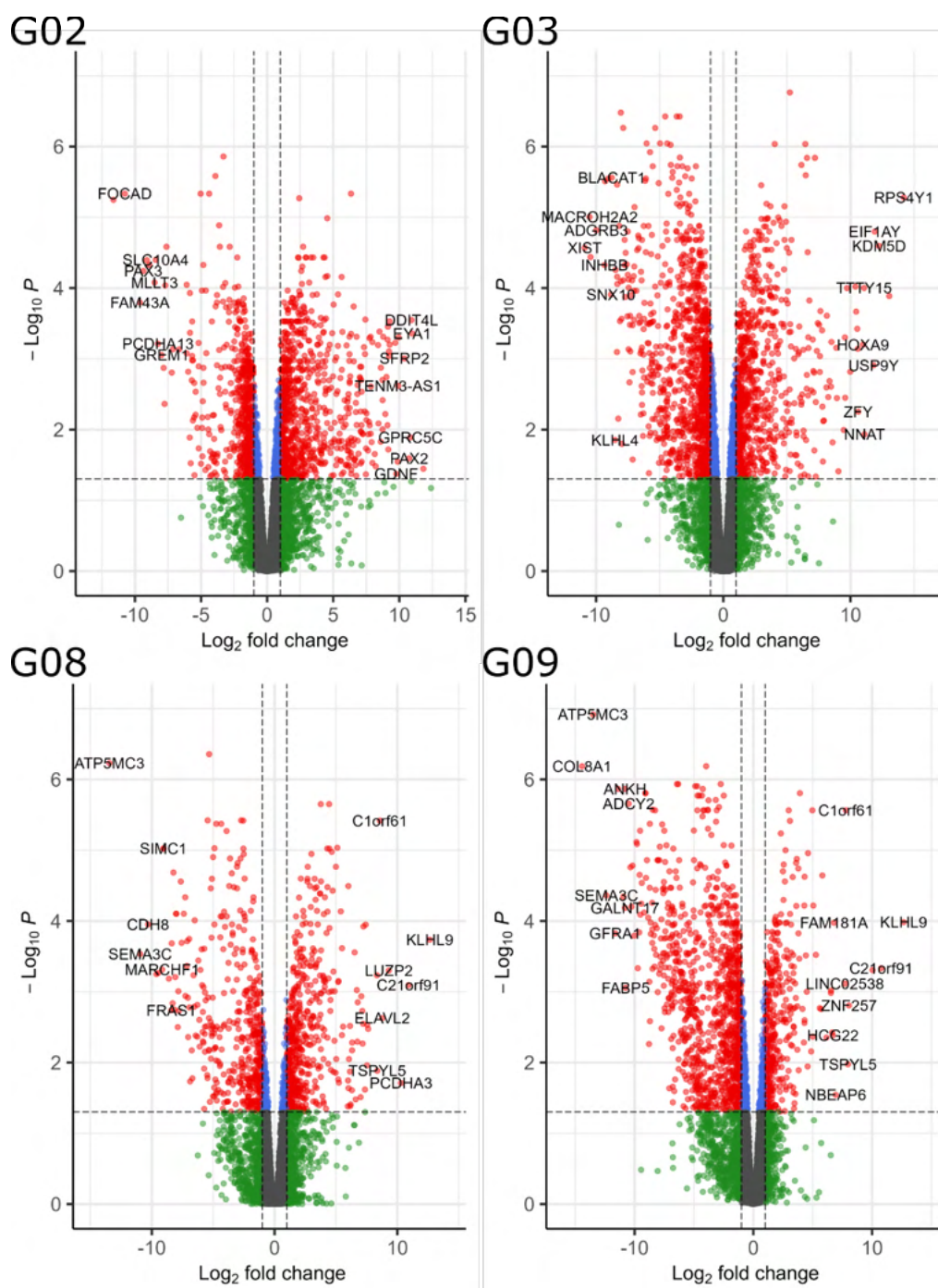


Figura 25. Volcano plot que muestra el cambio de expresión (fold change) y el valor de p ajustado de genes de cada una de las líneas de CMG en comparación con la mediana de expresión de las muestras en normoxia. En gris se ven los genes con veces de cambio menor a 2 y un p mayor a 0.05. En azul se marcan los genes con un p ajustado menor a 0.05 y veces de cambio menores a 2. En verde se indican genes con veces de cambio mayor a 2 y un p ajustado mayor a 0.05. En rojo se indican los genes con veces de cambio mayor a 2 y valores de p ajustados menores a 0.05. Una mayor intensidad de color indica mayor densidad de puntos (genes) superpuestos.

Gene	Log ₂ FC	Valor P ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
FLG	11.82	3.58E-02	Filaggrin
EYA1	10.97	4.39E-04	EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 1
DDIT4L	10.92	2.83E-04	DNA Damage Inducible Transcript 4 Like
GPRC5C	10.84	1.29E-02	G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member C
PAX2	10.74	2.55E-02	Paired Box 2
SFRP2	10.39	9.88E-04	Secreted Frizzled Related Protein 2
LRAT	9.95	4.97E-04	Lecithin Retinol Acyltransferase
TENM3-AS1	9.92	2.40E-03	TENM3 Antisense RNA 1
SGCD	9.87	2.84E-02	Sarcoglycan Delta
GDNF	9.77	4.23E-02	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
Disminuidos			
GSTT1	-11.63	5.67E-06	Glutathione S-Transferase Theta 1
FOCAD	-10.77	4.64E-06	Focadhesin
FAM43A	-9.63	1.60E-04	Family With Sequence Similarity 43 Member A
PAX3	-9.36	5.73E-05	Paired Box 3
HOXD13	-9.10	4.04E-05	Homeobox D13
SMOC1	-8.91	4.72E-05	SPARC Related Modular Calcium Binding 1
MLLT3	-8.52	8.36E-05	MLLT3 Super Elongation Complex Subunit
SLC10A4	-8.43	4.00E-05	Solute Carrier Family 10 Member 4
PCDHA13	-8.26	6.13E-04	Protocadherin Alpha 13
GREM1	-7.99	8.83E-04	Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist

Tabla 10. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente con menor valor de *p* ajustado en G02 comparado con la mediana de expresión entre las muestras en normoxia. LogFC es la tasa de (fold change) entre G02 y la mediana de las cuatro líneas en normoxia. La expresión promedio es el promedio de expresión entre G02 y la mediana y el valor *p* ajustado está ajustado por comparaciones múltiples.

En la línea G03 (Tabla 11) podemos observar que la mayoría de los genes con mayores veces de cambio (*fold change*) de expresión respecto a la mediana de todas las líneas son genes ligados al cromosoma Y. Este resultado es esperable, considerando G03 es una línea derivada tumor obtenido de un paciente masculino, mientras que las líneas G02, G08 y G09 son líneas derivadas de tumores de pacientes femeninos. En los genes disminuidos llama la atención ADGRB3 (Adhesion G Protein-Coupled Receptor B3), una proteína transmembrana que tiene un rol en la adhesión y puede unirse a laminina, colágeno III y heparina. En GBM no hay evidencia de su efecto sobre la migración, pero si sobre la inhibición de la angiogénesis²⁵¹.

Gene	Log ₂ FC	P valor ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
RPS4Y1	14.19	5.24E-06	Ribosomal Protein S4 Y-Linked 1
DDX3Y	13.05	1.30E-04	DEAD-Box Helicase 3 Y-Linked
KDM5D	12.25	2.54E-05	Lysine Demethylase 5D
EIF1AY	11.91	1.59E-05	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A Y-Linked
USP9Y	11.82	1.24E-03	Ubiquitin Specific Peptidase 9 Y-Linked
NNAT	11.10	1.16E-02	Neuronatin
TTY15	11.07	9.97E-05	Testis Expressed Transcript, Y-Linked 15
HOXA9	10.98	6.31E-04	Homeobox A9
ZFY	10.61	5.59E-03	Zinc Finger Protein Y-Linked
TXLNGY	10.57	7.22E-04	Taxilin Gamma Y-Linked (Pseudogene)
Disminuidos			
XIST	-10.90	2.70E-05	X Inactive Specific Transcript
MACROH2A2	-10.51	9.88E-06	MacroH2A.2 Histone
CYP4F24P	-10.44	3.65E-05	Cytochrome P450 Family 4 Subfamily F Member 24, Pseudogene
ADGRB3	-9.99	1.52E-05	Adhesion G Protein-Coupled Receptor B3
INHBB	-9.34	4.73E-05	Inhibin Subunit Beta B
SVIL-AS1	-9.30	3.10E-06	SVIL Antisense RNA 1
TBX5	-9.04	2.83E-06	T-Box Transcription Factor 5
SNX10	-8.84	1.24E-04	Sorting Nexin 10
BLACAT1	-8.76	2.76E-06	BLACAT1 Overlapping LEMD1 Locus
KLHL4	-8.51	1.40E-02	Kelch Like Family Member 4

Tabla 11. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente con mayor fold change en G03 comparado con la mediana de expresión entre las muestras en normoxia. LogFC es la tasa de diferencia (fold change) entre G03 y la mediana de las cuatro líneas en normoxia. La expresión promedio es el promedio de expresión entre G03 y la mediana y el valor p ajustado está ajustado por comparaciones múltiples.

Para poder realizar un mejor análisis de los genes con niveles de expresión aumentados, se omitieron los genes asociados al cromosoma Y. En la Tabla 12 se muestran los genes más expresados en la línea G03 comparado con la mediana, excluyendo los genes del cromosoma Y. Llama la atención el gen NNAT (neuronatin), un gen asociado a menor migración en cáncer de mama²⁵². En GBM no se ha estudiado su rol pero ha surgido como marcador de mal pronóstico²⁵³. Sería interesante estudiar si en GBM, particularmente en la línea G03, tiene el mismo rol que el observado en cáncer de mama.

Gene	Log ₂ FC	P valor ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados (genes no ligados a Y)			
NNAT	11.10	1.16E-02	Neuronatin
HOXA9	10.98	6.31E-04	Homeobox A9
PSPHP1	10.45	2.15E-04	Phosphoserine Phosphatase Pseudogene 1
MGMT	10.39	9.53E-05	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
IL21R	9.98	1.52E-03	Interleukin 21 Receptor
HGF	9.73	1.00E-04	Hepatocyte Growth Factor
FZD6	9.58	3.55E-03	Frizzled Class Receptor 6
IL4R	9.47	1.01E-02	Interleukin 4 Receptor
SLIT3	9.05	3.89E-02	Slit Guidance Ligand 3
GRIN3A	8.93	3.59E-03	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 3A

Tabla 12. Tabla de los 10 genes aumentados significativamente con mayor fold change en G03 comparado con la mediana de expresión entre las muestras en normoxia luego de retirar genes ligados al cromosoma Y. LogFC es la tasa de diferencia (fold change) entre G03 y la mediana de las cuatro líneas en normoxia. La expresión promedio es el promedio de expresión entre G03 y la mediana y el valor p ajustado está ajustado por comparaciones múltiples.

En la Tabla 13, se pueden ver los genes de expresión aumentada y disminuida en G08. Es interesante notar que entre los genes que mostraron una mayor disminución se encuentran SEMA3C (*Semaphorin 3C*), ITGA1 (*Integrin Subunit Alpha 1*) y FRAS1 (*Fraser Extracellular Matrix Complex Subunit 1*). SEMA3C es una semaforina, que son proteínas que modulan el citoesqueleto²⁵⁴. Particularmente, SEMA3C está involucrada en formación de axones en el cerebro²⁵⁵. En cáncer, SEMA3C está involucrada en aumentar la adhesión e invasión de células tumorales²⁵⁶. ITGA1, una integrina, y FRAS1, un componente de la MEC, también están involucradas en la adhesión celular²⁵⁷⁻²⁵⁹.

Gene	Log ₂ FC	valor p ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
KLHL9	12.64	1.84E-04	Kelch Like Family Member 9
C21orf91	10.91	8.06E-04	Chromosome 21 Open Reading Frame 91
PCDHA3	10.30	1.95E-02	Protocadherin Alpha 3
LUZP2	9.30	5.02E-04	Leucine Zipper Protein 2
ELAVL2	8.77	2.36E-03	ELAV Like RNA Binding Protein 2

C1orf61	8.58	3.82E-06	MIR9-1 Host Gene
TSPYL5	8.36	1.31E-02	TSPY Like 5
PCDHA2	8.34	5.85E-04	Protocadherin Alpha 2
HLA-DPB2	7.62	3.35E-03	Major Histocompatibility Complex, Class II, DP Beta 2 (Pseudogene)
DMRTA1	7.54	2.92E-03	DMRT Like Family A1
Disminuidos			
ATP5MC3	-13.46	5.86E-07	ATP Synthase Membrane Subunit C Locus 3
SEMA3C	-10.95	2.93E-04	Semaphorin 3C
CDH8	-10.31	1.12E-04	Cadherin 8
GALNT17	-9.62	5.63E-04	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 17
CHSY3	-9.48	5.43E-04	Chondroitin Sulfate Synthase 3
MARCHF1	-9.16	4.86E-04	Membrane Associated Ring-CH-Type Finger 1
SIMC1	-9.05	9.49E-06	SUMO Interacting Motifs Containing 1
KRBOX1	-9.05	9.49E-06	KRAB Box Domain Containing 1
ITGA1	-8.61	6.54E-04	Integrin Subunit Alpha 1
FRAS1	-8.42	1.83E-03	Fraser Extracellular Matrix Complex Subunit 1

Tabla 13. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente con menor valor de *p* ajustado en G08 comparado con la mediana de expresión entre las muestras en normoxia. LogFC es la tasa de (fold change) entre G08 y la mediana de las cuatro líneas en normoxia. La expresión promedio es el promedio de expresión entre G08 y la mediana y el valor *p* ajustado está ajustado por comparaciones múltiples.

En la línea G09 se destacan varios genes que se observaron también en la línea G08. Esto es coherente con lo que se observó anteriormente sobre la similitud entre estas líneas en cuanto a la transcriptómica y al comportamiento migratorio. Entre los genes disminuidos ITGBL1 (*integrin subunit beta like 1*) y ITGA4 (*integrin subunit alpha 4*) están asociados a la adhesión y migración celular²⁶⁰. Observar que las líneas G08 y G09 tengan una elevada expresión de genes asociados a la adhesión es esperable por los resultados de los ensayos de adhesión (Figura 20 y Figura 21).

Gene	Log ₂ FC	valor p ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
KLHL9	12.66	1.04E-04	Kelch Like Family Member 9
C21orf91	10.76	4.65E-04	Chromosome 21 Open Reading Frame 91
ELAVL2	10.04	4.94E-04	ELAV Like RNA Binding Protein 2
ZNF257	8.05	1.56E-03	Zinc Finger Protein 257
TSPYL5	7.97	1.06E-02	TSPY Like 5

C1orf61	7.79	2.73E-06	MIR9-1 Host Gene
LINC02538	7.72	7.68E-04	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2538
NBEAP6	6.94	2.87E-02	Neurobeachin Pseudogene 6
FAM181A	6.79	1.06E-04	Family With Sequence Similarity 181 Member A
HCG22	6.70	4.14E-03	HLA Complex Group 22 (Non-Protein Coding)
Disminuidos			
COL8A1	-14.43	6.49E-07	Collagen Type VIII Alpha 1 Chain
ATP5MC3	-13.50	1.21E-07	ATP Synthase Membrane Subunit C Locus 3
SEMA3C	-12.38	4.35E-05	Semaphorin 3C
GFRA1	-11.64	1.50E-04	GNDF Family Receptor Alpha 1
ITGBL1	-11.39	1.36E-06	Integrin Subunit Beta Like 1
ITGA4	-10.95	4.53E-05	Integrin Subunit Alpha 4
GALNT17	-10.82	6.54E-05	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 17
ANKH	-10.81	1.36E-06	ANKH Inorganic Pyrophosphate Transport Regulator
FABP5	-10.76	8.80E-04	Fatty Acid Binding Protein 5
ADCY2	-10.50	2.20E-06	Adenylate Cyclase 2

Tabla 14. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente con menor valor de *p* ajustado en G09 comparado con la mediana de expresión entre las muestras en normoxia. LogFC es la tasa de diferencia (fold change) entre G09 y la mediana de las cuatro líneas en normoxia. La expresión promedio es el promedio de expresión entre G09 y la mediana y el valor *p* ajustado está ajustado por comparaciones múltiples.

Los ensayos de migración *in vitro* revelaron que las líneas G08 y G09 presentan una elevada capacidad de migración respecto de las líneas G02 y G03. La transcriptómica permite estudiar las causas de estas diferencias que estén relacionadas con la expresión génica. En ese sentido, se consideró importante determinar qué genes presentan niveles de expresión similar entre las líneas G08 y G09 (y entre las líneas G02 y G03) puesto que estos genes podrían ser clave para interpretar las tendencias de migración halladas entre las distintas líneas en los ensayos *in vitro* (Figura 12, Figura 15, Figura 19). Es por esto por lo que a continuación se profundizará en el análisis de las semejanzas observadas entre las líneas G08 y G09.

En la Figura 26, se presenta un diagrama de Venn que permite evaluar cuántos genes exhiben diferencias significativas respecto de la mediana de todas las muestras en normoxia en más de una línea a la vez. Esto se realizó para los genes diferencialmente expresados por sobre la mediana (Figura 26A) o por debajo de la mediana (Figura 26B).

Nuevamente, en este análisis, se puede observar que las líneas G08 y G09 comparten gran cantidad de genes expresados diferencialmente.

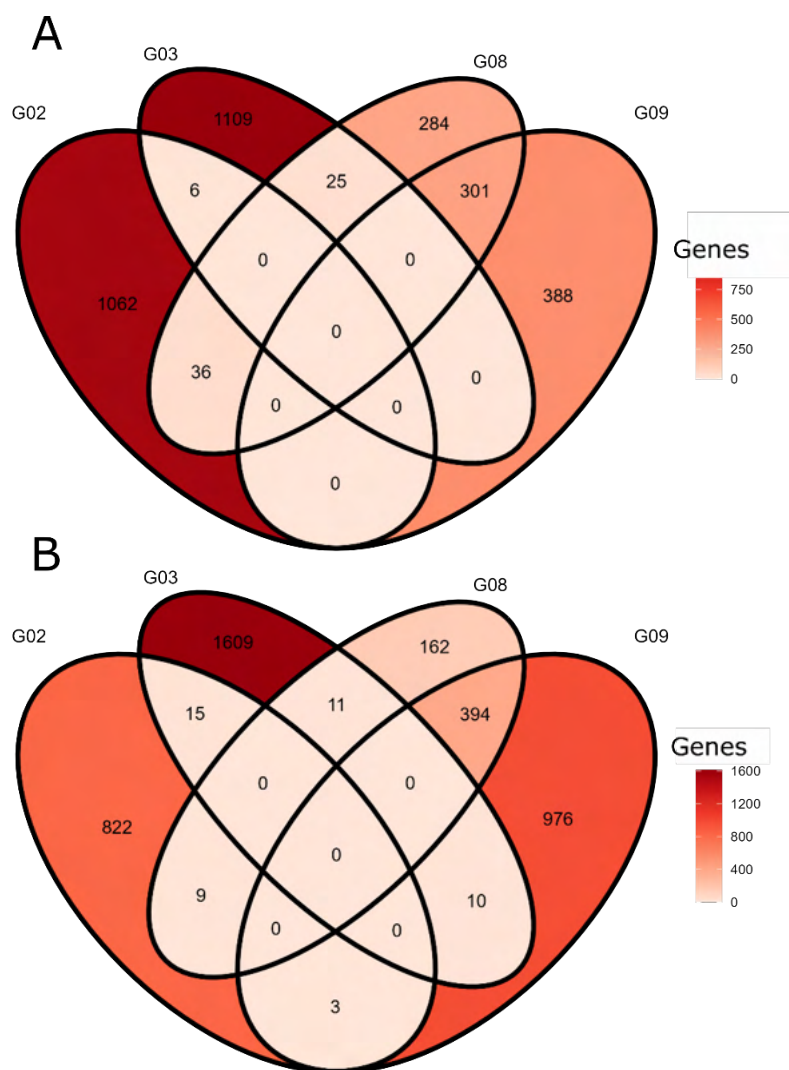


Figura 26. Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados en cada línea de CMG en comparación con la mediana de todas las muestras en normoxia. (A) Genes con expresión aumentada comparado con la mediana y (B) genes con expresión disminuida comparada con la mediana (p ajustado < 0.05). La intensidad del color indica la cantidad de genes por sección.

Los genes en común que se encuentran aumentados en las líneas G08 y G09, pero no en las líneas G02 y G03, son 301 genes. En la (Tabla 15) se muestran los 20 genes de esta lista con

mayor diferencia entre su expresión en G08-G09 y G02-G03. HEPACAM (*hepatic and glial cell adhesion molecule*) es una molécula de adhesión que parece regular la transición entre fenotipo invasivo y proliferativo en GBM, es decir el “Go or Grow”, induciendo la proliferación e inhibiendo la invasión^{261,262}. Esto es llamativo ya que la línea G08 es una línea que migra e invade robustamente. Sería interesante indagar si la inhibición de este gen induce aún más la migración e invasión en esta línea celular. NCAN (*Neurocan*) es un proteoglicano condroitín sulfato (CSPG) que interactúa con varios HSPGs para modular la adhesión y migración y parecieran ser los responsable de la invasividad de astrocitomas de bajo grado²⁶³, sin embargo, esta función aún no fue evaluada en GBM. TESC (*Tescalcin*) es una proteína de unión a calcio. En cáncer colorrectal se observó que promueve la migración e invasión²⁶⁴. OLIG2 (*Oligodendrocyte Transcription Factor 2*) es un gen asociado con la diferenciación a oligodendrocitos y, en GBM, la disminución de su expresión se asocia a la transición fenotípica proneural a mesenquimal²⁶⁵. En su forma no fosforilada esta proteína induce la migración e invasión en GBM²⁶⁶.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
KLHL9	-4.26	-4.26	-4.26	-4.26	6.33	5.91	6.11	6.07	Kelch Like Family Member 9
C1orf61	-3.43	-1.59	-0.55	-0.55	8.79	9.58	7.79	9.12	MIR9-1 Host Gene
GABBR2	1.25	-3.38	0.24	-0.54	7.52	7.58	7.36	7.58	Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 2
C21orf91	-4.26	-3.25	-4.26	-4.26	4.44	3.99	4.15	3.78	Chromosome 21 Open Reading Frame 91
FAM181A	-3.38	-4.26	-4.26	-4.26	4.13	4.01	4.07	3.49	Family With Sequence Similarity 181 Member A
DNAJB13	-4.26	-4.26	-0.82	-1.02	5.26	5.41	5.25	4.83	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B13
CCND2	2.74	3.80	-2.26	-2.14	8.52	8.72	7.69	8.26	Cyclin D2
PRSS35	1.61	2.21	-3.51	-3.40	6.79	7.11	6.72	7.28	Serine Protease 35
TESC	-0.41	-4.26	-4.26	-4.26	4.86	4.32	4.71	3.55	Tescalcin
NCAN	2.48	-0.85	2.92	2.66	9.69	10.19	7.62	8.81	Neurocan
NKAIN4	2.09	-3.38	-0.90	-1.00	6.00	6.36	6.51	6.76	Sodium/Potassium Transporting ATPase Interacting 4

ELAVL2	-4.26	-4.26	-4.26	-4.26	2.57	2.50	3.51	2.87	ELAV Like RNA Binding Protein 2
AMER2	-3.02	-4.26	-4.26	-3.83	3.64	3.70	2.11	3.30	APC Membrane Recruitment Protein 2
HEPACAM	2.47	0.79	-1.17	-1.67	7.30	7.50	6.43	6.76	Hepatic And Glial Cell Adhesion Molecule
LOC389906	-4.26	-4.26	-2.42	-2.69	3.13	3.41	3.58	3.77	Zinc Finger Protein 839 Pseudogene
CXXC4	0.85	-4.26	-4.26	-4.26	3.61	3.48	4.15	4.11	CXXC Finger Protein 4
TSPYL5	-4.26	-4.26	-4.26	-4.26	2.64	3.19	2.00	2.36	TSPY Like 5
OLIG2	1.76	1.76	-4.26	-4.26	5.76	5.93	5.16	5.21	Oligodendrocyte Transcription Factor 2
KCNE3	-2.98	-3.58	-4.26	-2.84	3.20	3.16	3.39	3.29	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 3
PLIN2	-0.23	-1.56	-2.41	-1.19	5.28	5.48	5.22	5.17	Perilipin 2

Tabla 15. 20 de los genes con expresión aumentada significativamente (p ajustado < 0.05) en las líneas G08 y G09 respecto a la mediana, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

De los genes con mayores niveles de expresión en las líneas G02 y G03 (Tabla 16), resultan interesantes particularmente NECTIN3 (*Nectin Cell Adhesion Molecule 3*) y CDH8 (*Cadherin 8*), ya que están asociados a procesos que influyen sobre la migración. NECTIN3 (*Nectin Cell Adhesion Molecule 3*) es una nectina involucrada en la adhesión celular que interactúa con otras nectinas, adherinas e integrinas. CDH8 (*Cadherin 8*) es una cadherina involucrada en adhesión celular, particularmente en la adhesión célula-célula. CDH8, en condiciones fisiológicas, se encuentra expresada en el tejido cortical del cerebro²⁶⁷. SEMA3C, que ya fue descrita anteriormente, también es un gen notable por su asociación con la adhesión celular y el remodelado del citoesqueleto.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
SEMA3C	8.32	5.54	7.02	7.23	-3.84	-4.26	-4.26	-4.26	Semaphorin 3C
CDH8	5.06	1.40	4.76	5.06	-4.26	-4.26	-4.26	-4.26	Cadherin 8
NECTIN3	5.82	3.72	4.22	4.20	2.25	1.93	-2.80	-3.36	Nectin Cell Adhesion Molecule 3
VAT1L	4.72	3.05	4.95	4.66	3.28	3.53	-4.26	-4.26	Vesicle Amine Transport 1 Like
PDE4D	4.58	1.08	3.79	3.91	0.76	0.46	-0.10	-0.01	Phosphodiesterase 4D

RAI14	7.29	5.89	6.71	6.48	5.79	5.24	5.15	4.77	Retinoic Acid Induced 14
--------------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------------------------

Tabla 16. Genes con expresión aumentada significativamente (p ajustado < 0.05) en G02 y G03 respecto a la mediana, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Como se pudo observar en el capítulo 1, las líneas G02 y G09 mostraron una baja capacidad invasiva, mientras que las líneas G03 y G08 mostraron mayores niveles de invasión. Para evaluar posibles patrones de expresión que puedan explicar, al menos parcialmente, estas diferencias, primero se buscaron genes que estén altamente expresados en las líneas G03 y G08, pero no en las líneas G02 y G09. En la Tabla 17 se pueden ver algunos de estos genes. Debido a sus relaciones con la migración/invasión, resultan interesantes *CADM3* (*Cell Adhesion Molecule 3*), *RSPO2* (*R-Spondin 2*), *TSPAN7* (*Tetraspanin 7*), *SEMA5A* (*Semaphorin 5A*), *CD9* (*CD9 molecule*) y *TPPP* (*Tubulin Polymerization Promoting Protein*). *CADM3* es un gen interesante ya que esta poco estudiado y recientemente se ha encontrado que su sobreexpresión inhibe la migración y proliferación en cáncer de mama²⁶⁸. *RSPO2* es una proteína secretada que funciona como agonista de la vía WNT/ β -catenina, su rol en invasión no es claro ya que en cáncer gástrico se publicó que promueve la invasión²⁶⁹ pero en cáncer de colon esta publicado que inhibe la invasión y metastasis²⁷⁰. En GBM no hay mucho publicado sobre el efecto sobre la invasión pero se ha observado que potencia la vía Wnt y aumenta los marcadores de células madre tumorales²⁷¹. *TSPAN7* es una proteína transmembrana que funciona como receptor y tiene un rol en neurogénesis, sinapsis y transformación maligna. En osteosarcoma se observó que aumenta la invasión induciendo la transición epitelio-mesenquimal²⁷². *SEMA5A* es una semaforina, un grupo de proteínas que tienen la habilidad de guiar el crecimiento axonal. *SEMA5A*, en particular, es una semaforina de membrana que inhibe la motilidad en gliomas mediante la inactivación de *Rac1*²⁷³. *CD9* es una tetraspanina que parece inhibir la motilidad de células de cáncer de mama²⁷⁴, pero en leucemia parece promover la migración²⁷⁵. Hasta el momento de la publicación de esta tesis no hay antecedentes en GBM sobre el efecto de *CD9* en migración e invasión. *TPPP* participa en la polimerización de la tubulina, especialmente en el cerebro. Pareciera tener un rol en aumentar la migración e invasión en cáncer de vejiga²⁷⁶ y cáncer de mama²⁷⁷ y recientemente se encontró que en GBM también induce la migración²⁷⁸. Por

último, LGALS3 (galectina 3), es una lectina con resultados contradictorios sobre su rol en la migración e invasión. Se encontró que su silenciamiento en la línea celular de glioma U373 puede aumentar o disminuir la migración dependiendo del sustrato sobre cual migran. En estudios específicamente sobre invasión el silenciamiento de LGALS3 no pareció tener efecto en las células U373²⁷⁹.

Notablemente, no hay genes que muestren niveles de expresión aumentados de manera simultánea en las líneas G02 y G09.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
PGM5	-3.50	-4.26	2.35	2.83	4.20	3.72	-2.37	-3.60	Phosphoglucomutase 5
COLEC12	2.15	1.22	5.79	5.94	6.01	6.10	-1.89	-0.65	Collectin Subfamily Member 12
TNFRSF10 D	-3.01	-2.57	3.57	3.69	1.85	2.30	-2.20	-2.05	TNF Receptor Superfamily Member 10d
UBE2QL1	-1.33	0.89	3.64	3.11	1.78	1.79	-3.69	-4.26	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 QL1
CADM3	2.24	2.65	5.72	6.11	4.89	4.99	-1.54	-1.21	Cell Adhesion Molecule 3
CYP4F11	-4.26	-4.26	0.86	0.17	0.45	0.31	-4.26	-4.26	Cytochrome P450 Family 4 Subfamily F Member 11
TMEM74	-4.26	-4.26	-0.69	-1.22	0.36	0.64	-4.26	-2.63	Transmembrane Protein 74
OCLNP1	-3.27	-4.26	0.94	1.31	0.49	0.41	-3.13	-3.84	OCLN Pseudogene 1
RSPO2	-4.26	-4.26	-1.00	-0.81	-0.33	-0.48	-4.26	-4.26	R-Spondin 2
SERPING1	1.22	2.66	3.29	4.17	5.02	5.73	0.64	1.91	Serpin Family G Member 1
TFAP2C	1.49	-0.09	5.53	5.06	3.85	3.95	1.49	1.53	Transcription Factor AP-2 Gamma
EN1	0.52	-3.58	4.91	5.30	3.89	3.93	2.27	2.27	Engrailed Homeobox 1
FUOM	-1.88	-1.40	1.71	1.82	1.00	1.45	-1.26	-0.91	Fucose Mutarotase
TSPAN7	1.93	3.09	4.12	3.42	5.99	6.30	2.33	3.93	Tetraspanin 7
GATM	4.26	4.06	6.86	6.72	7.55	7.70	4.33	5.22	Glycine Amidinotransferase
GBP3	0.74	0.04	4.00	4.35	3.85	3.33	1.46	1.43	Guanylate Binding Protein 3
SEMA5A	5.30	5.90	8.31	8.06	8.96	8.79	6.56	7.45	Semaphorin 5A
CD9	6.34	7.86	8.12	8.64	8.15	8.71	6.29	7.91	CD9 Molecule
TPPP	3.13	5.36	5.23	4.66	5.35	5.29	3.97	4.65	Tubulin Polymerization Promoting Protein
ZDHHC11B	1.97	3.59	4.13	3.87	3.89	3.94	2.70	3.22	Zinc Finger DHHC-Type Containing 11B

LGALS3	7.72	7.87	9.38	9.40	9.23	9.41	7.64	7.90	Galectin 3
KIZ	3.67	2.50	5.23	5.37	5.17	4.93	3.58	3.54	Kizuna Centrosomal Protein
CNTNAP1	4.91	6.12	6.59	6.76	6.20	6.28	4.84	5.92	Contactin Associated Protein 1
SEPTIN8	6.42	4.69	7.74	7.93	7.74	7.81	6.03	6.26	Septin 8
CHRD	2.95	4.29	4.08	4.07	4.06	4.14	2.97	3.06	Chordin

Tabla 17. Genes con expresión aumentada significativamente (p ajustado < 0.05) en las líneas G03 y G08 respecto a la mediana, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

En cuanto a los genes con expresión disminuida en comparación con la mediana, vemos que las líneas G03 y G08 comparten 11 genes. En la Tabla 18 se pueden ver estos genes y se destacan LBX1-AS1 (*LBX1 Antisense RNA 1*) y CAMSAP3 (*Calmodulin-regulated spectrin-associated protein family member 3*) como genes que podrían ser responsables de la alta capacidad invasiva de estas dos líneas. LBX1-AS1 es un ARN largo no codificante que, en el carcinoma oral de células escamosas, inhibe la invasión de células tumorales²⁸⁰. Por lo tanto, el hecho de que esté disminuido en estas líneas podría ser una de las razones de la mayor invasión en las líneas G03 y G09. CAMSAP3 (Calmodulin Regulated Spectrin Associated Protein Family Member 3) es una proteína que regula la dinámica de microtúbulos. En cáncer de pulmón se encontró que CAMSAP3 inhibe la invasión mediante HIF1²⁸¹. Sería interesante indagar si en GBM este gen tiene un rol similar. Dentro de estos genes no se encontraron genes asociados con la remodelación de la MEC, que hubiese sido interesante ya que la invasión y la migración difieren principalmente en este aspecto.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
COL2A1	4.97	4.06	-1.00	-1.53	-0.59	-1.84	2.60	1.96	Collagen Type II Alpha 1 Chain
LBX1-AS1	1.83	-0.69	-4.26	-3.17	-1.99	-1.35	0.41	0.51	LBX1 Antisense RNA 1
CD34	1.25	-0.54	-3.47	-3.37	-1.73	-1.49	1.71	0.82	CD34 Molecule
CAMSAP3	2.88	3.45	0.57	1.46	-0.78	0.10	2.61	3.43	Calmodulin Regulated Spectrin Associated Protein Family Member 3
CDH3	4.54	4.08	2.93	3.04	1.82	2.01	4.52	4.04	Cadherin 3
TMSB4X	11.78	11.97	9.10	9.24	9.30	9.67	10.69	10.48	Thymosin Beta 4 X-Linked

TMSB4XP8	7.43	7.75	4.78	4.95	4.92	5.31	6.14	6.12	TMSB4X Pseudogene 8
CELSR1	7.32	6.42	4.62	4.63	6.52	6.56	7.57	8.05	Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 1
SMS	8.03	8.92	5.55	5.58	7.27	7.42	8.18	8.13	Spermine Synthase
HID1	5.00	6.17	3.14	3.47	2.97	3.15	4.44	4.49	HID1 Domain Containing
PLAT	9.44	7.51	7.45	6.22	7.53	7.45	8.71	8.32	Plasminogen Activator, Tissue Type

Tabla 18. Genes con expresión disminuida significativamente (p ajustado < 0.05) en G03 y G08 respecto a la mediana, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Por último, se buscaron los genes de expresión disminuida compartidos por las líneas G02 y G09, las dos líneas de menor capacidad invasiva. Como se puede ver en la Tabla 19, sólo son 3 genes. Entre ellos, CDH13 (Cadherin 13), codifica una cadherina atípica. Sin embargo, como se ha reportado que esta proteína inhibe la invasión celular²⁸², su disminución no sería responsable de la capacidad invasiva disminuida en las líneas G02 y G09.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
CMKLR1	-3.17	-4.26	1.22	-0.23	-0.49	0.17	-4.26	-4.26	Chemerin Chemokine-Like Receptor 1
CDH13	3.80	5.09	6.76	6.64	5.09	5.03	1.70	1.79	Cadherin 13
CRYZL2P	-1.20	-3.11	1.93	2.98	1.98	1.91	-3.95	-3.74	CRYZL2P-SEC16B Readthrough

Tabla 19. Genes con expresión disminuida significativamente (p ajustado < 0.05) en las líneas G02 y G09 respecto a la mediana, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Genes diferencialmente expresados en líneas de CMG en respuesta a hipoxia

Luego de analizar los genes con expresión diferencial en las líneas de CMG en condiciones de normoxia, decidimos analizar el efecto de hipoxia sobre el transcriptoma. Para ello, determinamos, en cada línea de CMG, los genes que se expresan diferencialmente en hipoxia respecto a normoxia. En la Tabla 20 se pueden observar los genes significativamente cambiados con el tratamiento de hipoxia en cada línea de CMG.

Línea CMG				
	G02	G03	G08	G09
Disminuidos	2972	1983	288	3804
No significativos	10186	12495	15749	8855
Aumentados	3561	2241	682	4060

Tabla 20. Cantidad de genes disminuidos, aumentados o sin cambios significativos con el tratamiento de hipoxia en cada línea CMG. Valor p ajustado < 0.05 .

En la Figura 27 se presentan los gráficos de volcán de las cuatro líneas CMG y los genes que cambian su expresión significativamente con el tratamiento de hipoxia. Se puede observar que G02 tiene la mayor cantidad de genes afectados por la hipoxia, mientras que G08 muestra menor cantidad de genes cambiados significativamente.

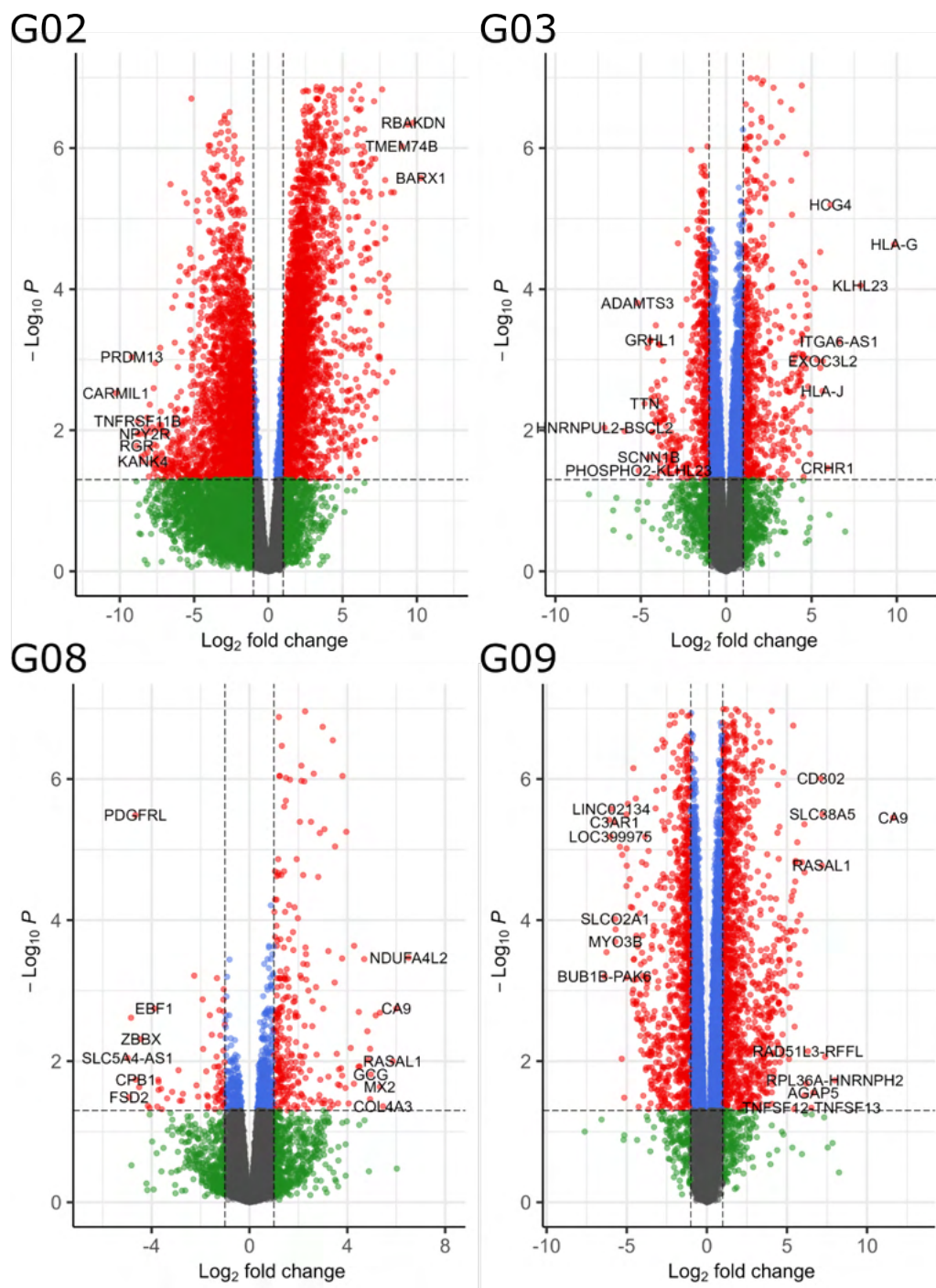


Figura 27. Gráfico de volcán que muestra el cambio de expresión (en veces de cambio) y el valor de p ajustado de genes de cada línea de CMG entre hipoxia y normoxia. En gris se ven los genes con veces de cambio menor a 2 y un p mayor a 0.05. En azul se marcan los genes con un p ajustado menor a 0.05 y veces de cambio menores a 2. En verde se indican genes con veces de cambio mayor a 2 y un p ajustado mayor a 0.05. En rojo se indican los genes con veces de cambio mayor a 2 y valores de p ajustados menores a 0.05. Una mayor intensidad de color indica mayor densidad de puntos (genes) superpuestos.

En las Tabla 21, Tabla 22, Tabla 23 y la Tabla 24 se pueden ver representados los 10 genes que mostraron mayores inducciones y reducciones en su expresión en respuesta a hipoxia en cada línea CMG. En la línea G02, entre los genes aumentados con hipoxia se destaca KISS1R (*KISS1 Receptor*), que según lo reportado por Kim *et al.* induce la migración y la invasión en líneas celulares de GBM (U87-MG, U-251-MG y U373-MG)²⁸³. Sin embargo, como se describió en el capítulo 1, las condiciones de hipoxia en la línea G02 disminuyen la capacidad migratoria y no afectan significativamente la capacidad invasiva. Entre los genes que exhiben una disminución en su expresión en respuesta a hipoxia se destacan CARMIL1 (*Capping Protein Regulator And Myosin 1 Linker 1*) y KANK4 (*KN Motif And Ankyrin Repeat Domains 4*). CARMIL1 es una proteína que regula la polimerización de la actina, particularmente en lamelipodios, estructuras delgadas encontradas en el frente de células migrando. *In vitro*, su silenciamiento inhibe la formación de lamelipodios y la migración celular²⁸⁴. KANK4 es una proteína expresada normalmente en células contráctiles como pericitos, y es un regulador de la interacción entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular^{285,286}. No hay mucho publicado sobre el rol de KANK4 en GBM, pero considerando su función molecular, sería interesante estudiar esta proteína en el contexto de los gliomas ya que su disminución en G02 puede ser el causante de la disminución de la migración frente a hipoxia en esta línea.

Gene	Log ₂ FC	valor p ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
CA9	10.75	3.23E-08	Carbonic Anhydrase 9
BARX1	10.28	2.67E-06	BARX Homeobox 1
NPPC	10.05	2.95E-08	Natriuretic Peptide C
C19orf81	10.00	2.87E-08	Chromosome 19 Open Reading Frame 81
RBAKDN	9.76	4.37E-07	RBAK Downstream Neighbor
PRTN3	9.71	2.12E-10	Proteinase 3
SLAMF9	9.39	4.65E-07	SLAM Family Member 9
KISS1R	9.33	4.15E-10	KISS1 Receptor
HES7	9.00	1.00E-08	Hes Family BHLH Transcription Factor 7
TMEM74B	8.98	9.41E-07	Transmembrane Protein 74B
Disminuidos			
CARMIL1	-10.26	2.98E-03	Capping Protein Regulator and Myosin 1 Linker 1

PRDM13	-9.19	9.16E-04	PR/SET Domain 13
RGR	-8.88	1.66E-02	Retinal G Protein Coupled Receptor
TNFRSF11B	-8.80	7.45E-03	TNF Receptor Superfamily Member 11b
PHYHIPL	-8.80	1.12E-02	Phytanoyl-CoA 2-Hydroxylase Interacting Protein Like
ZFH2	-8.64	1.13E-02	Zinc Finger Homeobox 2
SILC1	-8.55	2.35E-02	Sciatic Injury Induced LincRNA Upregulator of SOX11
KANK4	-8.44	2.77E-02	KN Motif and Ankyrin Repeat Domains 4
NPY2R	-8.32	1.12E-02	Neuropeptide Y Receptor Y2
CALCRL	-8.31	2.19E-02	Calcitonin Receptor Like Receptor

Tabla 21. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente en G02 con hipoxia con mayores veces de cambio comparado con la expresión en G02 en normoxia. Se indican también los valores p ajustados.

En la línea G03, cuya migración e invasión no cambian con hipoxia, entre los genes aumentados con hipoxia se destaca ITGA6-AS1 (*Integrin Subunit Alpha 6 anti-sense RNA 1*). ITGA6-AS1 es un ARN largo no codificante que recientemente se estudió en GBM. Se encontró que promueve la migración e invasión de una línea celular de GBM (U118)²⁸⁷. A pesar de esto, en la línea G03 la hipoxia no afecta la migración (Figura 13). Entre los genes con expresión disminuida en hipoxia se observa un gen que induce la migración: EPHA10 (*Ephrin Receptor A10*) y ADAMTS3 (*ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 3*). EPHA10 es un receptor tirosina quinasa que está correlacionado con metástasis en varios cánceres. En cáncer de mama se demostró que promueve la invasión y migración tumoral²⁸⁸. Por lo tanto, el hecho de que se observe una disminución en la expresión de estos genes, como también un aumento en la expresión de genes asociados al incremento de la migración podría explicar porque no se observan diferencias en la migración o invasión con hipoxia en la línea G03. Es decir, que el comportamiento de la línea G03 frente a hipoxia se dé por una inducción y disminución simultánea de genes que favorecen la migración e invasión.

Gene	Log ₂ F C	valor p ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
HLA-G	9.84	2.32E-05	Major Histocompatibility Complex, Class I, G
CA9	9.74	6.39E-08	Carbonic Anhydrase 9

SLC16A3	8.39	3.77E-12	Solute Carrier Family 16 Member 3
KLHL23	7.86	8.88E-05	Kelch Like Family Member 23
ITGA6-AS1	6.61	5.51E-04	ITGA6 Antisense RNA 1
HCG4	6.11	6.35E-06	HLA Complex Group 4
AK4	5.99	1.37E-12	Adenylate Kinase 4
CRHR1	5.95	3.44E-02	Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1
EXOC3L2	5.66	1.05E-03	Exocyst Complex Component 3 Like 2
HLA-J	5.64	2.78E-03	Major Histocompatibility Complex, Class I, J (Pseudogene)
Disminuidos			
HNRNPUL2-BSCL2	-7.12	9.21E-03	HNRNPUL2-BSCL2 Readthrough (NMD Candidate)
CORO7-PAM16	-5.95	1.03E-02	CORO7-PAM16 Readthrough
ADAMTS3	-5.19	1.57E-04	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 3
PHOSPHO2-KLHL23	-5.12	3.73E-02	PHOSPHO2-KLHL23 Readthrough
TTN	-4.77	4.18E-03	Titin
DOCK3	-4.59	6.75E-04	Dedicator Of Cytokinesis 3
SCNN1B	-4.53	2.41E-02	Sodium Channel Epithelial 1 Subunit Beta
EPHA10	-4.46	5.46E-04	EPH Receptor A10
GRHL1	-4.43	5.25E-04	Grainyhead Like Transcription Factor 1
GPR17	-4.39	4.69E-02	G Protein-Coupled Receptor 17

Tabla 22. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente en la línea G03 con hipoxia con mayores veces de cambio comparado con la expresión en la línea G03 en normoxia. Se indican también los valores p ajustados.

En la línea G08 (Tabla 23), la hipoxia conlleva la inducción de varios genes asociados con la migración e invasión. Entre ellos se encuentran RASAL1 (RAS Protein Activator Like 1) y HIF3A. Si bien no se ha reportado el rol de RASAL1 (un inhibidor de Ras) en GBM, en otros tipos de cáncer existen resultados contradictorios. Por ejemplo, en cáncer gástrico²⁸⁹ y tiroideo²⁹⁰ se ha observado que esta proteína inhibe la migración mientras que en el cáncer ovario²⁹¹ la promueve. Sería interesante indagar en su rol en la línea G08, en donde la hipoxia promueve la inducción de este gen y también de la migración celular. Entre los genes aumentados se encuentra HIF3A, un inhibidor de HIF1 y HIF2 mediante el secuestro de HIF β ²⁰¹. Ya que su rol es regular negativamente a HIF1 y HIF2, sería clave estudiar cómo se expresa en las líneas en respuesta a hipoxia. En cuanto a los genes que disminuyen su expresión con hipoxia se encuentra SYNPO2 (*Synaptopodin 2*), una proteína que disminuye

la invasión de células tumorales, y en GBM se encontró que inhibe la migración en líneas celulares U87 y U251²⁹².

Gene	Log ₂ FC	valor p ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
SLC16A3	6.60	6.69E-11	Solute Carrier Family 16 Member 3
NDUFA4L2	6.51	3.42E-04	NDUFA4 Mitochondrial Complex Associated Like 2
CA9	6.00	1.79E-03	Carbonic Anhydrase 9
RASAL1	5.86	1.00E-02	RAS Protein Activator Like 1
COL4A3	5.46	4.36E-02	Collagen Type IV Alpha 3 Chain
HIF3A	5.33	2.06E-03	Hypoxia Inducible Factor 3 Subunit Alpha
MX2	5.33	2.31E-02	MX Dynamin Like GTPase 2
LINC00908	5.16	2.25E-03	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 908
AK4	5.06	3.39E-11	Adenylate Kinase 4
GCG	4.96	1.54E-02	Glucagon
Disminuidos			
SLC5A4-AS1	-4.98	9.04E-03	SLC5A4 Antisense RNA 1
FSD2	-4.92	3.26E-02	Fibronectin Type III and SPRY Domain Containing 2
XKR5	-4.84	2.42E-03	XK Related 5
PDGFRL	-4.66	3.24E-06	Platelet Derived Growth Factor Receptor Like
CPB1	-4.65	1.83E-02	Carboxypeptidase B1
MSLN	-4.51	2.33E-02	Mesothelin
ZBBX	-4.43	4.86E-03	Zinc Finger B-Box Domain Containing
SYNPO2	-4.15	4.30E-02	Synaptopodin 2
NPR1	-4.08	4.60E-02	Natriuretic Peptide Receptor 1
EBF1	-3.89	1.79E-03	EBF Transcription Factor 1

Tabla 23. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente en G08 con hipoxia con mayores veces de cambio comparado con la expresión en G08 en normoxia. Se indican también los valores p ajustados.

En la línea G09 se observan varios genes inducidos por hipoxia en común con la línea G08, incluyendo RASAL1. CD302 (*C-type lectin domain family 13 member A*) es una lectina involucrada en la adhesión celular y migración, que localiza con actina en lamelipodios²⁹³. Dentro de los genes que disminuyen su expresión con la hipoxia, no se destaca ninguno relacionado a procesos de migración/invasión celular.

Gene	logFC	valor p ajustado	Nombre aprobado completo (inglés)
Aumentados			
CA9	11.62	3.55E-06	Carbonic Anhydrase 9
SLC16A3	9.07	1.26E-12	Solute Carrier Family 16 Member 3
RPL36A-HNRNPH2	7.98	1.87E-02	RPL36A-HNRNPH2 Readthrough
DNAAF4-CCPG1	7.38	8.66E-03	DNAAF4-CCPG1 Readthrough (NMD Candidate)
SLC38A5	7.21	3.14E-06	Solute Carrier Family 38 Member 5
RASAL1	7.18	1.68E-05	RAS Protein Activator Like 1
CD302	7.11	9.80E-07	CD302 Molecule
AGAP5	6.64	2.80E-02	ArfGAP With GTPase Domain, Ankyrin Repeat and PH Domain 5
TNFSF12-TNFSF13	6.52	4.58E-02	TNFSF12-TNFSF13 Readthrough
RAD51L3-RFFL	6.31	7.24E-03	RAD51L3-RFFL Readthrough
Disminuidos			
BUB1B-PAK6	-6.38	6.26E-04	BUB1B-PAK6 Readthrough
LY75-CD302	-6.26	2.85E-04	LY75-CD302 Readthrough
CCDC173	-6.09	3.79E-06	Cilia And Flagella Associated Protein 210
LOC399975	-6.01	6.54E-06	Uncharacterized LOC399975
LINC02134	-5.96	2.66E-06	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2134
C3AR1	-5.75	4.10E-06	Complement C3a Receptor 1
SLCO2A1	-5.71	9.64E-05	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1
MYO3B	-5.70	2.02E-04	Myosin IIIB
SLC16A8	-5.70	1.35E-04	Solute Carrier Family 16 Member 8
CDRT1	-5.43	9.15E-06	F-Box and WD Repeat Domain Containing 10B

Tabla 24. Tabla de los 20 genes expresados diferencialmente en la línea G09 con hipoxia con mayores veces de cambio comparado con la expresión en la línea G09 en normoxia.

En la Figura 28A, se puede observar un diagrama de Venn que muestra el número de genes inducidos en hipoxia en común en las distintas líneas de CMG. En la Figura 28B, se representa también el número de genes en común (entre distintas líneas de CMG), pero, en este caso, con una expresión disminuida.

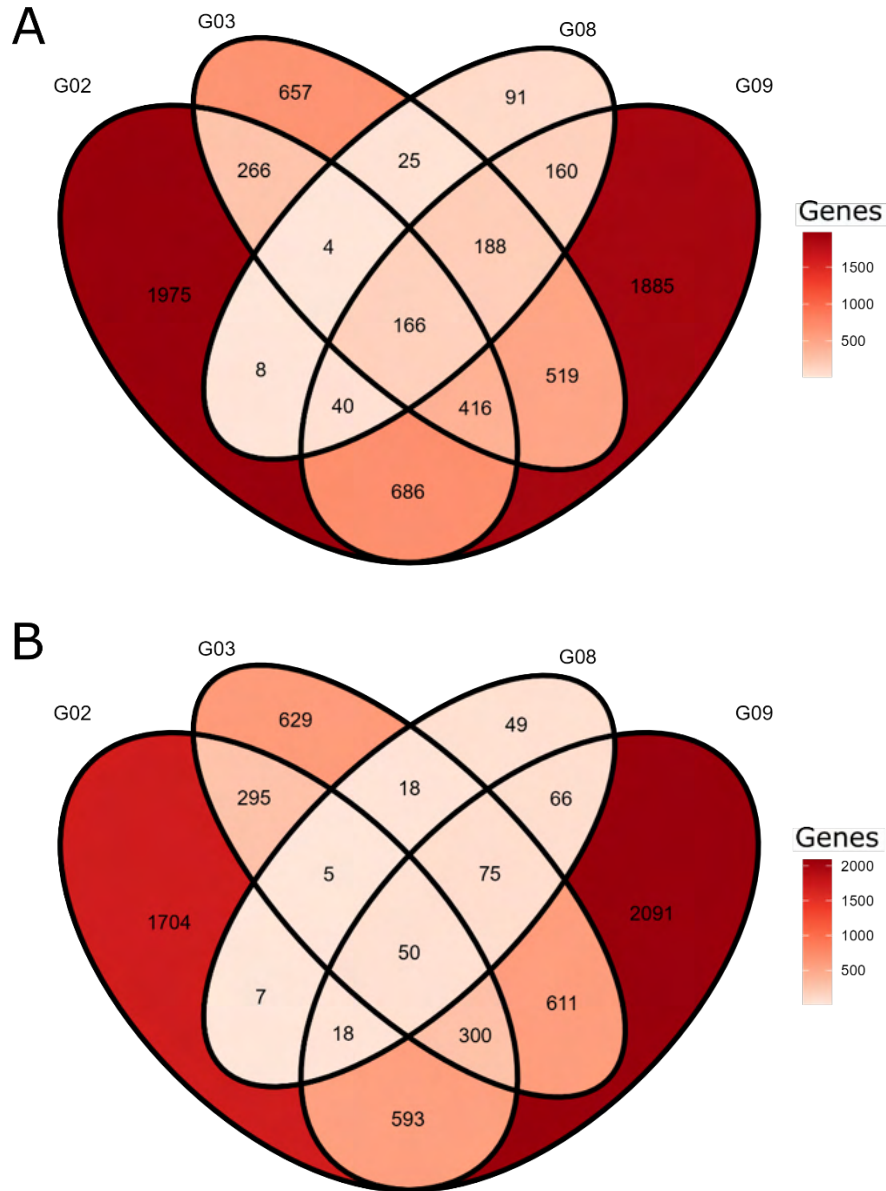


Figura 28. Diagrama de Venn que muestra el número de genes en común entre distintas líneas de CMG que muestran un aumento (A) o una disminución (B) en su expresión con el tratamiento de hipoxia (p ajustado < 0.05). La intensidad de color representa la cantidad de genes por segmento.

Considerando el comportamiento de estas 4 líneas de CMG en cuanto a la migración, resulta importante analizar qué genes aumentan en las líneas G08 y G09, pero disminuyen en la línea G02 en respuesta a hipoxia (Figura 12). Entre estos genes son notables BOC (*BOC Cell Adhesion Associated, Oncogene Regulated*), DCLK2 (*Doublecortin Like Kinase 2*),

OPHN1 (*Oligophrenin 1*) y CSPG5 (*Chondroitin Sulfate Proteoglycan 5*). BOC es miembro de la familia inmunoglobulina/repeticiones de fibronectina tipo 3. Se ha encontrado que, en GBM, su silenciamiento inhibe la migración e invasión mediante la vía de Hedgehog²⁹⁴. DCLK2 es una quinasa asociada a microtúbulos que participa en la maduración neuronal. No está estudiado en GBM pero en cáncer de mama se encontró que su inhibición reduce la migración *in vitro* y las metástasis en pulmón *in vivo*²⁹⁵. OPHN1 es una proteína con un dominio que regula negativamente a RhoA, Rac y Cdc42, que a su vez son reguladores del citoesqueleto de actina. Su silenciamiento reduce la adhesión a fibronectina²⁹⁶. En astrocitos normales su silenciamiento inhibe la migración²⁹⁷. Por último CSPG5 codifica para una proteína llamada neuroglicano C, un componente de la matriz extracelular particularmente expresado en células del SNC²⁹⁸.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
RAPGEF5	3.93	-3.00	-4.26	-4.26	-0.21	0.95	-0.62	1.65	Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 5
RGR	3.10	-4.26	5.93	5.53	3.31	3.70	2.83	3.33	Retinal G Protein Coupled Receptor
MYT1	2.40	-2.75	4.58	4.69	2.99	3.82	4.55	5.52	Myelin Transcription Factor 1
HOXB3	7.88	3.87	7.00	7.37	7.68	8.03	7.58	8.57	Homeobox B3
EVC2	1.14	-1.97	2.98	3.13	0.25	1.30	-0.83	0.56	EvC Ciliary Complex Subunit 2
BOC	7.31	3.81	6.07	6.06	7.28	7.60	6.89	7.50	BOC Cell Adhesion Associated, Oncogene Regulated
KIF21B	3.79	0.89	-0.51	-1.00	2.39	3.13	3.61	4.91	Kinesin Family Member 21B
DCLK2	6.95	3.93	6.89	6.73	8.18	8.51	7.76	8.23	Doublecortin Like Kinase 2
TRNP1	4.24	1.58	4.83	4.97	4.15	4.66	3.75	4.70	TMF1 Regulated Nuclear Protein 1
OPHN1	4.53	1.88	3.15	3.44	5.49	5.73	5.42	6.29	Oligophrenin 1
CSPG5	4.36	1.94	3.16	2.45	7.18	7.79	6.53	7.46	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 5
C9orf64	3.24	0.45	4.96	5.07	2.52	2.82	3.33	3.72	Chromosome 9 Open Reading Frame 64 (C9orf64) Pseudogene
PRKN	2.37	-0.02	0.38	0.94	2.48	2.94	2.37	2.99	Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase
GPR153	6.07	3.79	5.77	5.86	5.25	5.71	4.57	5.12	G Protein-Coupled Receptor 153
MED12	5.34	3.26	4.16	4.12	5.07	5.38	4.93	5.70	Mediator Complex Subunit 12
GAL3ST4	5.16	3.14	6.00	5.95	4.38	4.98	5.08	5.52	Galactose-3-O-Sulfotransferase 4
LTBP1	5.23	3.46	4.03	4.21	4.43	4.82	2.96	3.98	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1
LRRC75A	3.51	1.60	2.44	3.04	4.11	4.58	4.26	4.85	Leucine Rich Repeat Containing 75A

GSE1	8.16	6.20	8.67	8.48	8.08	8.29	8.01	8.76	Gse1 Coiled-Coil Protein
APBA1	2.93	1.09	4.98	4.62	5.25	5.50	4.50	5.36	Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 1

Tabla 25. 20 de los genes sobre expresados en hipoxia en G08 y G09 y disminuidos en hipoxia en G02, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Al analizar el conjunto inverso, es decir, genes que aumentan en hipoxia en la línea G02 y disminuyen en hipoxia en las líneas G08 y G09, se pueden observar varios genes interesantes que posiblemente estén asociados a la disminución de la migración observada en la línea G02: *WFDC3* (*WAP Four-Disulfide Core Domain 3*) y *SOCS1* (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*). Es clave considerar que la expresión de *WFDC3* es relativamente baja y, por lo tanto, por más que tiene un patrón de expresión interesante entre las líneas de CMG, su relevancia puede ser menor debido a su baja expresión. Se encontró que *WFDC3* inhibe la metástasis en cáncer colorrectal mediante la promoción de Erβ²⁹⁹. *SOCS1*, que a diferencia de *WFDC3*, se expresa de manera relativamente robusta en la línea G02, también está asociado a la inhibición de la invasión en cáncer de próstata³⁰⁰ y en células normales³⁰¹.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
BCL2L12	3.90	5.26	3.86	3.53	3.68	3.18	4.01	3.57	BCL2 Like 12
ENY2	5.58	6.71	5.99	5.92	5.79	5.54	6.24	5.42	ENY2 Transcription and Export Complex 2 Subunit
SOCS1	2.29	4.05	0.06	0.39	0.77	-0.16	0.24	-1.18	Suppressor Of Cytokine Signaling 1
SARNP	5.89	6.90	6.48	6.45	6.21	5.92	6.59	5.96	SAP Domain Containing Ribonucleoprotein
WFDC3	-4.26	0.32	-2.20	-0.65	-3.43	-4.26	-3.85	-4.26	WAP Four-Disulfide Core Domain 3
HMCES	5.65	6.80	5.41	5.10	5.26	5.07	5.67	5.12	5-Hydroxymethylcytosine Binding, ES Cell Specific
POMP	6.23	7.39	6.96	6.76	6.22	6.08	6.52	5.98	Proteasome Maturation Protein
MPC1	5.50	7.31	4.43	4.06	6.92	6.79	6.13	5.65	Mitochondrial Pyruvate Carrier 1

Tabla 26. Genes disminuidos en hipoxia en las líneas G08 y G09 y sobre expresados en hipoxia en la línea G02, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Análisis global de vías de señalización basado en la secuenciación de ARN

Para continuar indagando en las diferencias entre las distintas líneas de CMG, se realizó un análisis de vías de señalización, el cual analiza la expresión de los genes pertenecientes a distintas vías y genera un valor de cuánto estaría expresada esa vía en cada muestra. Este análisis, conocido como *Progeny*, permite comparar el enriquecimiento de distintas vías de señalización en las líneas de CMG, tanto en normoxia como en hipoxia. En la Figura 29 se pueden observar las 14 vías y su enriquecimiento en cada muestra. Resulta interesante que, al agruparse las muestras en base al enriquecimiento de las vías de señalización, en las líneas G08 y G09, las condiciones de normoxia e hipoxia se agrupan. Sin embargo, en la línea G03 se puede observar que la condición de normoxia se agrupa con condición en normoxia de la línea G02, lo cual implica que, en cuanto las vías de señalización, estas líneas son más parecidas entre sí de lo que lo es cada una de ellas en normoxia respecto a su propia condición en hipoxia. Al igual de lo que se observó anteriormente, la línea G02 en hipoxia difiere considerablemente del resto de las muestras. Es llamativo observar que, en este análisis, a diferencia de lo que ocurre al agrupar las muestras según los niveles de expresión génica globales (Figura 23), la línea G08 se asemeja más a la línea G03 que a la línea G09. Al observar la vía de respuesta a hipoxia vemos, como es esperable, que la hipoxia conlleva su enriquecimiento en todas las líneas de CMG. Si miramos el agrupamiento de las vías de señalización según su similitud, podemos observar que la vía de Trail (*Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) es la que se comporta en forma más parecida a la vía de respuesta a hipoxia. La vía de Trail está asociada a la inducción de apoptosis, y si bien en hipoxia no se observó una inducción significativa de la muerte celular (Figura 22), es posible que, en estas condiciones, el umbral apoptótico se encuentre más bajo. Es decir, la hipoxia podría estar sensibilizando a las CMG a morir por apoptosis. Analizando el resto de las vías surgen ciertos patrones interesantes. En la línea G02 se observa una marcada inducción de varias vías de señalización en respuesta a hipoxia: la vía de andrógenos, VEGF, p53, NFkB y

TNF α . Por su parte, el caso de la vía de VEGF en las distintas líneas de CMG es llamativo ya, que era esperable que la vía de VEGF aumente en todos los casos, puesto que VEGF es un gen cuya expresión aumenta considerablemente en respuesta a hipoxia. Una explicación posible, podría consistir en que, luego de un tiempo de producida la inducción de la expresión de VEGF por hipoxia, la actividad de esta vía comience a disminuir como consecuencia de una mayor internalización de receptores del VEGF (como mecanismo de *feedback* negativo). Otras vías de interés es la vía de JAK-STAT, la cual se encuentra enriquecida en la línea G08. Esta vía se asocia con la migración y la invasión, ya que, entre otras cosas, promueve el aumento de expresión de MMPs³⁰². Notablemente, la línea G08 muestra una elevada migración e invasión, tanto en normoxia como en hipoxia, y es posible que la actividad de la vía JAK-STAT sea, al menos en parte, responsable de esto. La vía TGF β se encuentra enriquecida en la línea G03. Esta vía también está asociada a la inducción de MMPs³⁰³, coincidiendo nuevamente con la elevada capacidad invasiva de la línea G03 (a pesar de que posee una baja capacidad migratoria cuando se encuentra en monocapa), lo que sugiere la posibilidad de que, en esta línea, sea la actividad de la vía TGF β la que confiera una mayor capacidad invasiva.

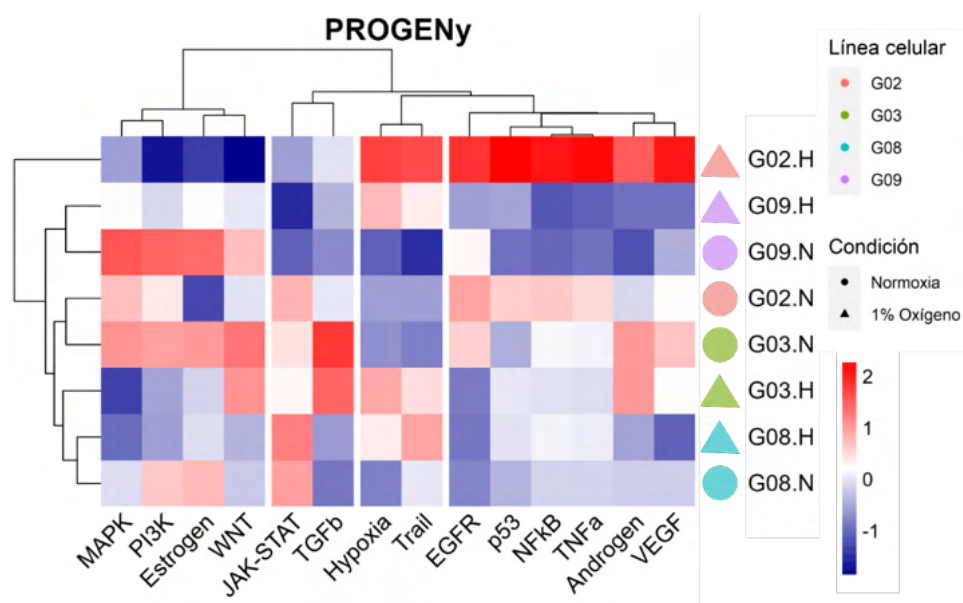


Figura 29. Heatmap del análisis Progeny analizando vías de señalización en las líneas CMG en normoxia e hipoxia. El color indica el enriquecimiento de la vía de señalización relativa al resto de las muestras.

Análisis global de la actividad de factores de transcripción basado en la secuenciación de ARN

Luego se evaluó la activación global de factores de transcripción mediante un análisis predictivo llamado DoRothEA, el cual se basa en los niveles de expresión de genes blancos de cada factor de transcripción. Un primer análisis se realizó comprando normoxia versus hipoxia en todas las líneas de CMG (Figura 30A). Se identificaron dos grupos de factores de transcripción, aquellos que muestran una menor actividad y aquellos que muestran una mayor actividad frente a condiciones de hipoxia. Dentro del primer grupo se encontraron E2F1 y E2F4, entre otros, mientras que dentro del segundo se incluyeron HIF1 α (que fue el factor de transcripción que mostró mayor diferencia entre condiciones), TP53, FOX y otros (Figura 30A).

También se realizó el mismo análisis, pero comparando entre condición/línea (Figura 30B) y se observaron ciertos patrones interesantes. El factor de transcripción PRDM14 (*PR/SET Domain 14*) es llamativo porque es de los pocos factores de transcripción mostrados en esta figura que aumenta su actividad con hipoxia en las líneas G08 y G09, y la disminuye en las líneas G02 y G03. En cáncer de pulmón se observó que el silenciamiento génico de este gen inhibe la migración y la expresión de MMPs, indicando que PRDM14 induce la migración y la expresión de MMPs³⁰⁴. Por lo tanto, este factor podría estar favoreciendo la capacidad migratoria e invasiva de las líneas G08 y G09 en respuesta a hipoxia. Son llamativas también ciertas particularidades de cada línea, como la marcada actividad de los factores RFX5 (*Regulatory factor X 5*) y STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) en la línea G08. RFX5 está asociado a la diferenciación celular³⁰⁵ y a la regulación del colágeno³⁰⁶ mientras que STAT1 puede regular la vía WNT y la migración en GBM³⁰⁷. En la línea G09, por su parte, se observó una alta activación de la actividad de los factores de transcripción E2F, los cuales están asociados a la proliferación celular³⁰⁸. En la línea G02 en hipoxia llama la atención el factor *FOXP1* (*Forkhead box protein P1*), cuyos genes blancos están considerablemente más enriquecidos que en las otras muestras. Interesantemente, es

considerado un supresor tumoral y en GBM se encontró que su sobreexpresión inhibe la migración e invasión³⁰⁹.

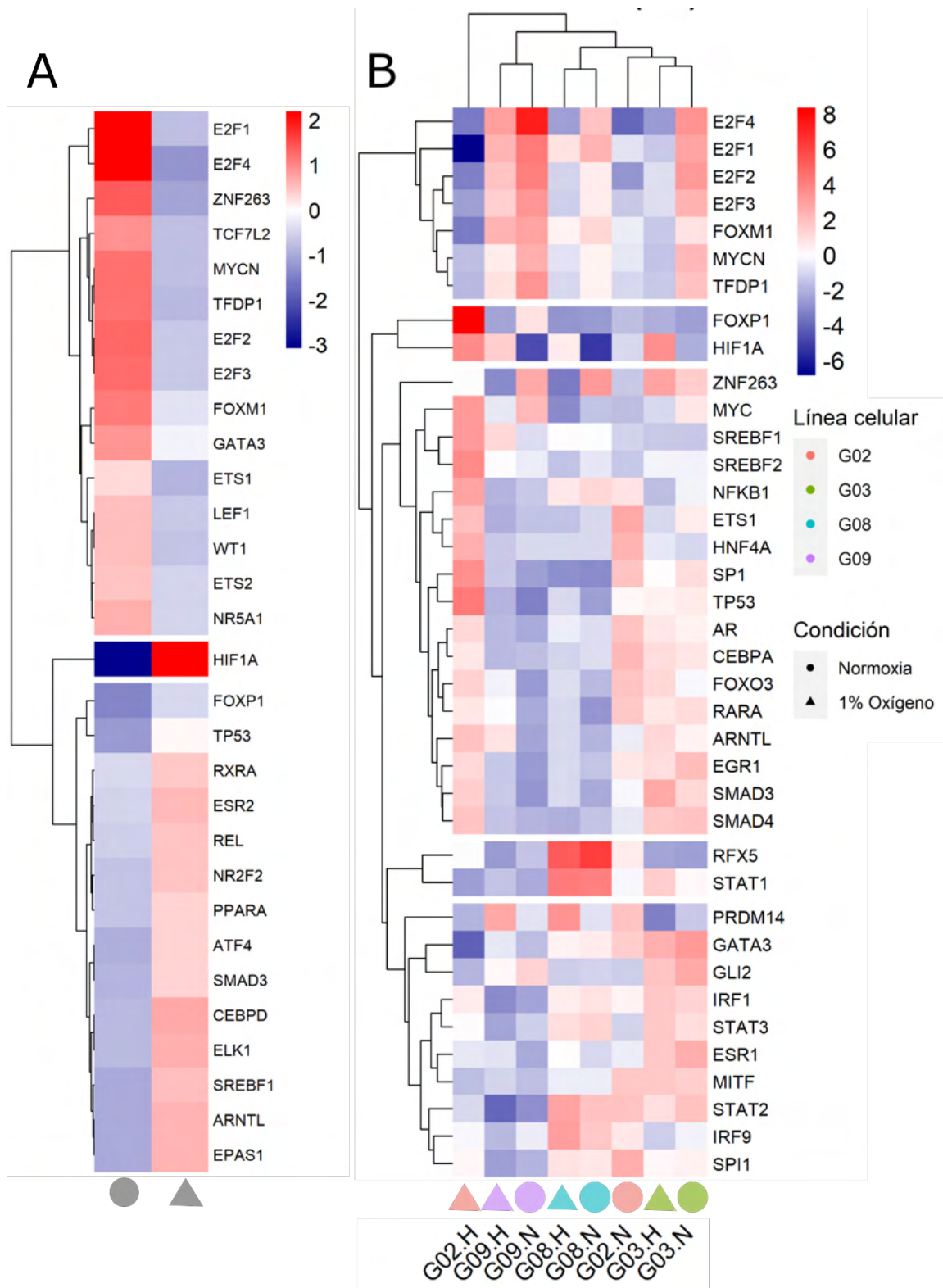


Figura 30. Heatmap del análisis DoRothEA de factores de transcripción en normoxia e hipoxia (A) y entre las condiciones de cada línea CMG (B). El color indica el enriquecimiento de la actividad del factor de transcripción relativo al resto de las muestras.

Vías diferencialmente enriquecidas entre líneas CMG

Con el objetivo de analizar qué procesos biológicos, funciones moleculares y/o componentes celulares, se encuentran diferencialmente representados entre las diferentes líneas de CMG (en normoxia) se realizó un análisis de conjuntos de genes mediante el algoritmo GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) sobre los genes que se expresan significativamente más o menos al comparar su expresión con la mediana de las cuatro líneas (en normoxia). El análisis de GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) se basa en calcular el enriquecimiento de un conjunto de genes en base a la expresión diferencial de los genes que conforman dicho conjunto, y calcular si el enriquecimiento es significativo. Los conjuntos de genes analizados pueden definirse en base a diferentes criterios y existen bases de datos que presentan distintos conjuntos de genes tales como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), GO (Gene Ontology), REACTOME y HALLMARKS.

La enciclopedia KEGG tiene una base de datos de vías metabólicas (ej. Glicolisis), vías de señalización (ej. señalización de MAPK), vías asociadas a enfermedades (ej. Cáncer), vías asociadas a procesos celulares (ej. Apoptosis), y más. Estas vías fueron establecidas mediante análisis bioinformáticos de secuenciación de alto rendimiento (*high-throughput sequencing*)¹. La base de datos de GO fue creada por Gene Ontology Consortium. Es una base de datos utilizada para anotar genes y sus funciones en base a la similitud de secuencias. Esta base de datos estructura los conjuntos de genes en tres categorías: BP (*Biological processes*), que asocia al conjunto de genes con un objetivo biológico tal como la división celular, la señalización de una vía o un proceso metabólico. MF (*Molecular Function*) se refiere a actividad bioquímica de los genes y sus productos, como, por ejemplo, funciones enzimáticas, funciones de transporte o funciones de adhesión. Por último, CC (*Cellular Component*), se refiere a un conjunto de genes activos en un mismo

compartimiento, por ejemplo, el compartimiento extracelular, o el mitocondrial^{2,3}. REACTOME es una base de datos de vías y procesos biológicos. Integra interacciones moleculares, reacciones y vías de señalización con funciones biológicas complejas. A diferencia de GO, los conjuntos de genes de REACTOME se basan más en la interacción molecular entre los productos de los genes y tiende a armar conjuntos más detallados y menos amplios que los conjuntos de genes de GO³¹⁰⁻³¹².

El MSigDB (Molecular Signatures Database) armó, en base a los *hallmarks* clásicos del cáncer, una colección de 50 conjunto de genes en base a estas vías clásicas de cáncer. En esta colección hay conjuntos asociados vías de señalización asociadas a cáncer, tal como la vía Wnt/ β -catenin, y conjunto de genes asociados a procesos como la reparación de ADN³¹³.

En este trabajo se utilizaron conjuntos de genes de las cuatro bases de datos para poder interpretar los cambios transcriptómicos con las distintas estrategias. En lugar de la palabra *pathway*, utilizada en inglés para estos conjuntos de genes, se utilizó la palabra vía, pero es importante saber que este término no se limita a vías de señalización, sino a conjuntos de genes asociados entre sí bajo distintos criterios.

La Figura 31 corresponde a un diagrama de Venn que muestra la cantidad de vías específicas, enriquecidas (A) o disminuidas (B), en cada línea de CMG o en más de una en simultáneo (en normoxia). En la Figura 31A se puede observar que G02 es la línea con más vías enriquecidas, mientras que la línea G08 es la que menos tiene. Si observamos las vías disminuidas, podemos ver que la línea G09 muestra la mayor cantidad de vías disminuidas (Figura 31B). Esto es coherente con lo observado en el análisis de PROGENy y DOROTEA, en donde la línea G09 muestra disminuidas muchas vías de señalización y actividades de factores de transcripción respecto del resto de las líneas de CMG. También se observa que la línea G03, es la que posee la menor cantidad de vías disminuidas y que las líneas G08 y G09 comparten una cantidad importante de vías disminuidas (Figura 31B).

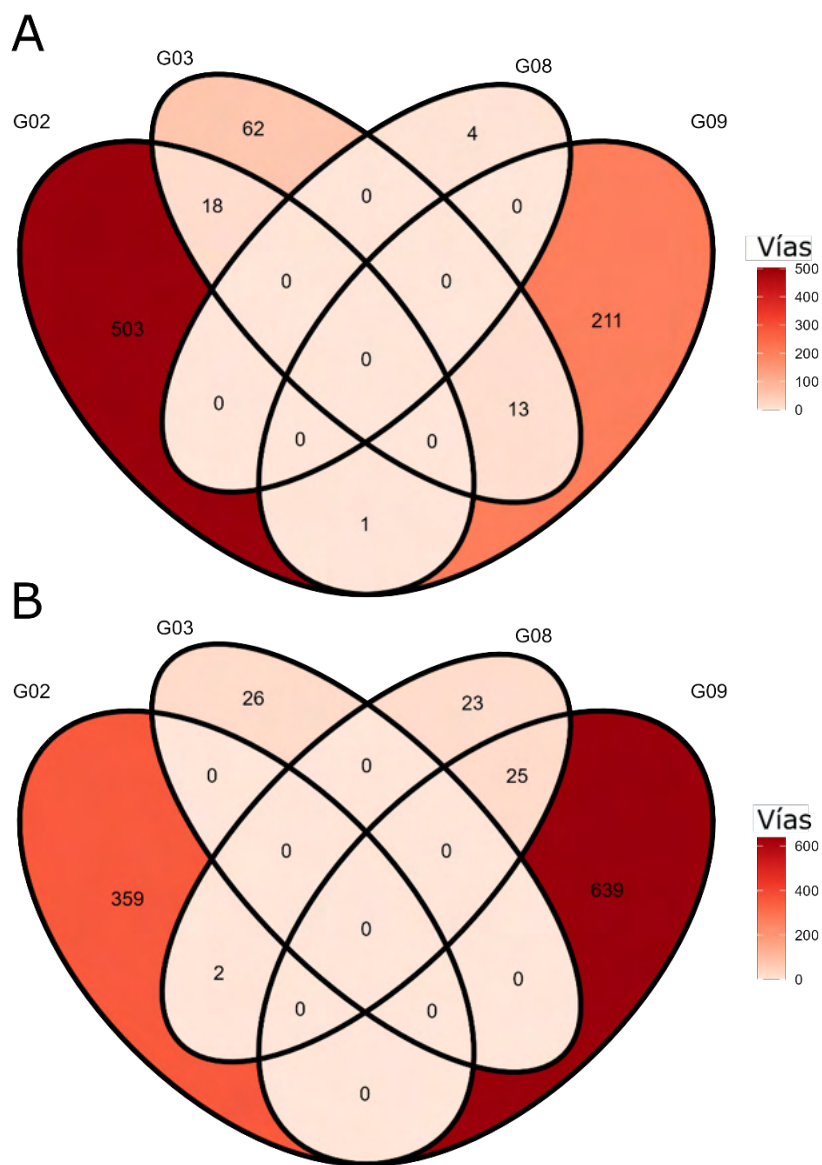


Figura 31. Diagrama de Venn de vías aumentadas (A) y disminuidas (B) basado en genes diferencialmente expresados comprado con la mediana en cada línea, ordenados por si están enriquecidos en una línea CMG exclusivamente o compartido entre varias líneas CMG. (p ajustado < 0.05). La intensidad de color corresponde a la cantidad de vías en cada subconjunto.

	G02		G03	
Nombre oficial de la vía	VEN	P adj.	VEN	P adj.
REACTOME_REGULATION_OF_INSULIN_LIKE_GROWTH_FACTOR_IGF_TRANSPORT_AND_UPTAKE_BY_INSULIN_LIKE_GROWTH_FACTOR_BINDING_PROTEINS_IGFBPS	1.58	3.99E-02	1.79	1.52E-02
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	1.37	9.45E-02	1.88	8.29E-05
GOMF_EXTRACELLULAR_MATRIX_STRUCTURAL_CONSTITUENT	1.58	1.45E-02	1.63	3.31E-02
GOCC_ENDOPLASMIC_RETICULUM_LUMEN	1.70	1.05E-04	1.50	2.65E-02
GOMF_SIGNALING_RECEPTOR_REGULATOR_ACTIVITY	1.62	3.92E-04	1.37	7.62E-02
GOCC_COLLAGEN_CONTAINING_EXTRACELLULAR_MATRIX	1.40	2.32E-02	1.53	6.60E-03
GOBP_WOUND_HEALING	1.35	4.83E-02	1.45	2.65E-02
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	1.45	1.13E-02	1.34	7.51E-02
GOBP_CELLULAR_RESPONSE_TO_HORMONE_STIMULUS	1.41	7.84E-03	1.38	3.41E-02
GOBP_MUSCLE_SYSTEM_PROCESS	1.31	8.23E-02	1.47	2.65E-02
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_LOCOMOTION	1.27	7.45E-02	1.47	7.98E-03
GOCC_EXTERNAL_ENCAPSULATING_STRUCTURE	1.33	3.51E-02	1.39	2.65E-02
GOBP_TRANSMEMBRANE_RECEPTOR_PROTEIN_TYROSINE_KINASE_SIGNALING_PATHWAY	1.35	2.12E-02	1.35	2.65E-02
GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION	1.35	4.45E-02	1.34	7.19E-02
GOBP_REGULATION_OF_PEPTIDASE_ACTIVITY	1.30	6.92E-02	1.36	6.74E-02
GOBP_REGULATION_OF_ANATOMICAL_STRUCTURE_SIZE	1.30	8.03E-02	1.33	6.74E-02
GOBP_BLOOD_VESSEL_MORPHOGENESIS	1.33	2.38E-02	1.30	7.19E-02
GOBP_RESPONSE_TO_WOUNDING	1.28	8.41E-02	1.27	8.20E-02

Tabla 27. Vías aumentadas en las líneas G02 y G03 mostrando el nombre de la vía. GOBP indica vías de procesos biológicos de Gene Ontology, GOCC indica vías de compartimientos celulares de Gene Ontology, GOMF indica vías de funciones moleculares de Gene Ontology, REACTOME indica vías de la Reactome. HALLMARK indica vías de la colección Hallmarks de MSigDB. VEN representa el valor normalizado de enriquecimiento de la vía y p adj el valor p ajustado por múltiples comparaciones del enriquecimiento de la vía. En negrita están marcadas las vías con relación a migración, invasión o procesos relacionados.

Al analizar estas vías enriquecidas y disminuidas, algunas se destacaron por su posible asociación con la migración y la invasión. Como se puede observar en la Tabla 27, en las vías aumentadas tanto en la línea G02 como en la línea G03 (líneas de CMG que en normoxia muestran una capacidad migratoria similar), se encontraron vías relacionadas a la MEC (COLLAGEN CONTAINING EXTRACELLULAR MATRIX, EXTERNAL ENCAPSULATING STRUCTURE y EXTRACELLULAR MATRIX STRUCTURAL CONSTITUENT). El enriquecimiento de estas vías podría estar indicando una mayor cantidad de componentes de la matriz extracelular, lo cual podría afectar el equilibrio de adhesión y liberación, necesario para

migrar. Al analizar las vías disminuidas en las líneas G08 y G09 líneas de CMG que en normoxia muestran una capacidad migratoria similar) (Tabla 17), resultan interesantes algunas vías asociadas a la adhesión celular (CELL_SUBSTRATE_ADHESION). Estas vías disminuidas podrían estar indicando que estas líneas celulares tienen menor adhesión a su entorno. Cabe recordar que no fue posible encontrar vías enriquecidas compartidas por las líneas G08 y G09 ni vías disminuidas compartidas por G02 y G03 (Figura 31).

Nombre oficial de vía	G08		G09	
	VEN	padj	VEN	padj
GOBP_EPITHELIAL_CELL_APOPTOTIC_PROCESS	-1.80	2.05E-02	-1.58	8.63E-03
REACTOME_SENSORY_PROCESSING_OF_SOUND	-1.81	2.13E-02	-1.50	4.08E-02
GOBP_REGULATION_OF_EXTRINSIC_APOPTOTIC_SIGNALING_PATHWAY	-1.67	4.27E-02	-1.63	1.00E-03
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_LIPID_TRANSPORT	-1.70	8.20E-02	-1.60	1.29E-02
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_APOPTOTIC_SIGNALING_PATHWAY	-1.66	4.70E-02	-1.62	2.04E-03
HALLMARK_APICAL_JUNCTION	-1.63	4.19E-02	-1.52	4.90E-03
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_PROTEASOMAL_UBIQUITIN_DEPENDENT_PROTEIN_CATABOLIC_PROCESS	-1.66	8.34E-02	-1.45	6.23E-02
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	-1.48	9.34E-02	-1.61	2.63E-04
GOBP_WOUND_HEALING	-1.52	4.39E-02	-1.56	5.83E-05
GOBP_EXTRINSIC_APOPTOTIC_SIGNALING_PATHWAY	-1.57	4.39E-02	-1.50	5.09E-03
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_UBIQUITIN_DEPENDENT_PROTEIN_CATABOLIC_PROCESS	-1.66	4.70E-02	-1.40	7.25E-02
GOBP_TRANSFORMING_GROWTH_FACTOR_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1.58	4.70E-02	-1.48	8.97E-03
GOBP_CELL_MATRIX_ADHESION	-1.56	4.70E-02	-1.48	5.20E-03
GOBP_REGULATION_OF_APOPTOTIC_SIGNALING_PATHWAY	-1.58	1.72E-02	-1.45	2.11E-03
GOCC_CLUSTER_OF_ACTIN_BASED_CELL_PROJECTIONS	-1.60	8.34E-02	-1.40	7.25E-02
GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION	-1.55	2.05E-02	-1.45	3.80E-03
KEGG_FOCAL_ADHESION	-1.55	5.23E-02	-1.43	2.39E-02
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_PROTEOLYSIS_INVOLVED_IN_CELLULAR_PROTEIN_CATABOLIC_PROCESS	-1.56	8.50E-02	-1.36	7.22E-02
GOBP_RESPONSE_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM_STRESS	-1.57	4.57E-02	-1.33	5.27E-02
GOBP_REGULATION_OF_CELL_SUBSTRATE_ADHESION	-1.56	4.70E-02	-1.33	8.63E-02
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_PROTEOLYSIS	-1.43	8.34E-02	-1.43	3.01E-03
GOBP_BLOOD_VESSEL_MORPHOGENESIS	-1.40	4.70E-02	-1.45	1.86E-04
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_INTRACELLULAR_SIGNAL_TRANSDUCTION	-1.45	4.27E-02	-1.36	4.47E-03
GOBP_RESPONSE_TO_OXYGEN_LEVELS	-1.47	5.89E-02	-1.34	4.20E-02
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_DEATH	-1.41	4.39E-02	-1.36	4.88E-03

Tabla 28. Vías disminuidas significativamente en G08 y G09 mostrando el nombre de la vía. GOBP indica vías de procesos biológicos de Gene Ontology, GOCC indica vías de compartimientos celulares de Gene Ontology, GOMF indica vías de funciones moleculares de Gene Ontology, REACTOME indica vías de la Reactome. HALLMARK indica vías de la colección Hallmarks de MSigDB. NES representa el valor normalizado de enriquecimiento de la vía y padj el valor p ajustado por múltiples comparaciones del enriquecimiento de la vía.

Al comparar la Tabla 27 y la Tabla 28, es decir, teniendo en cuenta vías que estén enriquecidas en las líneas G02 y G03 y a la vez disminuidas en las líneas G08 y G09, pudimos detectar cuatro vías en común, de las cuales son particularmente interesantes la vía asociada a la adhesión celular a sustrato (GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION) y la de transición epitelio mesenquimal (HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION). Considerando los resultados de adhesión (Figura 20 y Figura 21) en donde se observó que las líneas G02 y G03 muestran mayor adhesión por el Geltrex, es interesante ver que la vía de adhesión celular al sustrato esta enriquecida en las líneas G02 y G03 comparado con las líneas G08 y G09. Para analizar qué genes dentro de estas vías están generando el enriquecimiento y la disminución en cada caso, se analizaron los genes líderes de estas vías en cada línea celular. En la Tabla 29 se indican los genes líderes del enriquecimiento de la vía de adhesión celular al sustrato (GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION) en las líneas G02 y G03. Notablemente, dentro de esta tabla se encuentra ITGA4, un gen que había surgido previamente por su baja expresión en la línea G09. En la Tabla 30 se ven algunos de los genes líderes de la disminución de la vía de adhesión celular al sustrato (GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION) en las líneas G08 y G09. Es interesante notar que, entre estas tablas, sólo se comparten cuatro genes: FOXF1 (Forkhead Box F1), ITGA4 (Integrin Subunit Alpha 4), VAMP3 (Vesicle Associated Membrane Protein 3) y NID1 (Nidogen 1).

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado cpmpleto (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
FOXF1	5.22	2.84	4.26	4.05	-2.77	-4.26	-3.54	-4.26	Forkhead Box F1
ITGA4	5.40	4.47	5.49	5.39	0.64	0.42	-4.26	-4.26	Integrin Subunit Alpha 4
VAMP3	7.17	7.47	7.30	7.23	6.33	6.12	6.38	6.27	Vesicle Associated Membrane Protein 3
NID1	7.49	6.84	7.50	6.94	6.26	6.26	5.76	6.12	Nidogen 1
NTNG1	2.78	-1.34	5.49	5.74	1.20	1.13	-4.26	-4.26	Netrin G1

Tabla 29. Genes líderes en G02 y G03 de la vía GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
COL8A1	8.19	8.19	8.99	8.76	2.37	1.72	-4.26	-3.10	Collagen Type VIII Alpha 1 Chain
ITGA1	2.39	2.77	6.84	6.74	-3.50	-2.85	-4.26	-3.94	Integrin Subunit Alpha 1
FOXF1	5.22	2.84	4.26	4.05	-2.77	-4.26	-3.54	-4.26	Forkhead Box F1
DAB2	2.34	1.56	5.75	5.85	-3.52	-2.80	-4.26	-4.26	DAB Adaptor Protein 2
EFNA5	2.55	0.71	4.11	4.14	-4.26	-4.26	-4.26	-4.26	Ephrin A5
ITGBL1	5.27	5.69	5.96	6.19	0.91	0.55	-3.69	-2.97	Integrin Subunit Beta Like 1
ITGA4	5.40	4.47	5.49	5.39	0.64	0.42	-4.26	-4.26	Integrin Subunit Alpha 4
SPOCK1	7.29	7.28	9.00	9.18	3.49	3.43	0.15	-1.02	SPARC (Osteonectin), Cwcv and Kazal Like Domains Proteoglycan 1
PPFIA2	4.82	2.29	5.19	5.59	-0.01	-0.64	-3.64	-4.26	PTPRF Interacting Protein Alpha 2
DOCK5	4.98	3.42	-1.34	-1.57	-3.84	-4.26	-3.89	-3.75	Dedicator Of Cytokinesis 5
FN1	8.07	9.56	10.61	11.19	5.34	5.52	4.80	5.44	Fibronectin 1
NDNF	1.49	1.15	-0.98	-0.04	-3.75	-4.26	-4.26	-3.84	Neuron Derived Neurotrophic Factor
THBS1	8.14	5.20	9.16	8.85	5.82	5.10	5.70	5.18	Thrombospondin 1
RELL2	3.34	3.70	3.17	3.09	1.49	1.36	0.80	0.56	RELT Like 2
SDC4	5.43	8.52	6.43	6.48	4.43	4.70	4.18	4.51	Syndecan 4
SKAP1	-1.22	-4.26	-0.16	-1.77	-3.94	-4.26	-3.95	-4.26	Src Kinase Associated Phosphoprotein 1

Tabla 30. Genes líderes en las líneas G08 y G09 de la vía GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

En cuanto a la vía de TEM (HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION) es interesante notar que G02 y G03 tienen esta vía enriquecida en comparación con G08 y G09

pero en la mayoría de la literatura esta vía está asociada a mayor migración¹⁸³, inversamente a lo observado en estas líneas. Aun así, hay publicaciones que describen una disminución de migración en carcinoma luego de la transición epitelio-mesenquimal y postulan que no siempre van de la mano³¹⁴.

Enriquecimiento y disminución de vías en respuesta a hipoxia

Luego de determinar las vías que están diferencialmente enriquecidas en las distintas líneas de CMG, decidimos evaluar el efecto de la hipoxia. En base a los genes diferencialmente expresados, se analizaron las vías utilizando las enciclopedias de *Gene Ontology* (los subconjuntos: procesos biológicos, funciones moleculares, compartimentos celulares), de KEGG, REACTOME y HALLMARKS. Para cada línea, se obtuvo un valor de enriquecimiento normalizado para cada vía.

Con el objetivo de relacionar las vías con la capacidad migratoria de las CMG (observados en hipoxia), se seleccionaron aquellas que cambian en respuesta a hipoxia siguiendo un patrón similar al de los cambios observados en los ensayos de migración in vitro (Figura 12). En este análisis, se buscaron los subconjuntos compartidos, por un lado, entre las líneas G08 y G09 (que aumentan la migración en hipoxia) y, por el otro, en la línea G02, cuya migración disminuye con hipoxia. En la Figura 32 se observa el diagrama de Venn que muestra la cantidad de vías enriquecidas exclusivamente en una línea o en varias líneas a la vez.

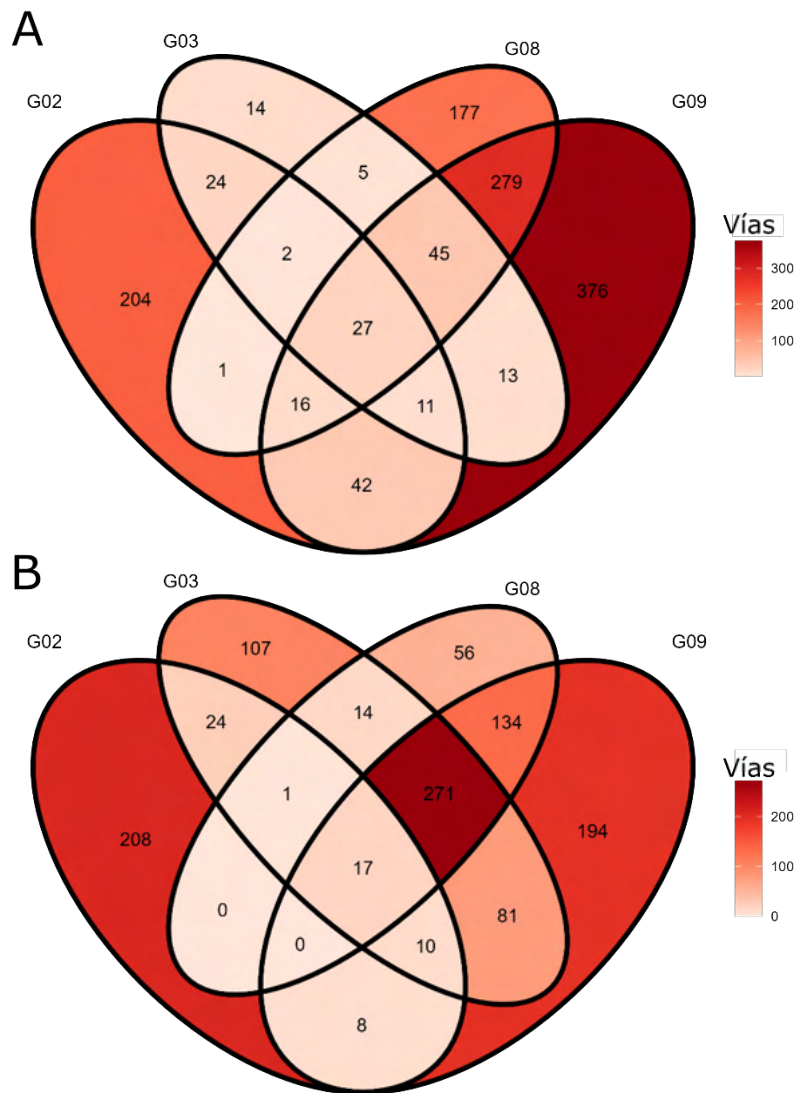


Figura 32. Diagrama de Venn mostrando cantidad de vías enriquecidas (A) o disminuidas (B) en respuesta a hipoxia en cada línea de CMG o en varias líneas a la vez (p ajustado < 0.05). La intensidad de color corresponde a la cantidad de vías en cada subconjunto.

Con el fin de identificar posibles vías que inhiban la migración en estas CMG determinamos veinte (20) de las vías enriquecidas en la línea G02 (la única línea cuya migración disminuye

significativamente con hipoxia), y disminuidas en las líneas G08 y G09 (en las que se ve un aumento de la migración con hipoxia) (Tabla 31). Entre estas vías no parece haber ninguna ligada a la migración, invasión o a procesos relacionados. En las otras 40 vías no mostradas tampoco se observaron vías asociadas a estos procesos.

	G02		G08		G09	
Nombre oficial de vía	VEN	P adj	VEN	P adj	VEN	P adj
GOCC_INNER_MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PROTEIN_COMPLEX	2.07	8.41E-08	-2.22	1.28E-08	-2.17	4.58E-08
REACTOME_RRNA_PROCESSING	2.29	9.09E-18	-2.00	1.54E-07	-1.86	2.17E-06
GOBP_RIBOSOME_BIOGENESIS	1.76	1.17E-06	-2.35	9.55E-17	-2.54	4.58E-24
GOBP_ATP_SYNTHESIS_COUPLED_ELECTRON_TRANSPORT	2.02	3.24E-05	-2.37	1.16E-07	-1.97	1.92E-04
REACTOME_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT	1.93	1.33E-04	-2.34	5.32E-09	-2.14	1.53E-06
REACTOME_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT_ATP_SYNTHESIS_BY_CHEMIOSMOTIC_COUPLING_AND_HEAT_PRODUCTION_BY_UNCOUPLING_PROTEINS	1.93	4.31E-05	-2.39	1.27E-10	-2.09	9.31E-07
GOCC_U2_TYPE_SPLICEOSOMAL_COMPLEX	2.06	3.44E-06	-1.93	1.68E-04	-2.26	4.18E-08
REACTOME_TRANSLATION	2.28	9.12E-23	-2.15	6.82E-12	-1.57	3.03E-04
KEGG_SPLICEOSOME	1.77	1.25E-03	-2.17	3.11E-08	-2.53	5.44E-14
REACTOME_DEFECTIVE_CFTR_CAUSES_CYSTIC_FIBROSIS	1.74	1.72E-02	-2.43	1.19E-07	-2.30	7.12E-07
GOCC_MITOCHONDRIAL_PROTEIN_CONTAINING_COMPLEX	1.94	9.01E-10	-2.15	5.51E-11	-2.18	1.54E-12
GOCC_RESPIRASOME	2.10	1.43E-06	-2.15	6.81E-06	-1.85	4.79E-04
REACTOME_MITOCHONDRIAL_TRANSLATION	1.72	6.52E-03	-2.28	1.08E-07	-2.46	5.40E-10
GOCC_ORGANELLAR_RIBOSOME	1.80	1.47E-03	-2.17	4.71E-06	-2.39	8.95E-09
REACTOME_RRNA_MODIFICATION_IN_THE_NUCLEUS_AND_CYTOSOL	1.78	9.75E-03	-2.11	8.22E-05	-2.47	2.27E-08
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	2.24	2.52E-10	-2.04	7.67E-06	-1.59	7.68E-03
REACTOME_HEDGEHOG_LIGAND_BIOGENESIS	1.66	3.50E-02	-2.43	6.52E-08	-2.31	1.44E-06
GOMF_OXIDOREDUCTION_DRIVEN_ACTIVE_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	2.03	8.39E-05	-2.17	5.51E-05	-1.81	4.18E-03
GOBP_RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX_BIOGENESIS	1.66	9.13E-07	-2.17	2.12E-17	-2.50	9.42E-28
GOCC_PRECATALYTIC_SPLICEOSOME	1.90	1.85E-03	-1.89	2.54E-03	-2.29	1.74E-06
GOCC_NADH_DEHYDROGENASE_COMPLEX	1.89	4.02E-03	-2.13	6.04E-05	-2.06	2.83E-04
GOCC_INNER_MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PROTEIN_COMPLEX	2.07	8.41E-08	-2.22	1.28E-08	-2.17	4.58E-08
REACTOME_RRNA_PROCESSING	2.29	9.09E-18	-2.00	1.54E-07	-1.86	2.17E-06

GOBP_RIBOSOME_BIOGENESIS	1.76	1.17E-06	-2.35	9.55E-17	-2.54	4.58E-24
--------------------------	------	----------	-------	----------	-------	----------

Tabla 31. Vías enriquecidas significativamente en las líneas G02 tratadas con hipoxia y disminuidas en G08 y G09 con hipoxia. GOBP indica vías de procesos biológicos de Gene Ontology, GOCC indica vías de compartimientos celulares de Gene Ontology, GOMF indica vías de funciones moleculares de Gene Ontology, REACTOME indica vías de la Reactome. HALLMARK indica vías de la colección Hallmarks de MSigDB. NES representa el valor normalizado de enriquecimiento de la vía y padj el valor p ajustado por múltiples comparaciones del enriquecimiento de la vía.

Luego, con el fin de identificar vías que promuevan la migración de estas células, determinamos veinte (20) de las vías enriquecidas en las líneas G08 y G09 (en las que se ve un aumento de la migración con hipoxia) y disminuidas en la línea G02 (la única línea cuya migración disminuye significativamente con hipoxia), y disminuidas en las líneas (Tabla 33). Hay varias vías que pueden estar asociadas a la migración indirectamente, tales como las que están asociadas a las proyecciones neuronales (GOBP_NEURON_PROJECTION_GUIDANCE) y a la formación de axones (GOBP_REGULATION_OF_AXONOGENESIS). Es notable que, entre las vías aumentadas, se encuentran varias vías asociadas a la adhesión celular, particularmente a la adhesión célula-célula. Aun así, no se observa ninguna vía directamente asociada a la migración.

	G02		G08		G09	
Nombre oficial de vía	VEN	P adj	VEN	P adj	VEN	P adj
GOBP_NEURON_PROJECTION_GUIDANCE	-1.59	2.18E-03	1.95	4.57E-07	1.97	4.05E-08
GOBP_NON_CANONICAL_WNT_SIGNALING_PATHWAY	-1.90	1.94E-03	1.70	6.68E-03	1.53	3.53E-02
GOBP_REGULATION_OF_AXONOGENESIS	-1.56	4.07E-03	1.79	2.51E-04	1.98	1.64E-06
GOBP_STEM_CELL_DIFFERENTIATION	-1.87	8.12E-06	1.51	1.85E-02	1.47	1.06E-02
GOBP_MESENCHYMAL_CELL_DEVELOPMENT	-1.54	4.56E-02	1.75	7.81E-03	1.88	1.24E-04
GOBP_NEURAL_CREST_CELL_DIFFERENTIATION	-1.50	3.71E-02	1.79	2.05E-03	1.90	1.45E-04
GOBP_SYNAPSE_ASSEMBLY	-1.86	4.44E-05	1.52	2.85E-02	1.42	3.02E-02
GOBP_HOMOPHILIC_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES	-1.56	7.08E-03	1.76	4.86E-04	1.72	7.88E-04
GOBP_AXON_DEVELOPMENT	-1.51	2.08E-05	1.73	1.04E-06	1.79	6.70E-09
GOBP_REGULATION_OF_SMALL_GTPASE_MEDIATED_SIGNAL_TRANSDUCTION	-1.72	1.56E-06	1.56	4.66E-03	1.53	4.55E-03

GOBP_CELL_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES	-1.44	5.11E-03	1.86	6.31E-06	1.61	1.05E-03
GOBP_SYNAPSE_ORGANIZATION	-1.48	2.53E-04	1.66	2.47E-05	1.70	2.17E-06
GOBP_REGULATION_OF_NEURON_PROJECTION_DEVELOPMENT	-1.40	3.58E-04	1.70	1.93E-06	1.79	3.79E-08
GOCC_INTRINSIC_COMPONENT_OF_POSTSYNAPTIC_MEMBRANE	-1.49	3.44E-02	1.71	6.74E-03	1.51	2.79E-02
GOBP_REGULATION_OF_RHO_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION	-1.49	4.95E-02	1.59	4.11E-02	1.56	2.72E-02
GOBP_DENDRITE_MORPHOGENESIS	-1.58	5.31E-03	1.52	2.66E-02	1.44	4.06E-02
GOBP_REGULATION_OF_RAS_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION	-1.43	3.94E-02	1.59	9.38E-03	1.66	1.43E-03
GOCC_INTRINSIC_COMPONENT_OF_SYNAPTIC_MEMBRANE	-1.42	3.46E-02	1.70	2.37E-03	1.55	1.32E-02
KEGG_AXON_GUIDANCE	-1.40	4.41E-02	1.57	2.56E-02	1.68	2.63E-03
GOBP_ESTABLISHMENT_OF_TISSUE_POLARITY	-1.49	4.62E-02	1.58	4.89E-02	1.44	4.41E-02
GOBP_REGULATION_OF_CELL_MORPHOGENESIS	-1.48	1.09E-03	1.62	4.94E-04	1.37	3.13E-02
GOMF_GUANYL_NUCLEOTIDE_EXCHANGE_FACTOR_ACTIVITY	-1.49	8.76E-03	1.53	1.05E-02	1.41	2.85E-02
GOBP_REGULATION_OF_GTPASE_ACTIVITY	-1.40	1.33E-03	1.58	1.52E-03	1.44	5.41E-03
GOBP_REGULATION_OF_NEUROGENESIS	-1.26	1.91E-02	1.64	1.78E-04	1.59	2.47E-04
GOBP_CELL_FATE_COMMITMENT	-1.40	2.55E-02	1.43	3.88E-02	1.52	7.18E-03
GOBP_REGULATION_OF_NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	-1.19	4.46E-02	1.65	5.75E-05	1.61	2.02E-05
GOMF_NUCLEOSIDE_TRIPHOSPHATASE_REGULATOR_ACTIVITY	-1.37	4.28E-04	1.47	3.89E-03	1.42	2.55E-03
GOBP_RESPONSE_TO_TRANSFORMING_GROWTH_FACTOR_BETA	-1.29	3.81E-02	1.45	3.71E-02	1.57	1.82E-03
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_PROJECTION_ORGANIZATION	-1.29	1.74E-02	1.56	8.96E-04	1.38	1.30E-02
GOBP_CAMERA_TYPE_EYE_DEVELOPMENT	-1.36	4.64E-03	1.45	1.57E-02	1.34	4.60E-02
GOBP_REGULATION_OF_CELL_DEVELOPMENT	-1.18	3.68E-02	1.61	1.08E-04	1.54	1.30E-04
GOBP_SMALL_GTPASE_MEDIATED_SIGNAL_TRANSDUCTION	-1.43	5.99E-05	1.31	3.83E-02	1.31	2.05E-02
GOBP_SENSORY_ORGAN_DEVELOPMENT	-1.25	7.13E-03	1.43	4.42E-03	1.30	2.61E-02
GOBP_EMBRYONIC_ORGAN_DEVELOPMENT	-1.19	4.65E-02	1.49	3.22E-03	1.34	2.07E-02
GOMF_PROTEIN_SERINE_THREONINE_TYROSINE_KINASE_ACTIVITY	-1.21	3.07E-02	1.34	4.99E-02	1.35	2.45E-02

Tabla 32. Vías enriquecidas en las líneas G08 y G09 con hipoxia y disminución en G02 con hipoxia. GOBP indica vías de procesos biológicos de Gene Ontology, GOCC indica vías de compartimientos celulares de Gene Ontology, GOMF indica vías de funciones moleculares de Gene Ontology, REACTOME indica vías de la Reactome. HALLMARK indica vías de la colección Hallmarks de MSigDB. NES representa el valor normalizado

de enriquecimiento de la vía y $padj$ el valor p ajustado por múltiples comparaciones del enriquecimiento de la vía.

También fue interesante analizar vías aumentadas en las líneas G08 y G09, independientemente de su comportamiento en la línea G02. Por la gran cantidad de genes aumentados en ambas líneas, para la confección de esta tabla se seleccionaron las 25 vías que mostraron más veces de cambio en hipoxia y aquellas que se relacionan directamente con la migración celular (Tabla 33).

Nombre oficial de vía	G08		G09	
	VEN	$padj$	VEN	$padj$
GOBP_NEURON_PROJECTION_EXTENSION_INVOLVED_IN_NEURON_PROJECTION_GUIDANCE	1.91	1.91E-03	2.33	5.66E-08
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_AXON_EXTENSION_INVOLVED_IN_AXON_GUIDANCE	1.81	1.47E-02	2.23	2.10E-06
GOBP_SEMAPHORIN_PLEXIN_SIGNALING_PATHWAY	1.94	8.12E-04	2.10	1.87E-05
GOBP_NEURAL_CREST_CELL_MIGRATION	1.86	1.73E-03	2.08	4.50E-05
GOBP_NEURON_PROJECTION_GUIDANCE	1.94	5.26E-07	1.99	6.66E-08
GOBP_ARTERY_MORPHOGENESIS	1.86	1.76E-03	2.07	1.14E-05
GOBP_VASCULAR_ENDOTHELIAL_GROWTH_FACTOR_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.93	1.19E-03	2.00	2.89E-04
GOBP_GLIAL_CELL_DEVELOPMENT	1.98	5.67E-05	1.94	3.36E-05
GOBP_CYCLIC_NUCLEOTIDE_MEDIATED_SIGNALING	1.87	1.94E-03	2.04	3.83E-05
GOBP_ADENYLATE_CYCLASE_ACTIVATING_G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.88	5.16E-04	1.97	2.46E-05
GOBP_CAMP_MEDIATED_SIGNALING	1.95	1.54E-03	1.89	2.22E-03
GOBP_CHEMICAL_HOMEOSTASIS_WITHIN_A_TISSUE	1.92	1.59E-03	1.91	3.27E-03
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_AXON_EXTENSION	1.73	9.69E-03	2.09	4.95E-05
GOBP_ARTERY_DEVELOPMENT	1.93	1.57E-04	1.88	1.15E-04
GOBP_NEURON_PROJECTION_EXTENSION	1.78	2.75E-04	2.01	3.10E-07
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_PROJECTION_ORGANIZATION	1.75	3.50E-04	2.03	5.99E-08
GOBP_NEUROMUSCULAR_PROCESS_CONTROLLING_BALANCE	1.72	2.39E-02	2.06	7.59E-05
GOBP_REGULATION_OF_AXONOGENESIS	1.78	4.57E-04	1.99	1.43E-06
GOMF_CHEMOREPELLENT_ACTIVITY	1.69	4.24E-02	2.06	2.15E-04
GOMF_SEMAPHORIN_RECEPTOR_BINDING	1.67	4.87E-02	2.05	2.47E-04
GOBP_NEURAL_CREST_CELL_DIFFERENTIATION	1.79	3.97E-03	1.92	1.06E-04
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_DEVELOPMENT	1.81	1.32E-04	1.90	7.01E-06
GOBP_ADENYLATE_CYCLASE_MODULATING_G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.82	2.14E-04	1.89	3.21E-05
GOBP_REGULATION_OF_EXTENT_OF_CELL_GROWTH	1.75	2.67E-03	1.95	4.77E-05

GOBP_DEVELOPMENTAL_GROWTH_INVOLVED_IN_MORPHOGENESIS	1.72	2.98E-04	1.97	5.71E-08
GOBP_AXON_EXTENSION	1.71	3.38E-03	1.96	7.48E-06
Asociados a migración				
GOBP_REGULATION_OF_CELL_CELL_ADHESION_MEDIATED_BY_CADHERIN	1.80	1.73E-02	1.69	3.41E-02
GOBP_CELL_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES	1.84	1.33E-05	1.62	3.66E-04
GOMF_EXTRACELLULAR_MATRIX_STRUCTURAL_CONSTITUENT	1.63	7.38E-03	1.77	1.30E-04
GOCC_EXTERNAL_ENCAPSULATING_STRUCTURE	1.57	3.10E-04	1.79	4.75E-08
REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	1.66	3.84E-04	1.69	8.07E-05
GOBP_EXTERNAL_ENCAPSULATING_STRUCTURE_ORGANIZATION	1.41	4.81E-02	1.83	1.22E-06
GOBP_NEURON_MIGRATION	1.69	2.58E-03	1.44	2.70E-02
KEGG_FOCAL_ADHESION	1.66	1.96E-03	1.45	2.10E-02
GOBP_REGULATION_OF_CELL_SUBSTRATE_ADHESION	1.63	3.91E-03	1.44	2.52E-02
GOBP_REGULATION_OF_CELL_MATRIX_ADHESION	1.58	1.73E-02	1.43	4.30E-02
GOBP_CELL_MATRIX_ADHESION	1.59	5.84E-03	1.42	2.41E-02
GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION	1.50	5.02E-03	1.47	2.72E-03

Tabla 33. Vías enriquecidas en las líneas G08 y G09 con hipoxia (25 vías con mayores veces de cambio o fold change entre normoxia e hipoxia) sumadas a vías aumentadas elegidas por la asociación posible a migración. GOBP indica vías de procesos biológicos de Gene Ontology, GOCC indica vías de compartimientos celulares de Gene Ontology, GOMF indica vías de funciones moleculares de Gene Ontology, REACTOME indica vías de la Reactome. HALLMARK indica vías de la colección Hallmarks de MSigDB. NES representa el valor normalizado de enriquecimiento de la vía y padj el valor p ajustado por múltiples comparaciones del enriquecimiento de la vía.

Para indagar qué genes de estas vías podrían ser blancos terapéuticos potenciales, analizamos, en cada vía seleccionada, cuáles eran los genes que estaban generando el enriquecimiento o la disminución correspondiente. Una vía de interés resultó ser la de adhesión celular al sustrato (GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION), ya que había surgido también cuando se analizaron las vías diferencialmente enriquecidas entre líneas de CMG (en normoxia). Es notable que en las líneas G02 y G03, esta vía se encuentra basalmente más expresada que en las líneas G08 y G09, pero que en estas últimas esta vía se induce en hipoxia. Aunque esto puede parecer contradictorio, la relación entre adhesión y migración no es lineal ya que la migración se inhibe a niveles de adhesión muy altos o bajos. Considerando que las líneas G08 y G09 mostraron menor adhesión que las líneas G02 y

G03, es posible que en estas líneas el aumento de adhesión promueva la migración mientras que en las líneas G02 y G03 la esté inhibiendo.

Dado estos resultados, nos resultó interesante indagar en si los genes que definen el enriquecimiento de la vía en las líneas G02 y G03 en condiciones basales (normoxia), y los genes de esta vía que se inducen en hipoxia en las líneas G08 y G09 son los mismos. Para ello, analizamos los genes de *leading edge*, o genes líderes, que son los que definen el enriquecimiento de la vía. En la Tabla 34 se pueden ver 20 de los genes líderes responsable por el aumento en hipoxia de esta vía en las líneas G08 y G09.

Al comparar esta (Tabla 34) lista de genes con la de la Tabla 29 y la Tabla 30 no se observan muchos genes en común. Esto nos indicaría que por más que la vía esta aumentada en las líneas G02 y G03 basalmente, cuando esta misma vía se activa en hipoxia en las líneas G08 y G09 no sería por los mismos genes. Sin embargo, llama la atención CSPG5, ya que no sólo cambia su expresión en respuesta a hipoxia siguiendo el mismo patrón que el de los cambios en la migración, sino porque además es uno de los genes que basalmente se encontraba altamente expresado en las líneas G08 y G09 (líneas de alta migración) y con expresión reducida en las líneas G02 y G03 (líneas de baja migración).

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
	N	H	N	H	N	H	N	H	
VEGFA	6.36	10.14	4.97	8.94	7.49	9.86	6.16	10.21	Vascular Endothelial Growth Factor A
ACVRL1	-2.33	-4.26	-0.26	0.90	-4.26	-1.92	-3.43	-1.65	Activin A Receptor Like Type 1
FBLN2	-1.49	2.81	4.98	5.35	2.08	2.80	-0.08	2.26	Fibulin 2
TNXB	1.09	4.78	1.92	3.16	1.05	1.68	0.50	2.28	Tenascin XB
MELTF	2.86	3.83	1.25	2.00	2.02	2.62	2.54	4.29	Melanotransferrin
ONECUT2	3.03	2.01	2.77	4.13	3.18	3.76	1.54	2.95	One Cut Homeobox 2
COL1A1	3.69	7.99	7.61	8.55	4.14	4.53	3.61	5.18	Collagen Type I Alpha 1 Chain
VCAM1	4.17	0.98	0.19	1.03	4.71	5.03	4.49	6.11	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
L1CAM	6.23	8.05	8.41	8.54	5.75	6.27	6.93	8.27	L1 Cell Adhesion Molecule
ATP1B2	7.35	6.31	1.69	2.92	7.99	8.38	6.90	8.32	ATPase Na+/K+ Transporting Subunit Beta 2

FAM107A	1.56	-1.22	0.43	-0.79	3.83	4.32	3.76	4.92	Family With Sequence Similarity 107 Member A
ITGA2B	-0.92	-0.41	-0.24	0.27	-0.65	-0.13	-1.11	0.03	Integrin Subunit Alpha 2b
PKD1	7.16	8.92	7.34	7.77	6.56	7.01	6.37	7.57	Polycystin 1, Transient Receptor Potential Channel Interacting
UNC13D	0.64	2.24	-0.21	1.45	0.94	1.61	0.48	1.44	Unc-13 Homolog D
CSPG5	4.36	1.94	3.16	2.45	7.18	7.79	6.53	7.46	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 5

Tabla 34. 20 genes líderes de la vía de adhesión celular al sustrato (GOBP_CELL_SUBSTRATE_ADHESION), mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Otra vía particularmente interesante es la vía de migración de células de la cresta neural (GOBP_NEURAL_CREST_CELL_MIGRATION), ya que es una de las vías con mayor enriquecimiento en las líneas G08 y G09 y con clara asociación con la migración. Al analizar los genes líderes de esta vía compartidos entre las líneas G08 y G09 se puede observar que muchos de estos genes son semaforinas. Como se mencionó anteriormente las semaforinas son proteínas con dominios ricos en cisteína, que modulan el citoesqueleto y, por lo tanto, participan en procesos como la formación de axones, la formación de vasos y la motilidad celular^{254,273,315}. Laminina (LAMA5) y fibronectina (FN1) son componentes claves de la MEC, particularmente la matriz de la membrana basal, y ya se ha determinado el rol de estas proteínas en la migración e invasión en GBM^{34,161}. Aun así, en el caso de FN1, el estudio de esta proteína en estos procesos ha mostrado resultados contradictorios, y faltaría indagar más¹⁶¹. Por último, endotelina 1 (EDN1) es una proteína secretada por varios tipos de células del SNC y estudios en GBM realizados con la línea celular U251 demostraron que la endotelina exógena aumenta la migración en GBM³¹⁶.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado
	N	H	N	H	N	H	N	H	completo (inglés)
EDN1	3.73	1.25	3.31	5.05	2.80	4.30	1.32	2.74	Endothelin 1
SEMA4A	0.39	1.28	-0.97	-0.43	0.22	1.00	0.16	1.98	Semaphorin 4A
SEMA7A	2.71	3.29	-0.04	0.16	3.19	3.65	1.81	3.76	Semaphorin 7A (JohnMiltonHagen Blood Group)

FOLR1	4.67	5.80	2.67	4.65	4.39	4.98	3.08	4.06	Folate Receptor Alpha
SEMA5B	0.85	3.34	1.70	2.77	4.87	5.54	5.67	6.41	Semaphorin 5B
ANXA6	5.88	5.49	5.84	6.40	6.74	7.22	5.38	6.20	Annexin A6
EFNB1	5.29	6.20	2.89	2.86	6.08	6.43	6.16	7.03	Ephrin B1
SEMA6C	3.04	1.54	2.76	3.07	4.61	4.93	4.59	5.42	Semaphorin 6C
LAMA5	8.56	9.28	8.75	9.02	8.56	8.82	8.13	8.99	Laminin Subunit Alpha 5
SEMA4G	4.06	4.71	2.71	3.52	3.30	3.50	3.21	4.11	Semaphorin 4G
FN1	8.07	9.56	10.61	11.19	5.34	5.52	4.80	5.44	Fibronectin 1
SEMA6A	5.68	-0.16	7.96	7.95	7.93	8.05	6.72	7.28	Semaphorin 6A
SEMA4D	3.71	3.55	3.18	3.37	3.77	3.95	3.93	4.38	Semaphorin 4D

Tabla 35. Genes líderes de la vía de migración de células de la cresta neural (GOBP_NEURAL_CREST_CELL_MIGRATION), mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición.

Análisis de cambios en la vía de HIF1 en respuesta a hipoxia

Como se mencionó en la introducción, las proteínas HIF son los sensores de hipoxia más relevantes. Ya se ha observado que estas tienen un rol relevante en GBM, por lo que decidimos evaluar de qué manera se veía afectada la vía de HIF1 en hipoxia. Dado que en los experimentos de migración e invasión observamos que hay líneas de CMG en las que la hipoxia no conlleva un aumento de la capacidad migratoria e invasiva, surgió la hipótesis que en estas CMG se encuentre afectada la habilidad de detectar al oxígeno. Sin embargo, en los análisis de Progeny (Figura 29) y Dorotea (Figura 30) se observó que las vías de señalización asociadas a la hipoxia, incluyendo las de HIF1 α y HIF2 α (EPAS1) aumentan en todas las líneas de CMG, lo que nos permite descartar dicha hipótesis. Aun así, sería interesante profundizar el análisis de la vía de HIF1 e indagar sobre las particularidades de esta vía en las distintas líneas. En la Figura 33 (extremo derecho) se puede observar que en la línea G02 la hipoxia induce varios genes río abajo de HIF1 (en rojo), pero también se observan algunos que disminuyen (en celeste), como EGF, ANGPT (*Angiopoietin 1*), iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) y Tie-2 (*Angiopoietin-1 receptor*). Se puede observar, además, que de las vías río abajo de HIF1, la inducción del metabolismo anaeróbico parece ser la más fuerte (derecha inferior). En la línea G03 se puede observar que la gran mayoría

de los genes río abajo de HIF1 se encuentran inducidos con hipoxia, aunque hay algunos pocos que disminuyen (por ejemplo, al igual que en la línea G02, Tie-2 e iNOS). En la línea G08, al igual que en las líneas G02 y G03, se ve una fuerte inducción de genes asociados al metabolismo anaeróbico. A diferencia de las líneas G02 y G03, se observa una menor inducción de genes asociados a angiogénesis (sólo VEGF parece estar inducido). En esta línea Tie-2 también se observa disminuido con hipoxia. La línea G09 muestra un patrón parecido que G08, con menores inducciones que las líneas G02 y G03.

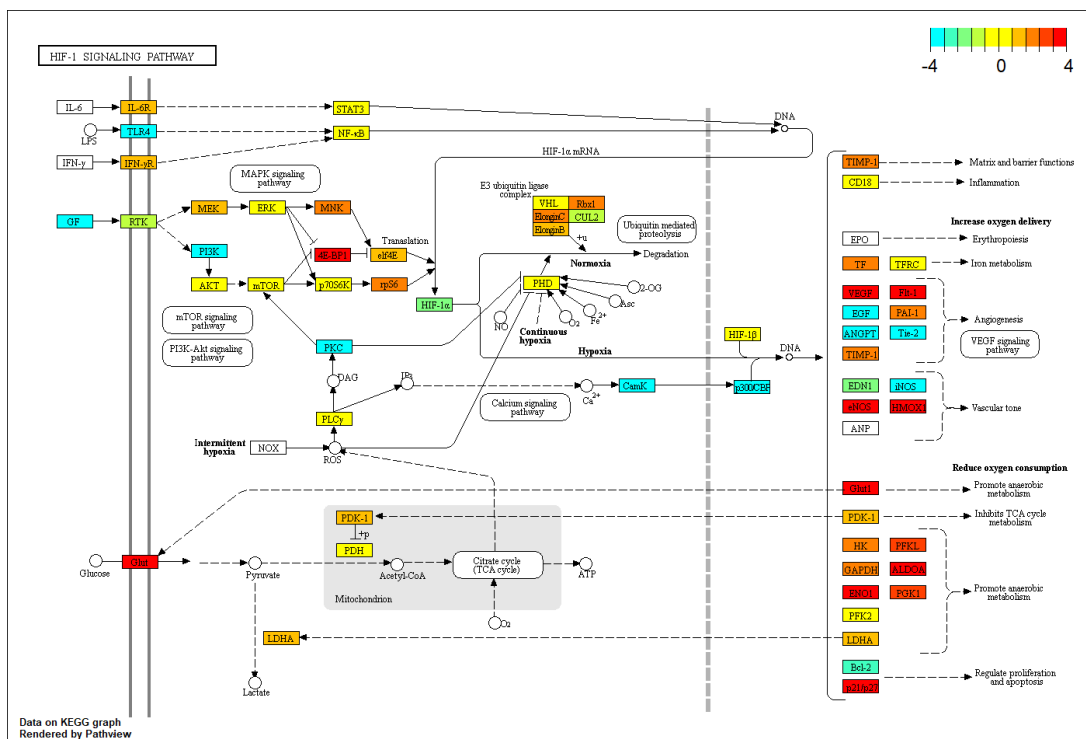


Figura 33. Mapa de vía de HIF1 de KEGG indicando genes aumentados o disminuidos en hipoxia en la línea G02.

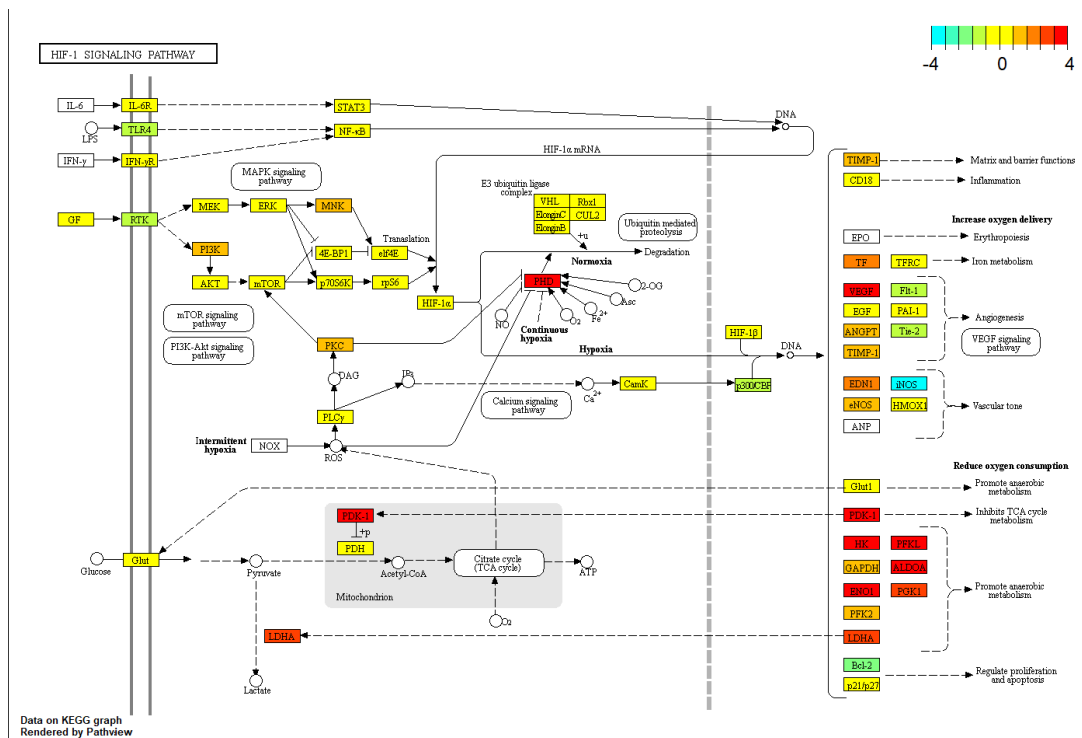


Figura 34. Mapa de vía de HIF1 de KEGG con genes aumentados o disminuidos en hipoxia en G03 indicados.

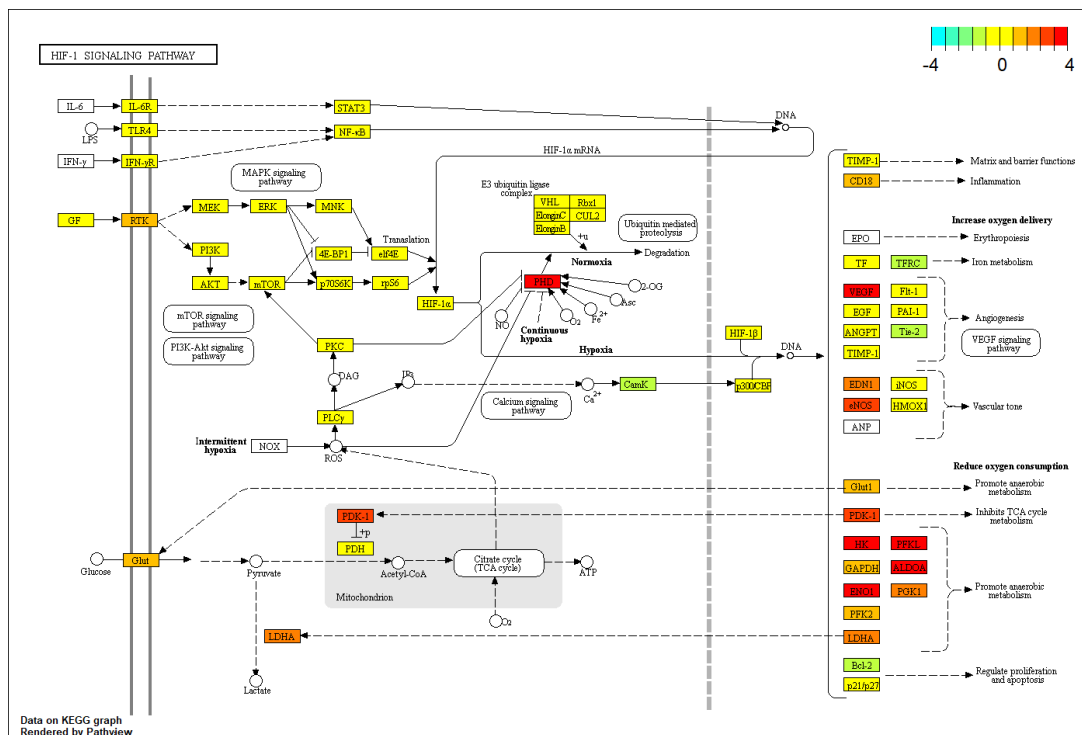


Figura 35. Mapa de vía de HIF1 de KEGG con genes aumentados o disminuidos en hipoxia en G08 indicados.

En base a estas figuras y los resultados del análisis Dorotea, no queda claro si la migración inducida por hipoxia en las líneas G08 y G09, esté ligada o no a la regulación de HIF1. Más



En base a estas figuras y los resultados del análisis Dorotea, no queda claro si la migración inducida por hipoxia en las líneas G08 y G09, esté ligada o no a la regulación de HIF1. Más

adelante en esta tesis, se mostrarán los resultados de ensayos *in vitro* que nos han permitido dar respuesta a este interrogante.

Posibles blancos para interferir en la migración o invasión

En base a todos los resultados se definió una lista de genes que podrían ser potencialmente relevantes para la migración e invasión en las líneas CMG. Esta lista incluye genes basados en sus niveles de expresión, tanto entre las diferentes líneas de CMG como en respuesta a hipoxia y en su rol en vías (*pathways*) relevantes para la migración e invasión o para la detección y respuesta a hipoxia. Es importante tener presente que algunos de los potenciales blancos seleccionados no muestran cambios de expresión génica, sino que participan de o controlan vías (*pathways*) que tienen relación con la migración/invasión celular. Por ejemplo, en el caso de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), un factor de transcripción que aumenta la migración y cuya vía esta enriquecida en la línea G08, la cual posee una alta migración e invasión.

En la Tabla 36 se muestran los 22 genes de esta lista con mayor expresión que siguen un patrón de expresión génica que podría explicar el comportamiento migratorio, y en la Tabla 37 se indican los genes que participan de vías (*pathways*) que podrían estar ligados a la migración de las CMG.

	G02		G03		G08		G09		Nombre completo (inglés)
Gen	N	H	N	H	N	H	N	H	
FN1	8.07	9.56	10.61	11.19	5.34	5.52	4.8	5.44	Fibronectin 1
NCAN	2.48	-0.85	2.92	2.66	9.69	10.19	7.62	8.81	Neurocan
LGALS3	7.72	7.87	9.38	9.4	9.23	9.41	7.64	7.9	Galectin 3
LAMA5	8.56	9.28	8.75	9.02	8.56	8.82	8.13	8.99	Laminin Subunit Alpha 5
COL8A1	8.19	8.19	8.99	8.76	2.37	1.72	-4.26	-3.1	Collagen Type VIII Alpha 1 Chain
SEMA5A	5.3	5.9	8.31	8.06	8.96	8.79	6.56	7.45	Semaphorin 5A

COL1A1	3.69	7.99	7.61	8.55	4.14	4.53	3.61	5.18	Collagen Type I Alpha 1 Chain
L1CAM	6.23	8.05	8.41	8.54	5.75	6.27	6.93	8.27	L1 Cell Adhesion Molecule
SDC4	5.43	8.52	6.43	6.48	4.43	4.7	4.18	4.51	Syndecan 4
ATP1B2	7.35	6.31	1.69	2.92	7.99	8.38	6.9	8.32	ATPase Na ⁺ /K ⁺ Transporting Subunit Beta 2
SEMA3C	8.32	5.54	7.02	7.23	-3.84	-4.26	-4.26	-4.26	Semaphorin 3C
SEMA6A	5.68	-0.16	7.96	7.95	7.93	8.05	6.72	7.28	Semaphorin 6A
CSPG5	4.36	1.94	3.16	2.45	7.18	7.79	6.53	7.46	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 5
HEPACAM	2.47	0.79	-1.17	-1.67	7.3	7.5	6.43	6.76	Hepatic And Glial Cell Adhesion Molecule
NID1	7.49	6.84	7.5	6.94	6.26	6.26	5.76	6.12	Nidogen 1
VAMP3	7.17	7.47	7.3	7.23	6.33	6.12	6.38	6.27	Vesicle Associated Membrane Protein 3
ANXA6	5.88	5.49	5.84	6.4	6.74	7.22	5.38	6.2	Annexin A6
BOC	7.31	3.81	6.07	6.06	7.28	7.60	6.89	7.50	BOC Cell Adhesion Associated, Oncogene Regulated
OPHN1	4.53	1.88	3.15	3.44	5.49	5.73	5.42	6.29	Oligophrenin 1
DCLK2	6.95	3.93	6.89	6.73	8.18	8.51	7.76	8.23	Doublecortin Like Kinase 2
SOCS1	2.29	4.05	0.06	0.39	0.77	-0.16	0.24	-1.18	Suppressor Of Cytokine Signaling 1
NNAT	-4.25	-4.25	4.58	4.32	-4.25	-4.25	-4.25	-3.72	Neuronatin
CAMSAP3	2.88	3.45	0.57	1.46	-0.78	0.10	2.61	3.43	Calmodulin Regulated Spectrin Associated Protein Family Member 3

Tabla 36. Genes seleccionados como posibles blancos para interferir en la migración y/o invasión en base a su expresión, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición. Los genes se encuentran ordenados por máximo de expresión entre condiciones.

	G02		G03		G08		G09		Nombre aprobado completo (inglés)
Gen	N	H	N	H	N	H	N	H	
HIF1A	7.23	5.23	7.21	7.21	6.82	6.47	6.52	6.65	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
TGFβ	7.06	8.84	7.85	7.72	6.20	6.22	6.14	6.29	Transforming Growth Factor Beta 1
STAT3	8.53	8.40	7.83	7.98	7.93	7.94	7.51	7.76	Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Tabla 37. Genes seleccionados como posibles blancos para interferir en la migración y/o invasión en base al enriquecimiento de las vías asociadas, mostrando el logaritmo base 2 de las cuentas por millón de lecturas en cada condición. Los genes se encuentran ordenados por máximo de expresión entre condiciones.

Conclusiones del capítulo

A lo largo de este capítulo se logró analizar los transcriptomas de las cuatro líneas de CMG: G02, G03, G08 y G09 y estudiar las diferencias entre ellos, tanto en condiciones basales (normoxia) como en respuesta a hipoxia. Al analizar las líneas globalmente, se observó que la mayor variabilidad entre muestras se debe a la línea celular, un resultado coherente con lo que se conoce de la heterogeneidad inter-tumoral en GBM. Se encontró que las líneas G08 y G09 tienen transcriptomas similares y que los transcriptomas de las líneas G03 y G02 son diferentes a los del resto de las líneas analizadas. Además, pudimos determinar que en la línea G02, el transcriptoma se ve considerablemente más afectado por la hipoxia que en el resto de las líneas analizadas, y que, incluso, los cambios de expresión en esta línea son más extremos. Luego, con el objetivo de encontrar genes responsables de las diferencias en la migración e invasión de las líneas de CMG, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes en cada una de las líneas respecto a la mediana de las cuatro líneas de CMG. Con este resultado se lograron identificar varios genes diferencialmente expresados, particularmente genes cuya expresión acompañaba el patrón observado en los ensayos in vitro de migración e invasión. También se analizaron los genes diferencialmente expresados en hipoxia y, comparando genes entre líneas de CMG, se lograron identificar genes que posiblemente estén involucrados en la respuesta migratoria en contextos de hipoxia. El análisis luego se orientó a determinar los factores de transcripción y las vías que podrían influir en la capacidad migratoria e invasiva de las CMG. Encontramos que en todas las líneas las vías relacionadas a hipoxia se inducen en respuesta a condiciones de hipoxia, indicando que la detección de la falta de oxígeno no estaría afectada en ninguna de las líneas de CMG. Sin embargo, también se observó que en condiciones basales (normoxia), esta vía se encuentra menos enriquecida en las líneas G08 y G09 que en las líneas G02 y G03.

También observamos que, en condiciones basales, las líneas G02 y G03 muestran un mayor enriquecimiento de las vías asociadas a la adhesión y a la matriz extracelular en

comparación con las líneas G08 y G09. Llamativamente, varias de estas mismas vías aumentaban en las líneas G08 y G09 con el tratamiento con hipoxia. Este resultado muestra el rol no lineal de la adhesión en la migración, donde a niveles bajos de adhesión (como en las líneas G08 y G09) aumentar la adhesión puede llevar a un aumento de migración porque permite la tracción sobre el sustrato. En cambio, niveles muy altos de adhesión al sustrato o a otras células (como se observa en las líneas G02 y G03), pueden inhibir la migración ya que las células no logran desprenderse de su ambiente. Al analizar los genes líderes de esta vía, se observó que los de las líneas G02 y G03 basales eran subconjuntos distintos de los que se inducían en las líneas G08 y G09 en hipoxia. Por último, a lo largo de estos análisis, pudimos confirmar la importancia de trabajar con múltiples líneas celulares derivadas de pacientes, ya que la elevada variabilidad entre ellas implica que los genes relevantes para una línea celular no necesariamente lo son para otra, incluso en líneas similares, como las líneas G08 y G09. Más aún, al trabajar con múltiples líneas celulares diferentes, es posible establecer correlaciones entre los niveles de expresión génica y el comportamiento celular, pudiendo determinar de esta manera potenciales blancos de interés.

Evaluación de posibles blancos para modular migración e invasión

En base a los resultados del análisis bioinformático de la secuenciación del ARN se eligieron seis posibles blancos para estudiar y cumplir objetivo final de esta tesis: evaluar los posibles blancos terapéuticos mediante técnicas de silenciamiento génico y ensayos in vitro de migración y de invasión celular. A partir de los genes en la Tabla 36 y en la Tabla 37 se eligieron HIF1 α , CSPG5, FN1 y LGALS3. HIF1 α se eligió para indagar en el rol de este factor en la respuesta a hipoxia de las líneas. En paralelo también se va a estudiar el rol de HIF2 α , ya que estas proteínas responden al mismo estímulo y control a muchos de los mismos genes. CSPG5 y FN1 son dos proteínas que surgieron del análisis de migración entre líneas y muestran expresión alta. LGALS3 surgió como proteína particularmente interesante en G03 y ya se ha reportado que puede afectar la migración, pero hay resultados contradictorios²⁷⁹. Por lo tanto, para poder elucidar este tema se decidió estudiar esta proteína en conjunto con gaelctina-1 (LGALS1), una proteína de la misma familia cuya influencia sobre la migración esta más estudiada^{318,319}.

Efecto del silenciamiento de HIF1 α y HIF2 α en la migración e invasión de las CMG

Las proteínas HIF1 y HIF2 son los sensores celulares del oxígeno por excelencia, siendo también responsables de la adaptación de las células a las condiciones de hipoxia. Como se mencionó anteriormente, estas proteínas se expresan en forma constitutiva, pero, en condiciones normóxicas, experimentan una degradación constante a nivel proteico vía ubiquitinación. Al disminuir la tensión de oxígeno, las proteínas HIF no se degradan, aumentando su concentración en la célula. Bajo estas condiciones, la subunidad α

transloca al núcleo, donde se une a la subunidad β y funciona como factor de transcripción regulando la expresión de una variedad de genes²⁰⁰. Entre sus blancos más importantes y conocidos se encuentra el VEGF, un factor que promueve la angiogénesis, y BNIP3, un regulador de la apoptosis y la autofagia²⁰⁰.

En el capítulo anterior determinamos, mediante el análisis de la expresión de sus genes blanco, que HIF1 sería activado por hipoxia en todas las líneas de CMG evaluadas. Esto resultó interesante ya que, si bien en la literatura está descripto que HIF1 y HIF2 favorecen la migración, en dos líneas de CMG (G02 y G03) no se observó aumento de la migración en hipoxia. Incluso, en una de ellas (G02), la disminución de la tensión de O₂ produce un descenso de la migración (Figura 12). Otra observación llamativa, basada también en la expresión de sus genes blanco, consistió en que por más que la actividad de HIF1 aumentara en hipoxia en todas las líneas celulares, su grado de activación basal sería diferente entre las líneas celulares, siendo presumiblemente más activa en las líneas G02 y G03 que en las líneas G08 y G09. Sin embargo, es importante tener presente que los genes blanco de la vía de HIF también pueden ser regulados por otros factores de transcripción; por lo tanto, en términos generales, este tipo de análisis de expresión de genes blanco de factores de transcripción debería ser interpretado con cautela³²⁰. A partir de este comportamiento diferencial, surgieron interrogantes: ¿El aumento de migración observado en respuesta a hipoxia en las líneas G08 y G09 es dependiente de las proteínas HIF? ¿En las líneas G02 y G03, en donde no se ve un aumento de la migración con hipoxia, los HIFs regulan o no la migración?

En la Figura 37 se puede ver la expresión de HIF1 α y EPAS1 (HIF2 α) en base a la secuenciación de ARN en Log₂CPM y luego (Figura 38) la validación por RT-PCR cuantitativa. Como se puede observar se reducen los niveles de expresión del mensajero de HIF1 α en hipoxia en la línea G02, mientras que en el resto de las líneas CMG no hay cambios significativos.

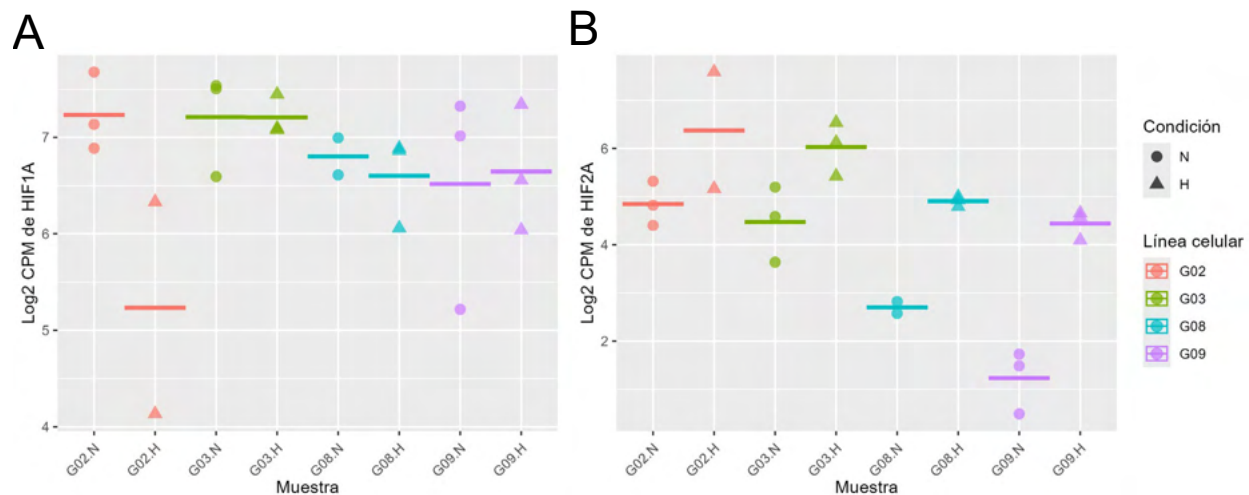


Figura 37. Expresión de HIF1A (A) y HIF2 (B) a partir de la secuenciación de ARN en Log₂ CPM de lecturas. La barra indica la media de los puntos.

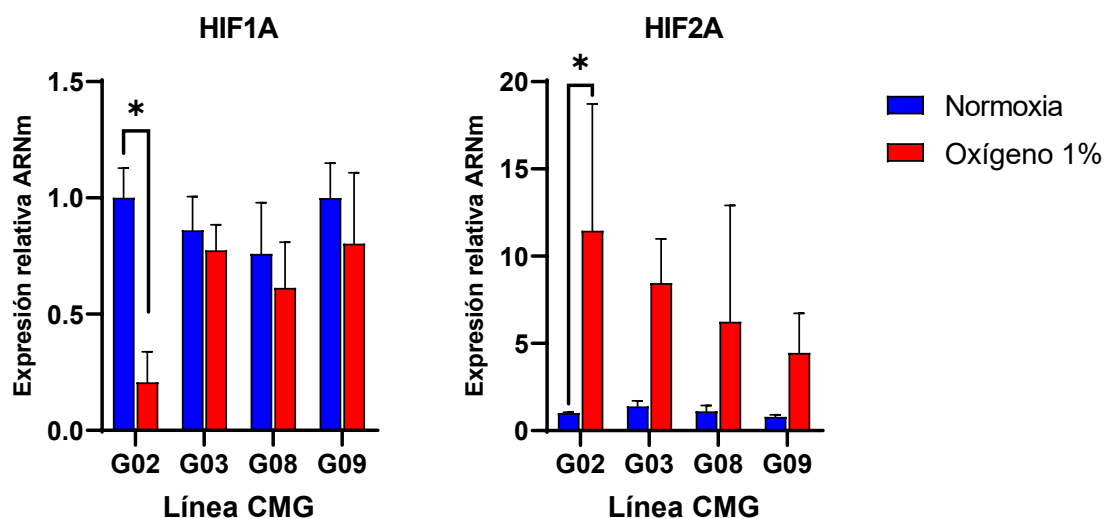


Figura 38. Expresión de HIF1 α y HIF2 α (EPAS1) entre líneas CMG. Los valores fueron relativizados a la expresión de RPL7 y normalizados a la condición de la línea G02 en normoxia. Se indican las medias $\pm$ el error estándar (E.S.) de tres experimentos independientes.

Ya que se conoce que la regulación por hipoxia de HIF α y HIF2 α se da a nivel proteico, se realizaron ensayos de western blot para comprobar si había estabilización de la proteína en hipoxia. Como se puede observar en Figura 39 en todas las líneas los niveles proteicos de

HIF1 α parecen aumentar con el tratamiento de hipoxia. Con HIF2 α parece haber un patrón parecido, pero menos evidente en la línea G02.

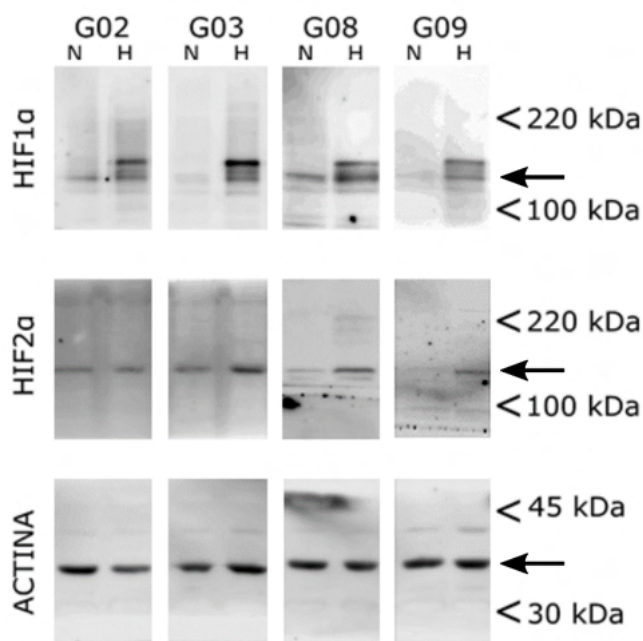


Figura 39. Ensayo de western blot de proteínas HIF1 α , HIF2 α y actina en las líneas CMG en condiciones normóxicas (N) e hipóxicas (H). Están marcadas las alturas de las bandas del marcador Color Burst y los pesos moleculares correspondientes y con flechas la banda de la proteína correspondiente.

Para poder responder interrogantes en cuanto al rol de estos factores, se buscó silenciar la expresión de HIF1 α y HIF2 α y evaluar su efecto en la migración. Para silenciar la expresión de estos genes se utilizaron ARNs pequeños de interferencia, conocidos como siRNAs por su sigla en inglés (*small interfering RNAs*), específicos para HIF1 α y HIF2 α . HIF1 α y HIF2 α fueron silenciados tanto en forma individual, como en simultáneo con los correspondientes siRNAs. Esto nos permitió evaluar posibles efectos redundantes, aditivos o sinérgicos. En la Figura 40 se puede observar que luego de 48 horas post-transfección, los niveles de los ARNm correspondientes disminuyen considerablemente en cuatro líneas de CMG diferentes.

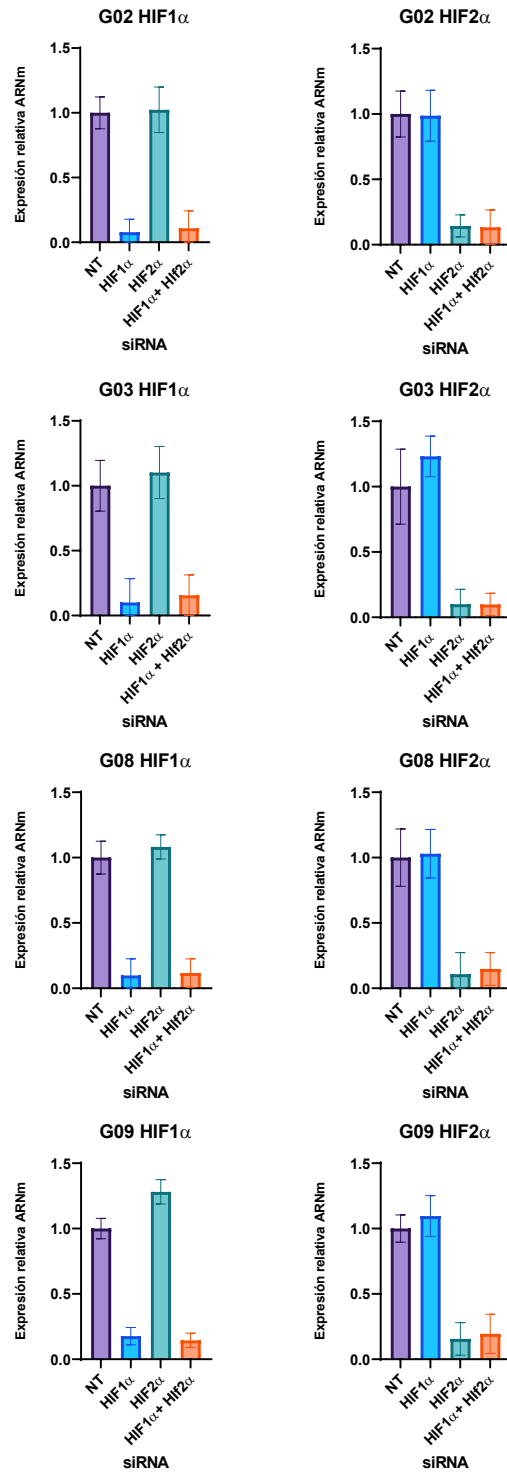


Figura 40. Expresión relativa de ARNm de HIF1α y HIF2α mediante RT-qPCR luego de silenciar o no los HIFs con los siRNA correspondientes. Los valores fueron relativizados a la expresión de RPL7 y normalizados a condición de tratamiento control con un siRNA inespecífico (NT). Se indican las medias $\pm$ el error estándar (E.S.) de tres experimentos independientes.

Antes de evaluar la participación de HIF1 α y HIF2 α en la migración e invasión, determinamos el efecto del silenciamiento de ambos factores en la muerte celular de cuatro líneas de CMG. Como se puede observar en la Figura 41, la disminución de la expresión de los factores HIF en hipoxia, no parece tener un efecto sustancial sobre la muerte celular, al menos luego de 72 horas post-silenciamiento.

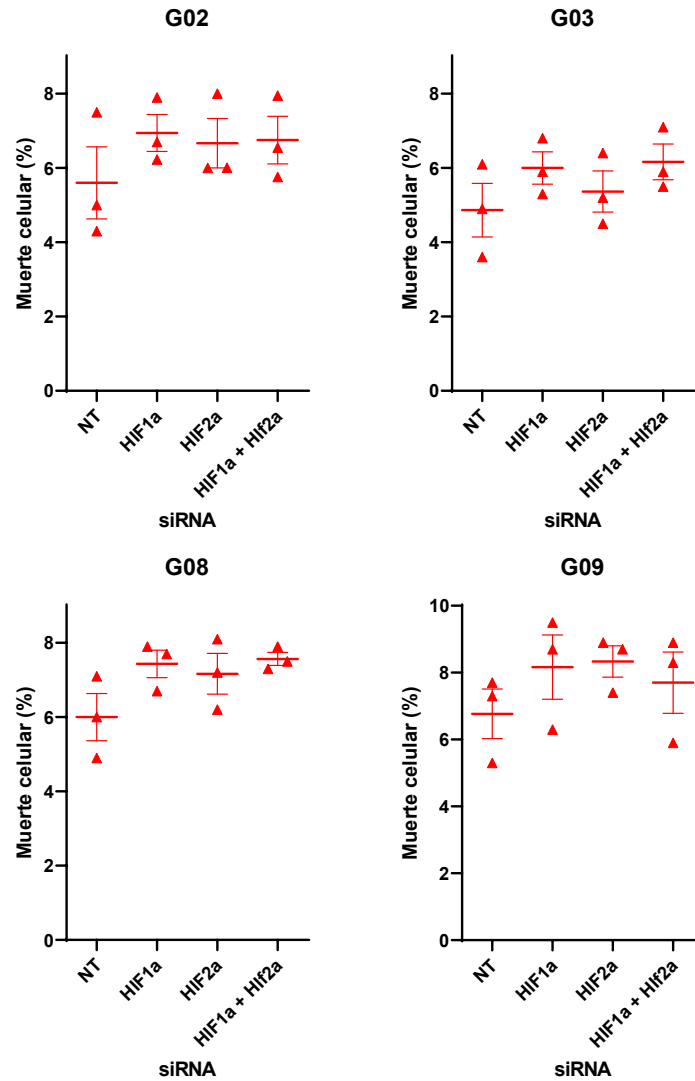


Figura 41. Porcentaje de muerte celular en las líneas de CMG luego de 72 horas de silenciar HIF1 α , HIF2 α o ambas (HIF1 α + HIF2 α) o de transfectar con un siRNA inespecífico (NT) en hipoxia (1% O₂). Se indican las medias $\pm$ el error estándar (E.S.) de tres experimentos independientes.

Luego, se determinó el efecto de estos silenciamientos sobre la capacidad migratoria de estas líneas de CMG. Para ello, se realizaron los mismos ensayos migratorios de esfera utilizados en los experimentos del primer capítulo de resultados, tanto en normoxia como en hipoxia (Figura 42). Pudimos determinar que el efecto del silenciamiento de los HIFs sobre la migración de CMG depende de la línea celular analizada, observándose un comportamiento en las líneas G02 y G03 opuesto al de las líneas G08 y G09. Mientras que el silenciamiento de los HIFs en las líneas G02 y G03 aumenta la migración, en las líneas G08 y G09 la disminuye. También se puede observar que el silenciamiento de los HIFs tiene un efecto más marcado en hipoxia que en normoxia, resultado esperado ya que en hipoxia tanto HIF1 α y HIF2 α son estabilizados. De hecho, es sorprendente que en algunas líneas de CMG, aún en normoxia pueda observarse efecto al silenciar las HIF. Esto podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que en ciertos tumores la pérdida de supresores tumorales tales como PTEN puede promover la estabilización de HIF1 α en normoxia. Particularmente las líneas G02, G03, G08 y G09 presentan pérdida de heterocigosidad en 10q, la región cromosómica en la que reside PTEN. Sin embargo, aún no está claro el mecanismo por el cual ocurre esto³²¹. Otro factor podría ser la acumulación de lactato y de piruvato generados por la glucólisis (incrementada en células tumorales), que podrían estabilizar parcialmente al HIF1 α en presencia de oxígeno y evitar que sea degradado³²². De todos modos, cabe aclarar que de estar presentes estos mecanismos, la estabilización de HIFs sería parcial (y leve), ya que como vimos mediante ensayos de Western blot, los niveles proteicos de estos factores en normoxia se encuentran cercanos al límite de detección. Además, no se descarta que en las esferas (generadas para la realización de los ensayos) se forme un centro hipóxico en donde los HIFs puedan ser estabilizados.

Al analizar individualmente cada línea de CMG observamos lo siguiente (Figura 42). En la línea G02 en normoxia, sólo el silenciamiento de HIF2 α induce un aumento significativo de la migración (aunque se observa una tendencia similar al silenciar HIF1 α y ambos HIFs en simultáneo). En hipoxia, en cambio, tanto el silenciamiento de HIF1 α como el de HIF2 α o el de ambos en simultáneo aumentan la migración de manera significativa, aunque HIF2 α parece ser más relevante. Resulta muy interesante que en esta línea de CMG, al silenciar los

HIFs se revierte la disminución de la migración provocada por hipoxia. Esta respuesta indica que estos factores de transcripción serían mediadores de dicho descenso, presumiblemente activando la expresión de genes responsables de conferir a las CMG la capacidad para adaptarse al ambiente hipóxico, sin necesidad de activar su migración. En el caso de la línea G03, de manera similar a la línea G02 en hipoxia, el efecto del silenciamiento de HIF1 α , HIF2 α y de ambos en simultáneo, lleva a un aumento de migración, tanto en normoxia como en hipoxia (en donde también HIF2 α parece tener una mayor influencia que HIF1 α). Este efecto es sorprendente ya que, como se mencionó previamente, se esperaba una mayor relevancia de los HIFs en condiciones de hipoxia. Además, si bien estos resultados no son los esperados, ya que existe una cuantiosa evidencia a favor del rol pro-migratorio de los HIFs, también se ha reportado, que HIF1 es capaz de inhibir la migración de células madre mesenquimales³²³. En la línea G08, por el contrario, se observa el efecto esperado en base a la literatura, ya que al silenciar HIF1 α y/o HIF2 α , la migración disminuye. Si bien este efecto se observa en normoxia, es más pronunciado en hipoxia. Por último, la línea G09 es la única línea de CMG en la que no se ve un efecto significativo en la migración al silenciar los HIFs en normoxia. Esto podría deberse a que, en esta línea en particular el contexto molecular y metabólico preponderante en normoxia no contribuiría a la estabilización de los HIFs. Por otra parte, en hipoxia, sólo el silenciamiento de HIF1 α lleva a una disminución de la migración, sugiriendo que HIF2 α no sería relevante en la migración de esta línea.

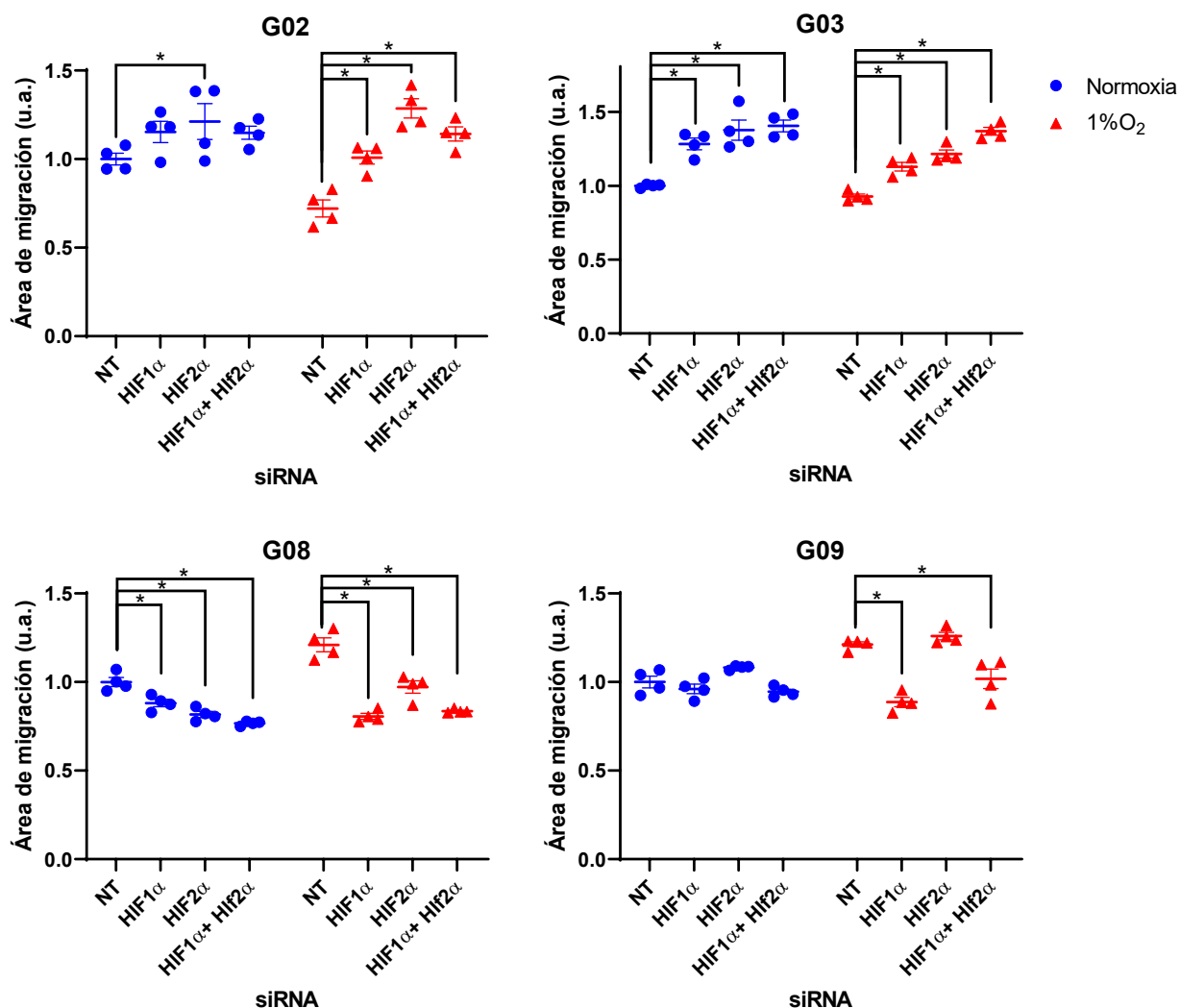


Figura 42. Migración mediante el ensayo migratorio de esfera en líneas de CMG tratadas con siRNAs inespecíficos (NT), específicos para HIF1 α y HIF2 α , o combinando ambos (HIF1 α + HIF2 α). Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0,05$. En todos los casos se indican medias y errores estándar.

Para evaluar la migración mediante un ensayo diferente se utilizó el ensayo de herida, manteniendo las mismas condiciones experimentales del ensayo anterior. En el primer capítulo de resultados se observó que el ensayo de herida permite una menor resolución que el ensayo migratorio de esfera, ya que se detectaron menos diferencias entre condiciones. Al evaluar el rol de las proteínas HIF en estos ensayos se observó lo mismo, se ven menos diferencias con este ensayo que con el ensayo migratorio de esfera. En la Figura

43 se pueden ver los resultados del ensayo de herida en cada línea. En las líneas G02 y G03 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con siRNAs contra HIF1 α y HIF2 α y el siRNA NT, ni en normoxia ni en hipoxia. En las líneas G08 y G09, en cambio, sí se llega a ver que los silenciamientos génicos causaron cambios en la migración. En la línea G08, silenciar HIF1 α conlleva una disminución significativa en la migración, tanto en normoxia como en hipoxia. Silenciar ambos HIFs también causa una disminución significativa de la migración, pero solamente en hipoxia. Este resultado es coherente con lo visto en el ensayo migratorio de esfera, aunque en este caso no se vio diferencia significativa en la migración con el silenciamiento de HIF2 α . Al silenciar HIF1 α y HIF2 α en la línea G09, no se observaron diferencias en normoxia, pero sí en hipoxia. Este resultado coincide con lo observado en la Figura 42, en donde también se vio que los HIFs eran relevantes solamente en hipoxia. Es interesante notar que en la línea G09, con el ensayo migratorio de esfera (Figura 42), se observa que HIF1 α es relevante, pero no HIF2 α ; mientras que con el ensayo de herida (Figura 43) sí puede verse que HIF2 α participa en la migración de estas células. Hay distintas explicaciones posibles para esta diferencia. En primer lugar, las distintas condiciones experimentales de los ensayos podrían estabilizar de manera diferencial los distintos HIFs. Para indagar en esta cuestión, se debería analizar la estabilidad de estos factores de transcripción, tanto en cultivos en monocapa, como en neuroesferas. También es posible que los HIFs estén estabilizados por igual en ambos casos, pero los ensayos afecten diferentes mecanismos de migración, y, por lo tanto, los roles de los HIFs sean distintos.

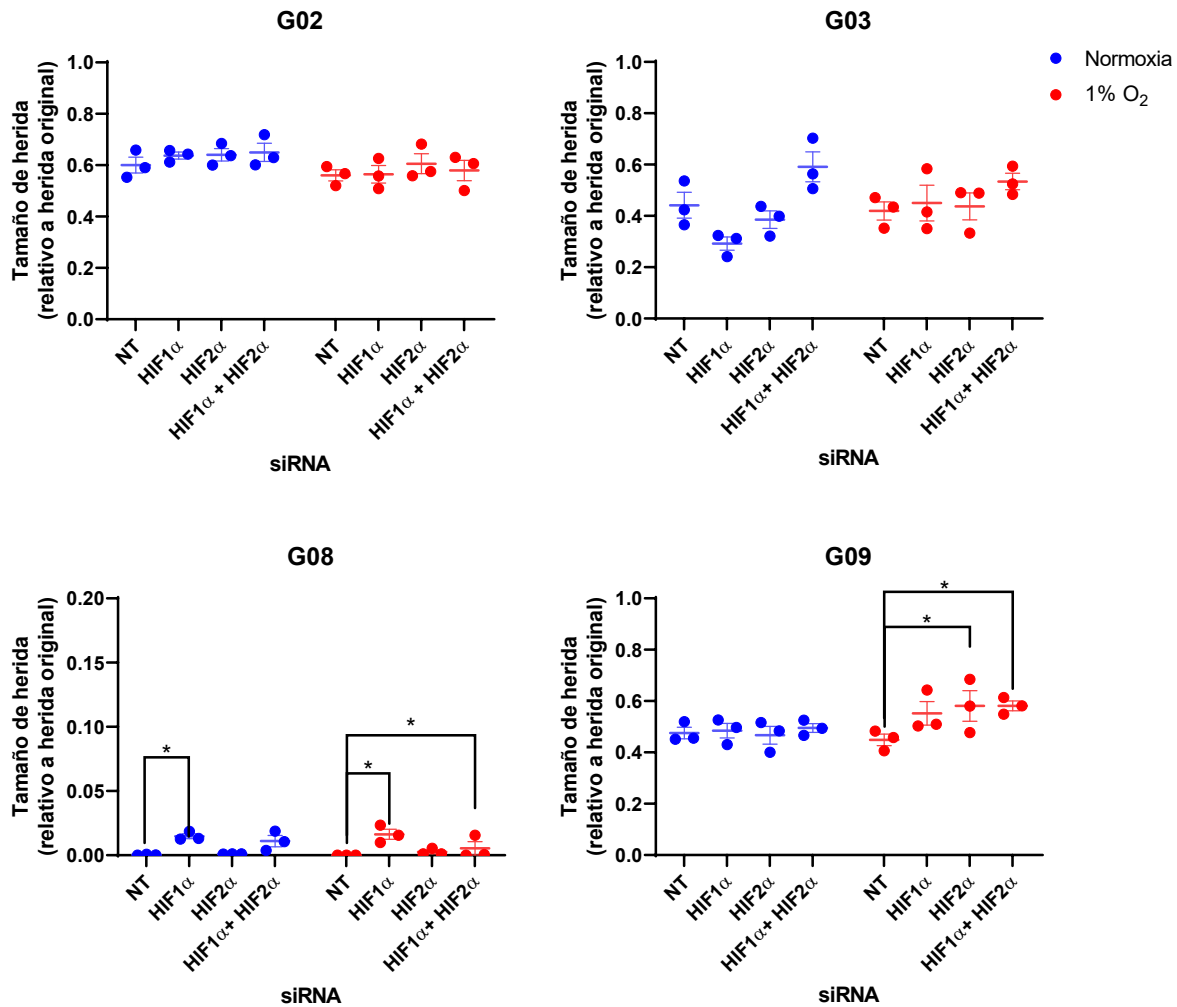


Figura 43. Migración mediante el ensayo de herida en líneas de CMG tratadas con siRNAs inespecíficos (NT), específicos contra HIF1 α , HIF2 α , o contra ambos (HIF1 α + HIF2 α). Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0,05$. Las barras indican en todos los casos la media y el error estándar. La escala de G08 se cambió para poder visualizar las diferencias.

Luego de evaluar el rol de los HIFs en la migración de las CMG, se analizó la participación de estos en la capacidad invasiva. Utilizando el método ya descrito, el ensayo invasivo de esfera, se evaluó el efecto de silenciar HIF1 α , HIF2 α o ambos, sobre la invasión, tanto en normoxia como en hipoxia (Figura 44). En la línea G02 no se observaron diferencias en normoxia. En hipoxia, en cambio, se puede observar que sólo el silenciamiento de HIF1 α conlleva un aumento significativo en la invasión. A diferencia de lo visto en el ensayo

migratorio de esfera, en este caso no se ven diferencias significativas con el silenciamiento de HIF2 α o con la combinación de ambos. En la línea G03, se observa que, al silenciar HIF1 α , se produce un aumento significativo de la invasión en condiciones normóxicas, pero no se ve efecto en condiciones hipóxicas. Este resultado es inesperado ya que se espera mayor relevancia de los HIFs en hipoxia que en normoxia, pero considerando la variabilidad entre las réplicas se tendría que profundizar para poder sacar conclusiones. En la línea G08 se puede observar una disminución significativa de la invasión al silenciar HIF1 α , sólo en hipoxia. En la línea G09 se puede observar que el silenciamiento de ambos HIFs en normoxia conlleva una disminución de la invasión. En hipoxia también se ve este efecto, sumando que el silenciamiento de HIF1 α individualmente también produce una disminución de invasión. Comparando con el ensayo migratorio de esfera se puede observar que la invasión y la migración muestran un patrón parecido en hipoxia, en donde se puede observar que HIF1 α sería importante para ambos procesos. Cuando observamos el patrón en normoxia se puede ver que no coincide con lo observado en el ensayo migratorio de esfera o el ensayo de herida, en donde no se producen cambios significativos en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 42 y Figura 43). En el ensayo de invasión, en cambio, se observa que al silenciar ambos HIFs se produce una disminución significativa (Figura 44).

Haciendo un análisis global, podemos observar que en los ensayos invasivos de esferas se observan menos diferencias significativas que en los ensayos migratorios correspondientes, pese a que los patrones generales se mantienen en ambos ensayos. Aun así, en algunos casos, se ven diferencias que no se explican por diferencia en el poder de resolución de ambas técnicas. Por ejemplo, en el caso de silenciar ambos HIFs en la línea G09 en normoxia, se afecta la invasión, pero no la migración. Esto se puede deber a que las proteínas HIF controlen aspectos del contexto celular que son relevantes para la invasión, pero no para la migración.

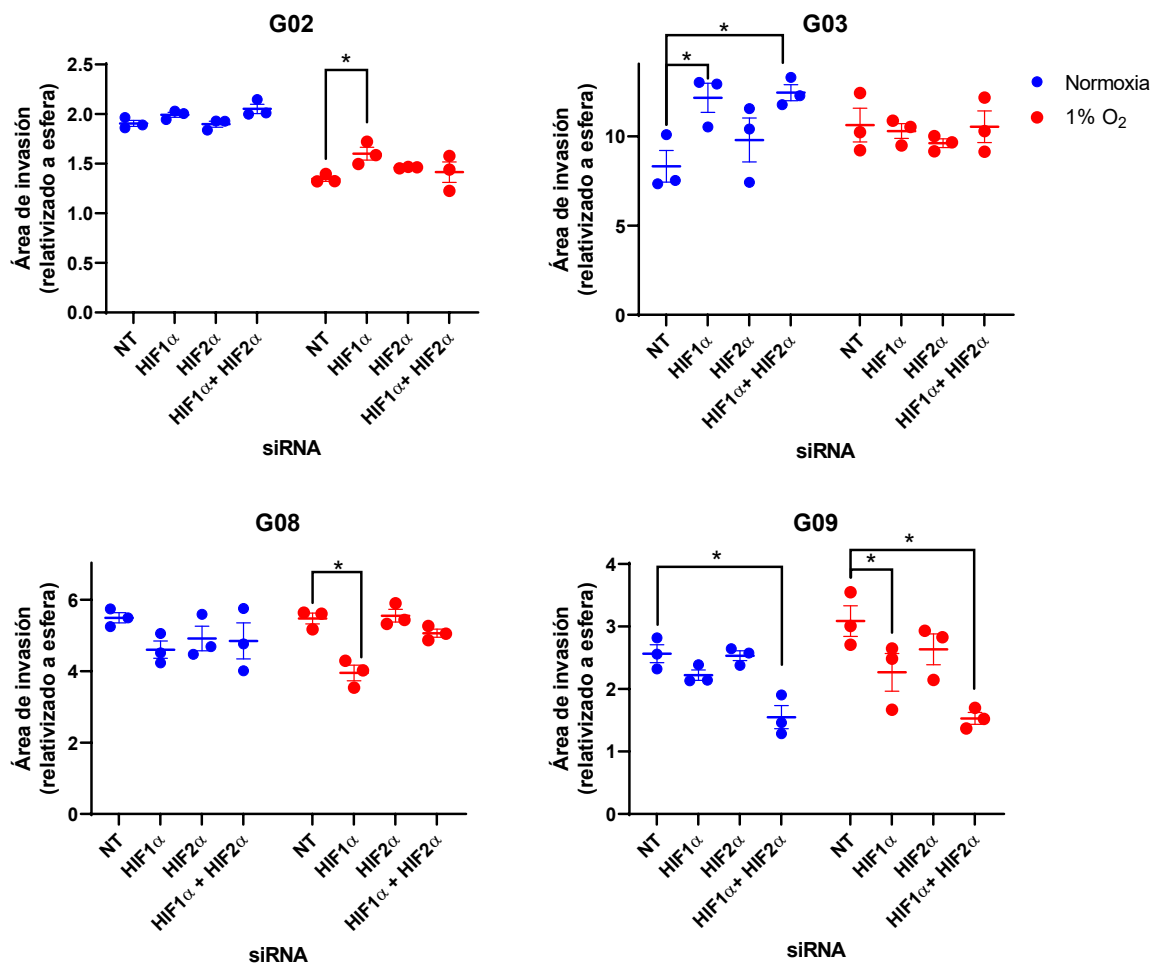


Figura 44. Invasión mediante el ensayo invasivo de esfera en líneas de CMG tratadas con ARN de interferencia (siRNA) control (NT), contra HIF1 α , HIF2 α , o contra ambos (HIF1 α + HIF2 α). Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0,05$. Las barras indican, en todos los casos, la media y el error estándar.

En conclusión, se puede observar que las proteínas HIF tienen un efecto esperado en las líneas G08 y G09, ya que parecen inducir tanto la migración como la invasión, particularmente en hipoxia. En cambio, en las líneas G02 y G03 se observa el efecto opuesto, en donde las proteínas HIF estarían inhibiendo la migración e invasión ya que, al silenciarlas, ambos procesos tienden a aumentar. Este fenómeno resulta sorprendente, ya que hasta ahora sólo se ha reportado que los HIFs aumentan la capacidad migratoria de las células de GBM. Como ya se ha mencionado, es posible que en estas líneas de CMG (G02 y

G03), la activación de los HIFs permita la adaptación de las células a las condiciones hostiles del nicho hipóxico mediante otros mecanismos, independientes de la migración/invasión.

Efecto del silenciamiento de proteoglicano condroitín sulfato 5 en la migración e invasión de CMG

CSPG5 (*chondroitin sulfate proteoglycan 5*), también conocido como neuroglicano C, es un proteoglicano condroitín sulfato expresado casi exclusivamente en el cerebro, particularmente en el cerebro inmaduro²⁹⁸. Es una proteína transmembrana de 150 kDa con un dominio transmembrana, un dominio de unión a condroitín sulfato, y un dominio tipo EGF³²⁴. En estudios hechos en ratas adultas, esta proteína, se expresa principalmente en el área perisináptica de zonas corticales³²⁵. Su dominio tipo EGF induce la fosforilación de ErbB2 y ErbB3, afectando el crecimiento celular en líneas tumorales de mama³²⁶. Se encontró también que CSPG5 está involucrado en la elongación de procesos de precursores oligodendrogiales³²⁷. Esto es interesante ya que existen similitudes en los mecanismos celulares involucrados en la elongación de procesos y los mecanismos involucrados en la migración, tales como la adhesión a la MEC y la reorganización del citoesqueleto. A la fecha hay muy poco publicado sobre CSPG5, solamente 19 publicaciones en PubMed y se sabe poco sobre su efecto sobre la MEC o sobre la migración.

En su expresión en las líneas CMG en la secuenciación (Figura 45) se puede observar que se expresa más en las líneas G08 y G09 que en las líneas G02 y G03 y que parece inducirse en las líneas G08 y G09 con hipoxia. Cuando se validó la expresión por PCR cuantitativa (Figura 46) se observó un patrón similar entre líneas CMG, pero no se observó inducción con hipoxia en G08 y G09.

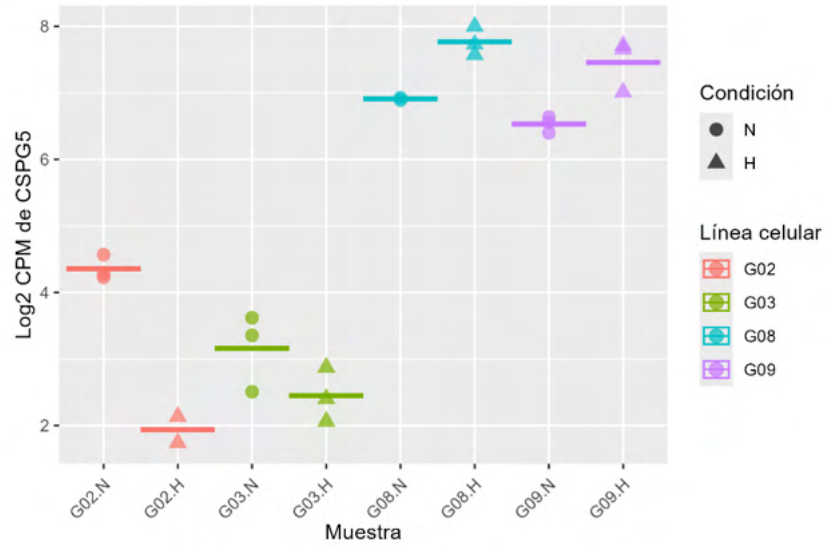


Figura 45. Expresión de CSPG5 a partir de la secuenciación de ARN en Log₂ CPM de lecturas. La barra indica la media de los puntos.

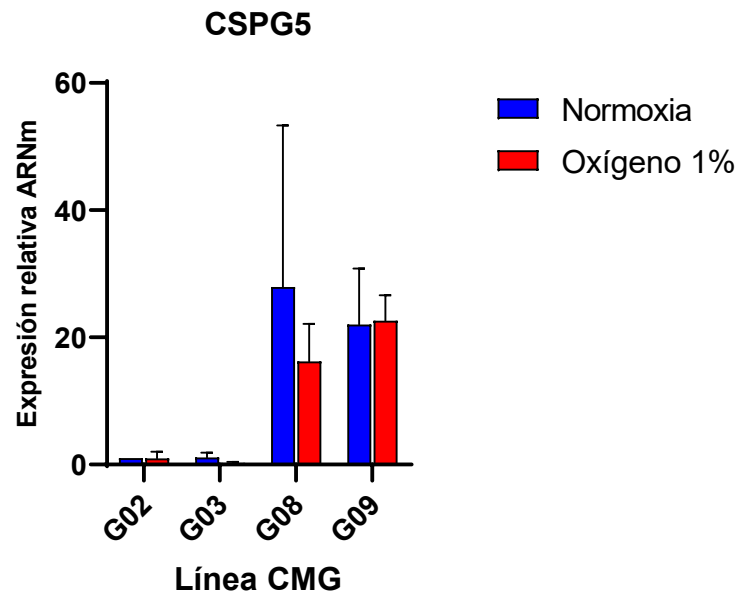


Figura 46. Cuantificación relativa de los niveles de expresión del ARNm de CSPG5 entre líneas de CMG en normoxia e hipoxia. Los valores fueron relativizados a la expresión de RPL7 y normalizados a los niveles exhibidos por la línea G02 en normoxia. Se indican las medias $\pm$ el error estándar (E.S.) de tres experimentos independientes.

Debido a su elevada expresión en las líneas de CMG y, fundamentalmente porque los niveles de expresión correlacionan con la capacidad migratoria en las 4 líneas de CMG analizadas, resultó importante estudiar el rol de esta proteína en la regulación de la migración e invasión. En la Figura 47 se puede ver el silenciamiento de CSPG5 mediante siRNA. El silenciamiento se mantiene por hasta 96 horas luego de la transfección.

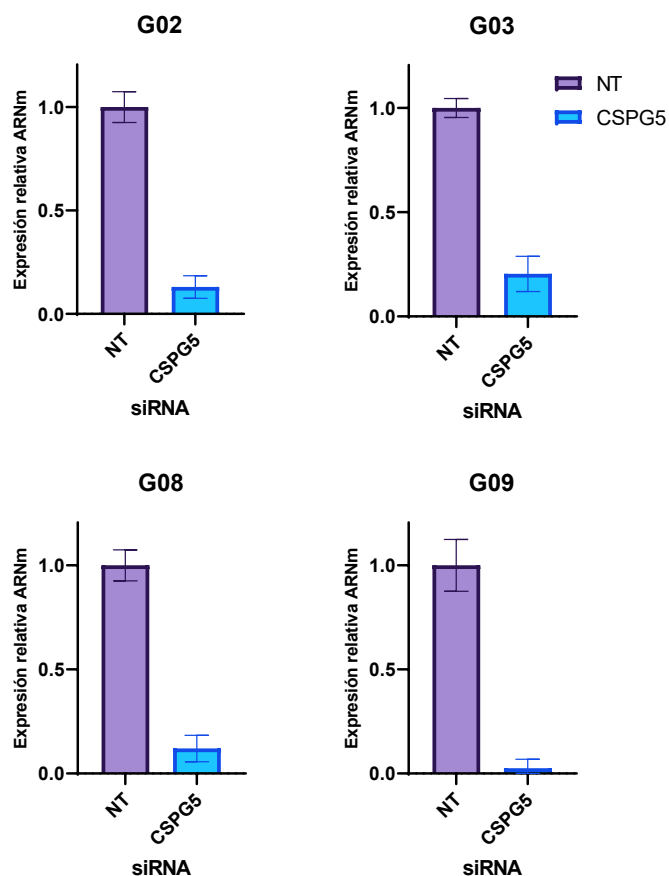


Figura 47. Cuantificación relativa del ARNm de CSPG5 mediante RT-qPCR empleando un siRNA inespecífico control (NT) y un siRNA específico de CSPG5. Los valores fueron normalizados mediante la expresión de RPL7 y relativizados a la condición de tratamiento con el siRNA NT.

Luego de confirmar la eficiencia del silenciamiento, se evaluó el efecto de silenciar CSPG5 sobre la muerte celular en las cuatro líneas de CMG. Se puede observar en la Figura 48 que

el silenciamiento de CSPG5 no tiene efecto significativo sobre la muerte celular en ninguna de las líneas celulares analizadas.

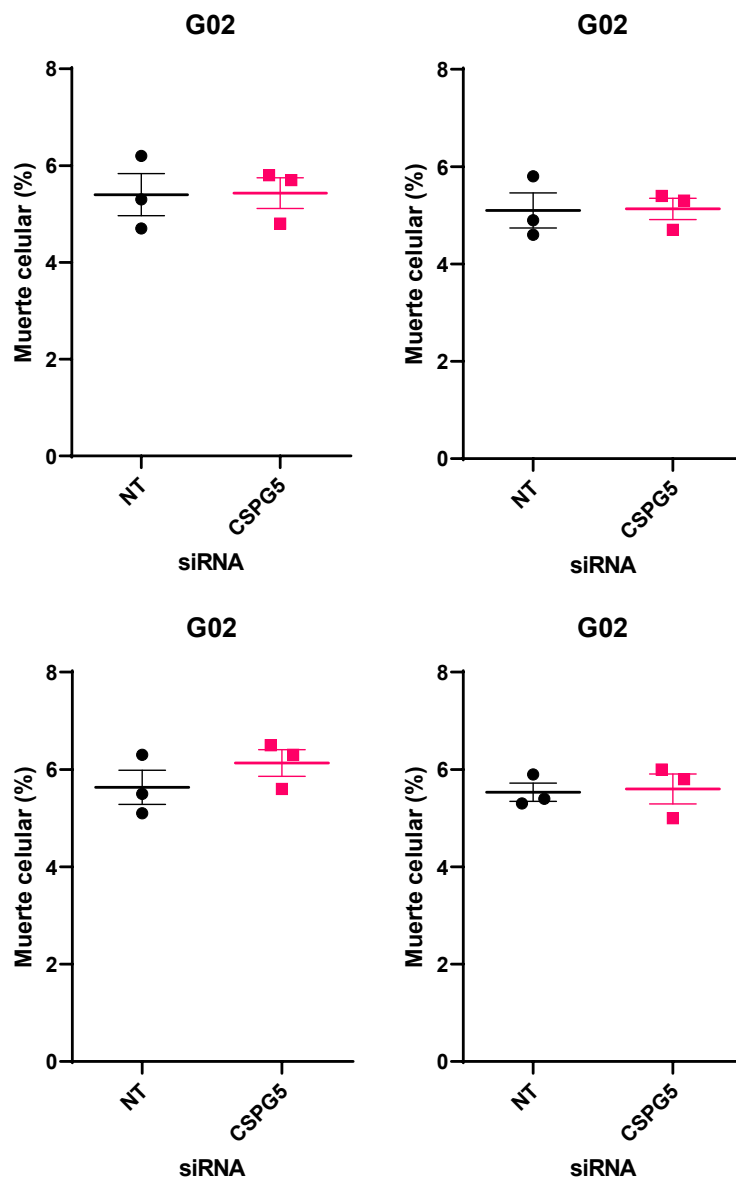


Figura 48. Muerte celular en las líneas de CMG luego de 72 horas de silenciar CSPG5, empleando un siRNA inespecífico control (NT) y un siRNA específico de CSPG5.

Para evaluar el efecto del silenciamiento de CSPG5 se utilizó el ensayo migratorio de esfera. En la Figura 49 se observa que el efecto del silenciamiento de CSPG5 es diferente en cada

línea. En la línea G02, el silenciamiento conlleva un incremento significativo de la migración en normoxia y una tendencia parecida, pero no significativa, en hipoxia. En la línea G03, se observa un incremento significativo de la migración sólo en hipoxia, mientras que en normoxia no se detectaron cambios aparentes. En las líneas G08 y G09, en cambio, no hay diferencias significativas entre el tratamiento con NT y con el siRNA específico contra CSPG5, pero se observa una tendencia opuesta, en la cual, en hipoxia, el silenciamiento de CSPG5 disminuiría la migración.

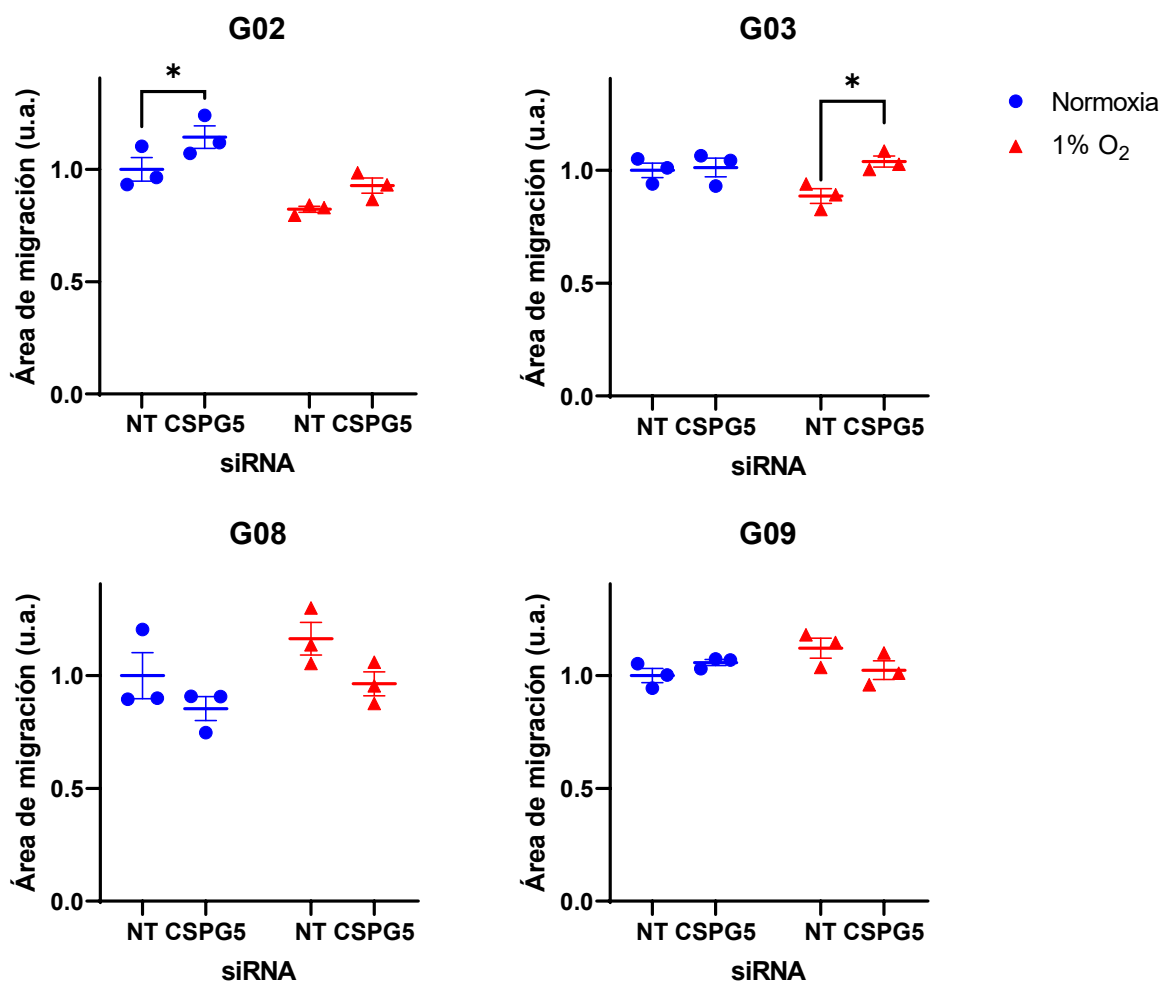


Figura 49. Migración mediante ensayo de migración de esfera en cuatro líneas de CMG silenciando con un siRNA inespecífico (NT) o contra CSPG5. Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Sidak con $p < 0,05$. Las barras representan las medias y los errores estándar.

Para seguir indagando, se analizó la capacidad migratoria, pero empleando el ensayo de herida (Figura 50). En este caso, de manera opuesta al ensayo de esfera, el silenciamiento de CSPG5 en la línea G02 conllevó un incremento significativo de la migración en hipoxia, pero no en normoxia. A pesar de las diferencias, se puede observar que en la línea G02 el silenciamiento de CSPG5 con ambos ensayos disminuye la migración. En cuanto a la línea G03 no hay diferencias aparentes con el silenciamiento de CSPG5, ni en normoxia ni en hipoxia. En la línea G08, al igual que con el ensayo migratorio de esfera, no hay diferencias significativas, pero si una tendencia a que disminuya la migración con el silenciamiento de CSPG5. En la Figura 50 se ve que en la línea G09 hay un aumento significativo de la migración silenciando CSPG5 en normoxia, pero no en hipoxia.

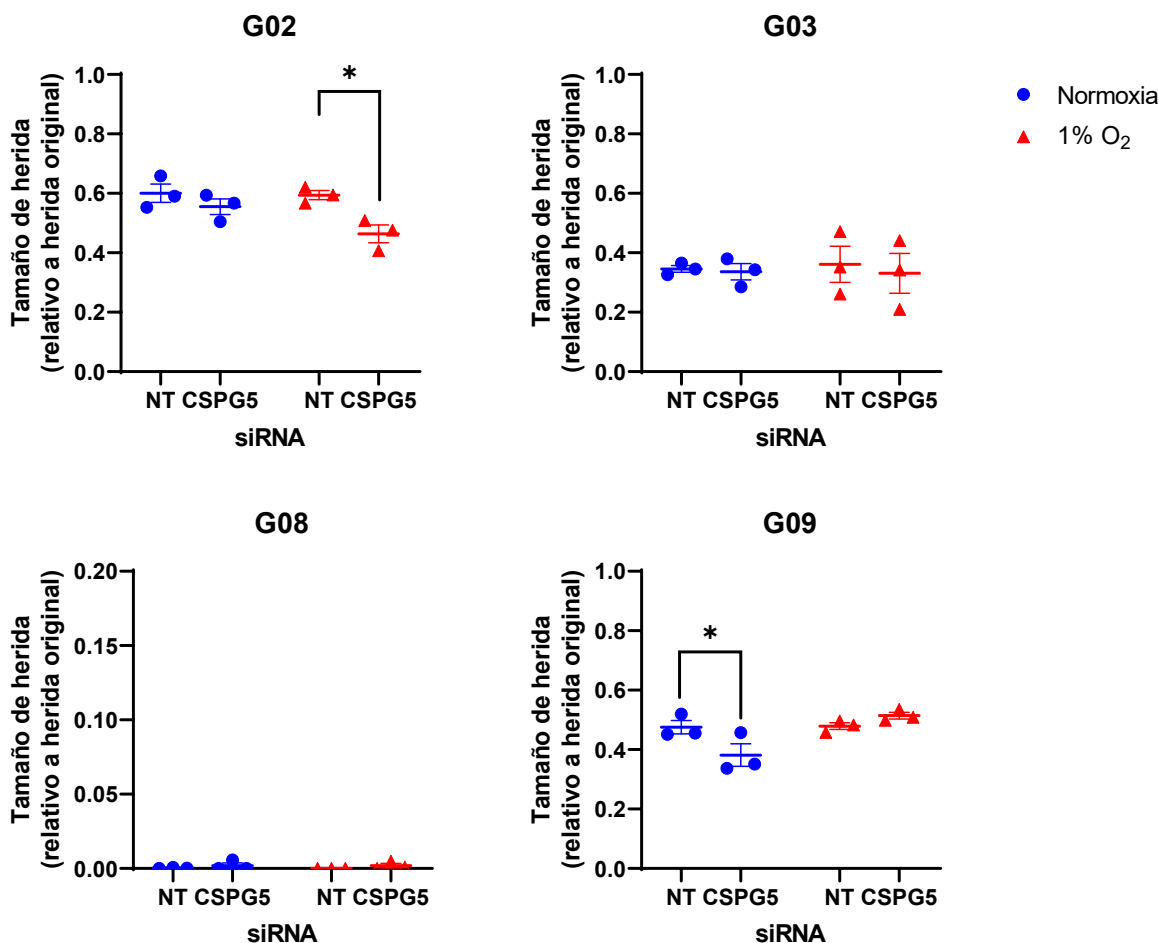


Figura 50. Migración mediante ensayo de herida en cuatro líneas de CMG silenciando con siRNA control (NT) o contra CSPG5. Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Sidak con $p < 0,05$. Las barras indican las medias y los errores estándar. La escala empleada para la línea G08 es distinta (rango 0-0.2).

Comparando los resultados de ambos ensayos migratorios se puede concluir que en las líneas G02 y G03, silenciar CSPG5 parece aumentar la migración o no producir cambios. En la línea G08 no se puede determinar un efecto significativo, pero si se observa una tendencia que sugiere que CSPG5 favorece la migración. Por último, en la línea G09 parece haber efectos contrarios en donde en normoxia CSPG5 parece inhibir la migración, mientras que en hipoxia parece favorecerla. Es interesante resaltar que este comportamiento se observa en ambos ensayos de migración.

En conjunto, estos resultados indican que CSPG5 puede inhibir o favorecer la migración de CMG según el contexto molecular de estas células. Por lo tanto, si bien es un factor interesante para ser estudiado en mayor profundidad (ya que su expresión correlaciona con la capacidad migratoria de las CMG), no representaría un buen candidato para bloquear, en forma generalizada, la capacidad de migración de las CMG.

Rol de fibronectina 1 en la migración e invasión de CMG

Como ya se mencionó anteriormente, la fibronectina 1 (FN1) es un componente de la MEC que, en el cerebro, se encuentra en el espacio perivascular. Es una glicoproteína de aproximadamente 460 kDa - 500 kDa, compuesta de dos subunidades. Tiene la capacidad para interactuar con más de 40 moléculas, incluyendo colágeno, tenascinas, integrinas, factores de crecimiento e, incluso, otras moléculas de fibronectina³²⁸. En GBM FN1 se encuentra sobre-expresada, particularmente cerca de los vasos sanguíneos¹²⁷. En estudios *in vitro* se han observado efectos mixtos con relación a la migración. Algunos autores describen que esta proteína disminuye la migración colectiva, pero que aumenta la

migración de células individuales. Otros autores observaron que aumenta la migración en general^{34,162}.

En el análisis de secuenciación masiva de ARN se observó que FN1 se expresa considerablemente más en las líneas G02 y G03 (que muestran una menor capacidad migratoria basal) que en las líneas G08 y G09 (que muestran una mayor capacidad migratoria basal) (Figura 51). En 2014, Serres et al. observaron en líneas celulares de GBM que al silenciar FN1 utilizando un ARN de interferencia aumenta la migración de células individuales, indicando que FN1 tiene un efecto inhibitorio sobre la migración celular¹⁶¹.

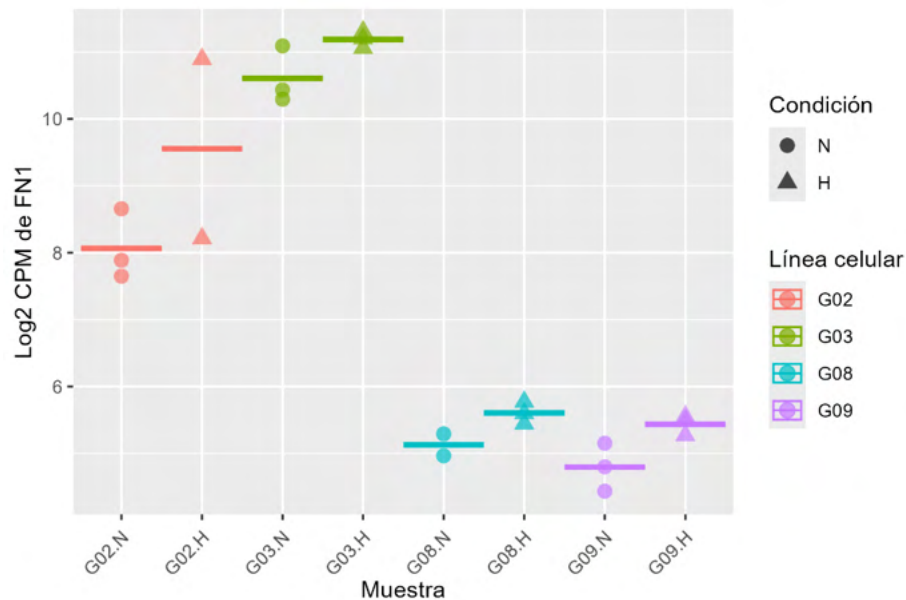


Figura 51. Expresión de FN1 a partir de la secuenciación de ARN en Log_2 CPM de lecturas. La barra indica la media de los puntos.

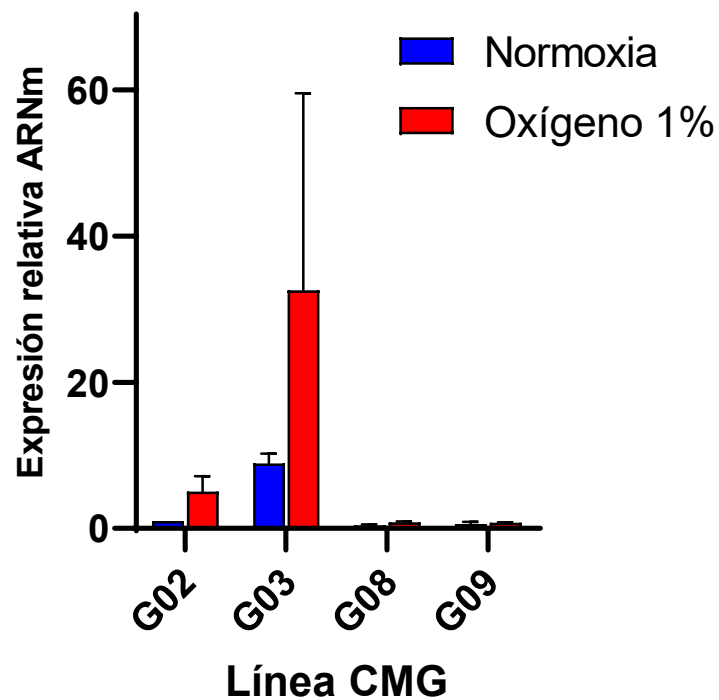


Figura 52. Expresión de FN1 entre líneas CMG medidos mediante RT-qPCR. Los valores fueron relativizados a la expresión de RPL7 y normalizados a la condición de G02 Normoxia. Se indican las medias $\pm$ el error estándar (E.S.) de tres experimentos independientes.

Con el fin de analizar el efecto de FN1 en la migración de las líneas de CMG, se silenció el gen FN1 mediante un siRNA específico. La eficiencia del silenciamiento se puede observar en la Figura 53. Antes de evaluar el efecto de silenciar FN1 sobre la migración e invasión, pudimos determinar que el silenciamiento de FN1 no afecta la muerte celular (Figura 63).

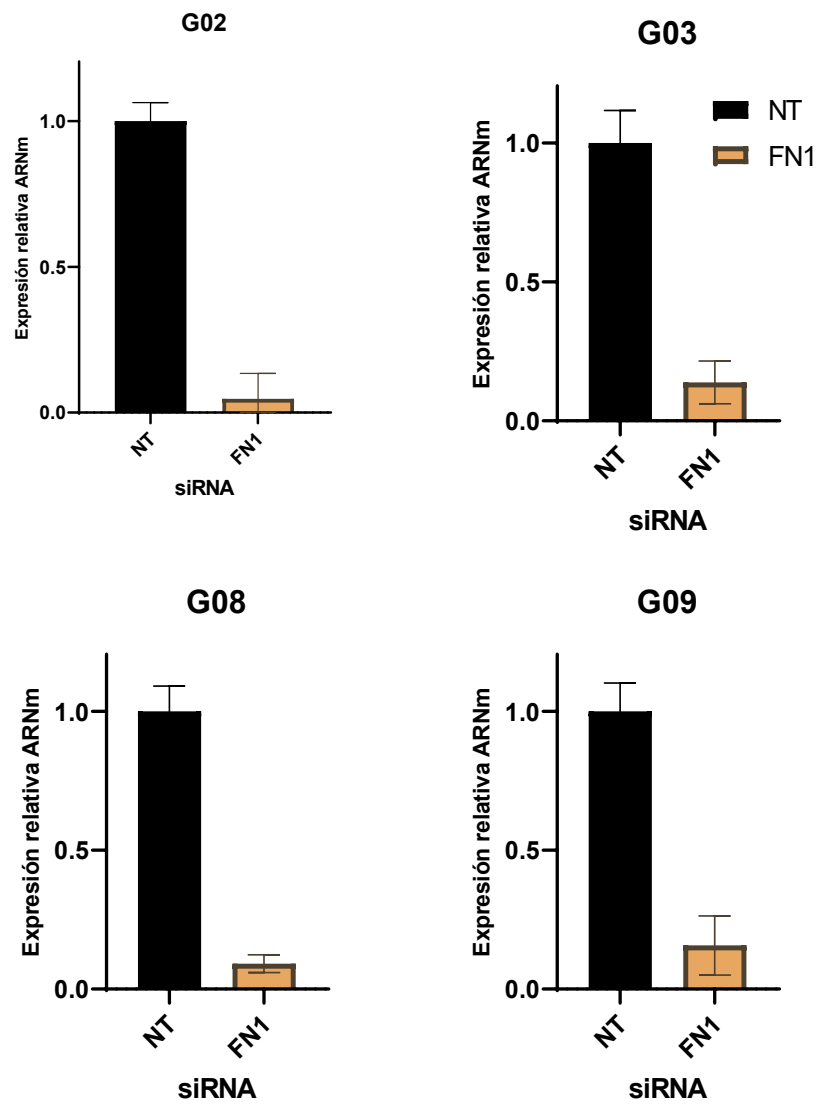


Figura 53. Cuantificación relativa del ARNm de FN1 mediante RT-qPCR luego de emplear un siRNA inespecífico (NT) o un siRNA específica para FN1. Los valores fueron normalizados mediante la expresión de RPL7 y relativizados a la condición de tratamiento con el siRNA NT.

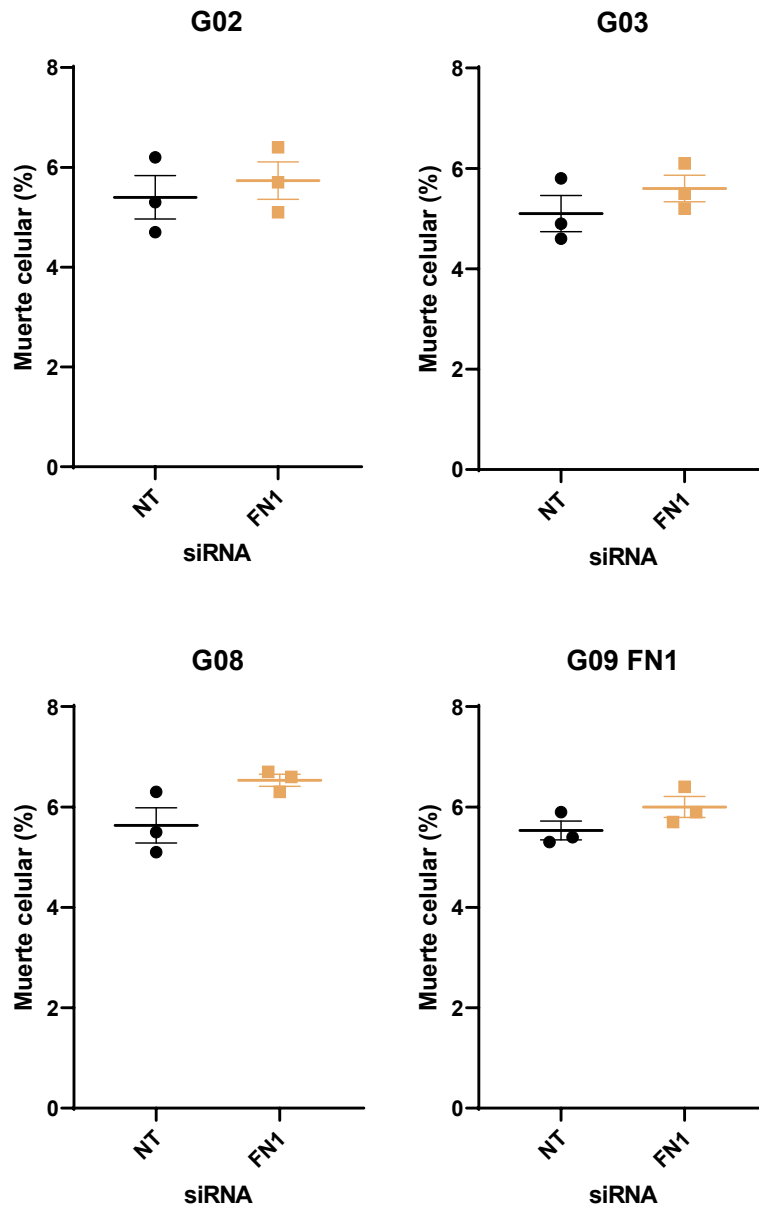


Figura 54. Muerte celular en las líneas de CMG luego de 72 horas de silenciar FN, empleando un siRNA inespecífico control (NT) y un siRNA específico de FN1.

Como se indica en la Figura 55, el silenciamiento de FN1 aumenta significativamente la migración en las líneas G03 y G08. En la línea G02 se observa una tendencia similar pero no es una diferencia significativa. En la línea G09, en cambio, no se observan diferencias aparentes. Es interesante que las líneas G08 y G03 tengan una respuesta tan parecida

considerando la diferencia en expresión basal del gen. La línea G09, en cambio, tiene un patrón muy distinto a la línea G08, aunque ambas líneas expresan niveles de ARNm de FN1 similares. De estos resultados se puede concluir que FN1 endógena (sintetizada por las mismas CMG) regularía negativamente la migración ya que, al silenciarla, la migración aumenta significativamente en dos de las cuatro líneas de CMG.

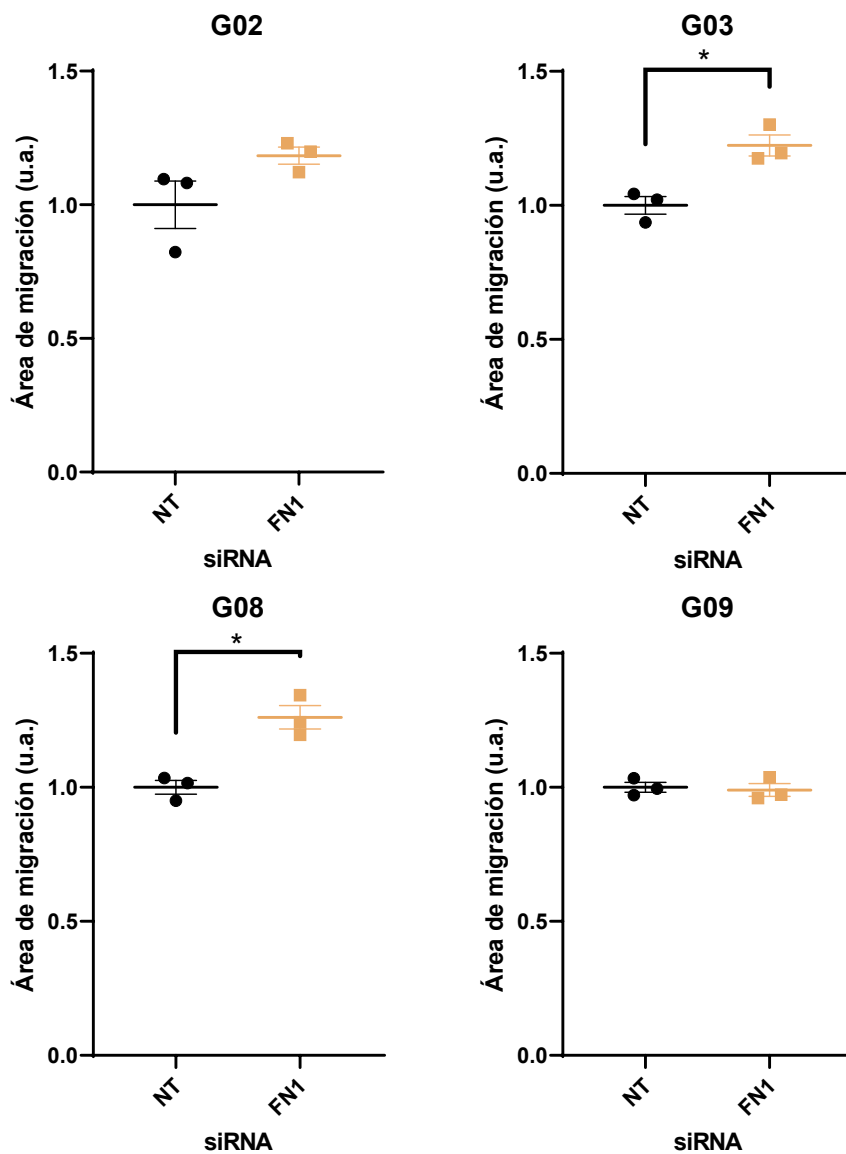


Figura 55. Migración mediante el ensayo migratorio de esfera en líneas de CMG tratadas con un siRNA inespecífico (NT), o específico para FN1 sobre laminina. Se realizó una prueba t de Student con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas. Las barras representan las medias y los errores estándar.

Para seguir indagando en el rol de FN1 en estas líneas, se midió su capacidad migratoria sobre diferentes sustratos de composición definida. Para ello, se eligieron dos componentes mayoritarios de la MEC como sustratos: laminina y fibronectina. En primera instancia se usó laminina pura como sustrato y luego se emplearon combinaciones de laminina con fibronectina, esta última en dos concentraciones diferentes. En la Figura 56 se puede observar que en todas las líneas de CMG hay un patrón similar, en donde al agregar $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (concentración $40 \mu\text{g}/\text{ml}$) de fibronectina se observa un aumento en la migración. Contrariamente, al agregar $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (concentración $80 \mu\text{g}/\text{ml}$) se observa una disminución de la migración. Este efecto podría indicar que, al agregar fibronectina, se facilita la adhesión de las células al sustrato, la cual es necesaria para la migración. Sin embargo, al aumentar aún más la concentración de fibronectina, la adhesión al sustrato se vuelve tan fuerte, que dificulta que las células se suelten para poder migrar. Es importante considerar que en este ensayo (Figura 56) se está modulando la cantidad de fibronectina en el sustrato, y no la endógena; mientras que en el ensayo de silenciamiento génico (Figura 55), se modula sólo la fibronectina endógena, es decir, la presente en las células que conforman la esfera (en este caso el sustrato es laminina, y, por lo tanto, no contiene fibronectina). Como se observó en la Figura 55, reducir la síntesis de fibronectina endógena aumenta la migración en G08 y G03, apoyando la idea de que la fibronectina endógena tiene un rol inhibitorio. En contraste, cuando se agregan $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina a la laminina del sustrato, se observa un aumento de migración en G03, y una tendencia similar en el resto de las CMG. Sólo tras el agregado de una mayor cantidad de fibronectina se observa un efecto inhibitorio. Esto apoya un rol estimulador de la fibronectina presente en el sustrato en bajas concentraciones, pero inhibitorio en mayores concentraciones. Este efecto ha sido descrito previamente para el colágeno¹⁵⁴ y CSPGs¹³² y refleja la complejidad de los mecanismos de migración, los cuales dependen de diversos factores (moléculas de adhesión, componentes de la MEC, etc.). Si bien en GBM hay evidencia de mayor abundancia de fibronectina en espacios

perivasculares, no hay estudios actuales que clarifiquen si dicha fibronectina ejerce un efecto inductor o inhibitorio de la migración.

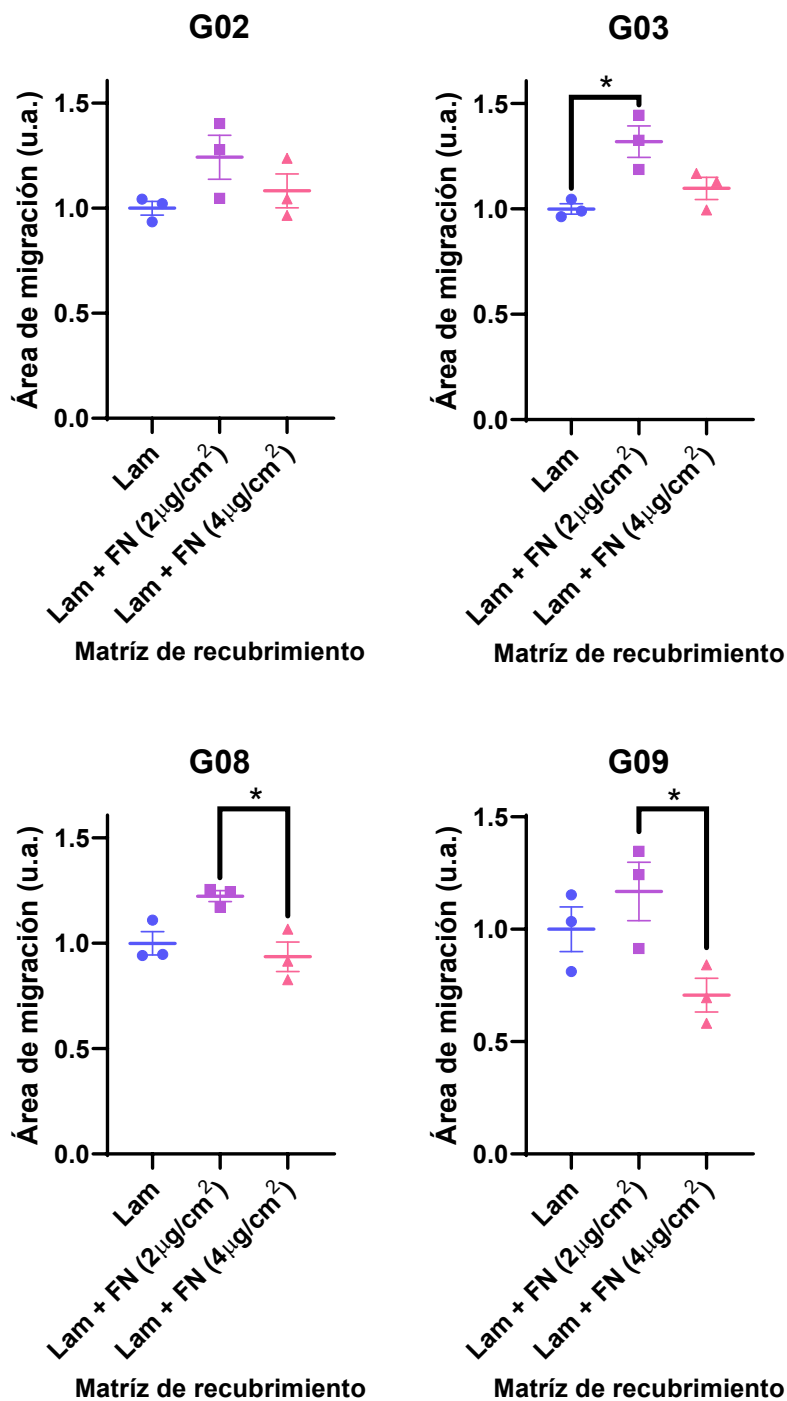


Figura 56. Migración mediante ensayo migratorio de esfera sobre sustrato de laminina pura (Lam), laminina con fibronectina agregada (Lam + FN) en dos cantidades ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y ($4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Se realizó un ANOVA de un factor con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas en base a una prueba de múltiples comparaciones de Tukey $p < 0,05$. Barras indican media y error estándar.

Efecto de los silenciamientos de galectina-1 y galectina-3 en la migración e invasión de CMG

Las galectinas son lectinas (proteínas de unión a carbohidratos) solubles con afinidad por oligosacáridos con β -galactosa. Contienen uno o dos dominios de reconocimiento de carbohidratos altamente conservados que se unen al disacárido N-acetil-d-Lactosamina (LacNac), aunque distintos miembros de la familia de galectinas tienen distintas afinidades por glicanos que contengan este disacárido. Pueden existir como monómeros, como dímeros o, en el caso de galectina-3, como oligómeros.

Los estudios sobre los efectos de la galectina-1 (LGALS1) o Gal-1, una galectina altamente expresada en GBM, en la motilidad celular han mostrado consistentemente su efecto promigratorio. Se encontró que Gal-1 se expresa más en la región peritumoral en comparación con el núcleo tumoral, y que las superficies recubiertas de galectinas aumentan la migración de las células tumorales^{329,330}. En experimentos *in vitro* se demostró una disminución de la motilidad celular cuando se interrumpe la unión de Gal-1 a sus receptores³¹⁸. El tratamiento con Gal-1 recombinante³³¹ y la sobreexpresión de Gal-1 a través de un vector IRES³¹⁹ aumentan la migración de células tumorales. Toussaint et al.³¹⁹ evaluaron el efecto de la Gal-1 sobre la invasión *in vivo* y demostraron que la sobreexpresión de Gal-1 en células U87MG xenotrasplantadas cambia la morfología de los tumores, mostrando una mayor invasión en la interfaz tumor-cerebro.

Galectina-3 (Gal-3) surgió como gen interesante del análisis de la secuenciación del ARN, particularmente en la línea G03 que muestra baja capacidad migratoria pero alta capacidad invasiva. A diferencia de la Gal-1, el papel de la Gal-3 en la migración e invasión del GBM no

está tan claro. Al igual que con la Gal-1, los niveles de expresión de Gal-3 son mayores en las secciones más invasivas del tumor³²⁹ y en las células asociadas con los vasos periféricos³³². En un ensayo de motilidad celular, tres líneas celulares humanas derivadas de gliomas (Hs683, T98G y U373) mostraron un aumento significativo en su capacidad migratoria sobre sustratos recubiertos con Gal-3 en comparación con el soporte plástico³²⁹. Estos resultados indican un papel extracelular de la Gal-3 en la migración de los gliomas. El efecto de la Gal-3 endógena fue estudiado por Debray et al.²⁷⁹, quienes encontraron que el silenciamiento de Gal-3 en células U373 disminuye la motilidad en plástico sin recubrimiento, pero aumenta la migración en placas recubiertas con laminina. El silenciamiento de Gal-3 pareció alterar la organización del citoesqueleto, aumentando la actina fibrilar y disminuyendo la actina monomérica. Sin embargo, la menor expresión de Gal-3 no afectó la invasión de esta línea celular a través de laminina o Matrigel, compuesto parecido en su composición al Geltrex. Estos resultados contradictorios mostraron que el papel de la Gal-3 endógena no es fácil de dilucidar.

Otra observación interesante es que en el análisis de genes aumentados en G03 y G08 aparte de observarse a Gal-3 se observa aumentada a FUOM (fucose mutarotase) un gen que codifica para una mutarasa de fucosa involucrada en la incorporación de fucosa a proteínas³³³. Estudios han demostrado que la incorporación de fucosa a las glicosilaciones aumentan la unión de Gal-3 a las mismas³³⁴. Esto aumentó el interés por el rol de Gal-3 y su rol en estas dos líneas que muestran alta capacidad invasiva.

En base a estos resultados observados en la bibliografía publicada sobre el rol de estas proteínas en la migración de GBM, se indagó en el rol de galectina-1 (Gal-1) y galectina-3 (Gal-3) en estas líneas de CMG en cuanto a su efecto sobre la migración e invasión.

En las líneas CMG (Figura 57) se puede observar que Gal-1 (LGALS1) se expresa más en la línea G03 en normoxia que en las otras líneas, aunque en la PCR cuantitativa (Figura 58) esto no es una diferencia significativa. En la secuenciación se puede observar que en la línea G02 hay una inducción de Gal-1 en la línea con el tratamiento de hipoxia.

G02. En cuanto a Gal-3 no se observan diferencias con hipoxia, pero si entre líneas en donde se puede observar que G03 y G08, las líneas con mayor invasión tienen mayor expresión de Gal-3.

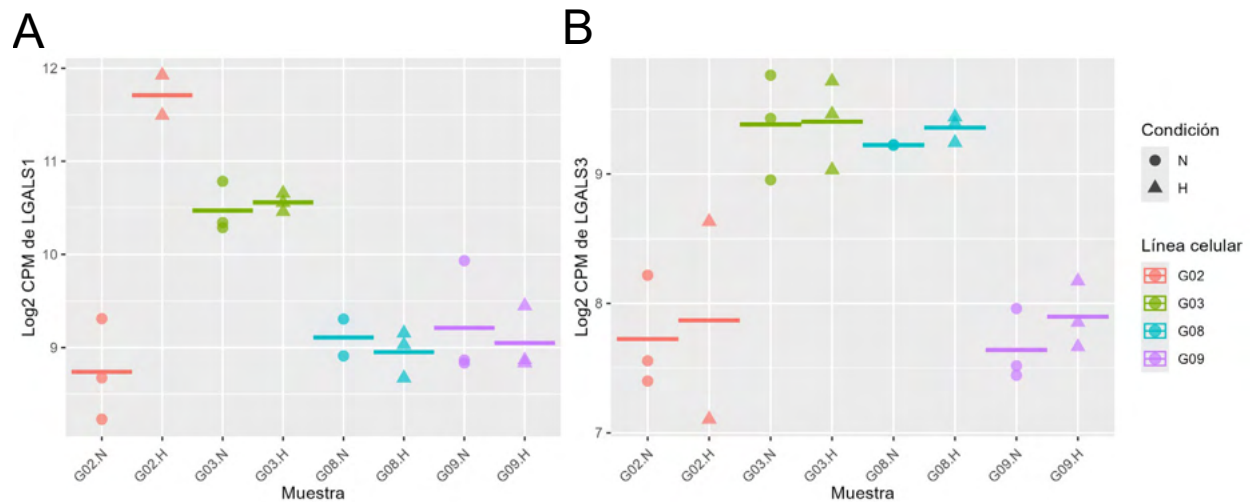


Figura 57. Expresión de (A) Gal-1 (LGALS1) y de (B) Gal-3 (LGALS3) a partir de la secuenciación de ARN en Log₂ CPM de lecturas. La barra indica la media de los puntos. Las letras indican grupos significativamente distintos ($p < 0.05$) por una prueba de ANOVA de un factor y comparaciones de Tukey entre líneas.

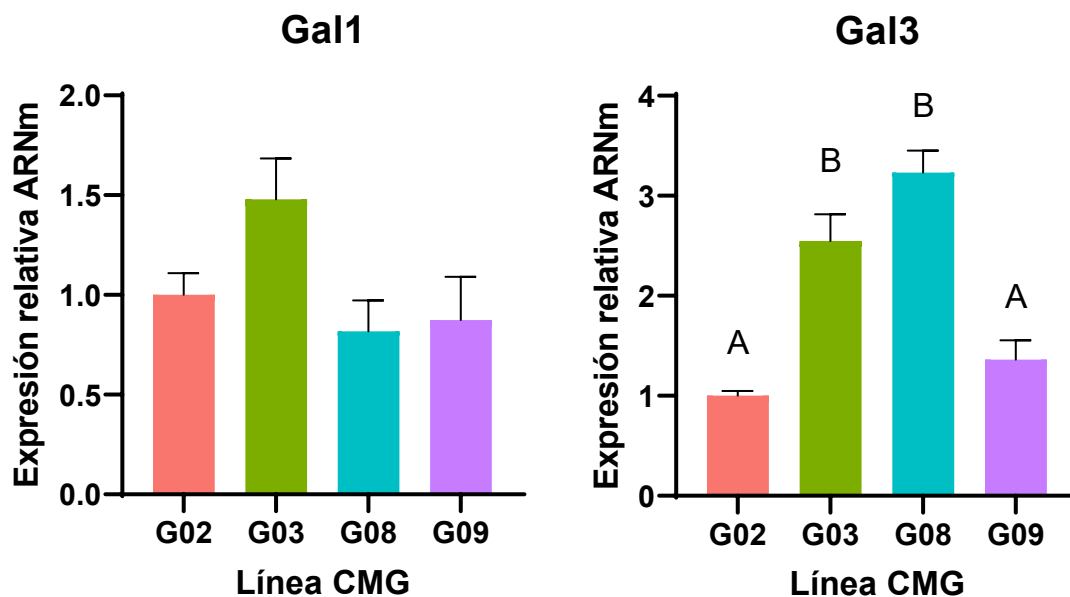


Figura 58. Cuantificación relativa del ARNm de Gal-1 y Gal-3 mediante RT-qPCR entre líneas CMG. Los valores fueron relativizados a la expresión de RPL7 y normalizados respecto a los niveles expresados por la línea de G02. Se indican las medias $\pm$ el error estándar de tres experimentos independientes.

Para silenciar estos genes se utilizaron los métodos de silenciamiento génico ya descritos basados en la transfección de siRNAs con lipofectamina. Luego de confirmar el silenciamiento de las Gal-1 y Gal-3 (Figura 59), se evaluó su efecto sobre la viabilidad, la migración y la invasión de CMG.

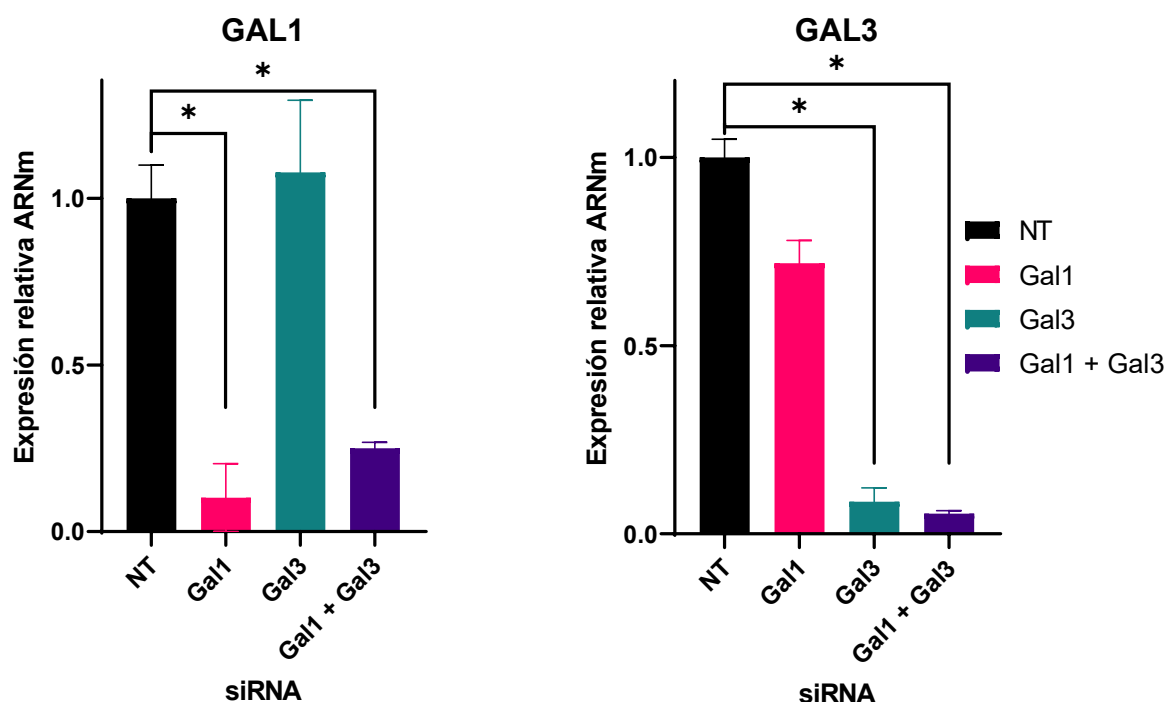


Figura 59. Cuantificación relativa de ARNm de Gal1 y Gal3 mediante RT-qPCR luego de emplear un siRNA inespecífico (NT) o siRNAs específicos para condición siRNA Gal1 o Gal3 en la línea G09. Los valores fueron normalizados mediante la expresión de RPL7 y relativizados a la condición de tratamiento con el siRNA NT. Se realizó un ANOVA de un factor con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0,05$. Las barras marcan media y error estándar.

Para evaluar el efecto de silenciar Gal-1 y Gal-3 sobre la viabilidad se cuantifico la cantidad de células muertas luego de 72 horas de silenciamiento. Es imperativo conocer el efecto sobre la muerte celular ya que puede afectar a los ensayos de migración. Se puede observar

que en la línea G09 el silenciamiento de Gal-1 aumenta significativamente la muerte. Hay que considerar este efecto cuando se interpretan los ensayos de migración.

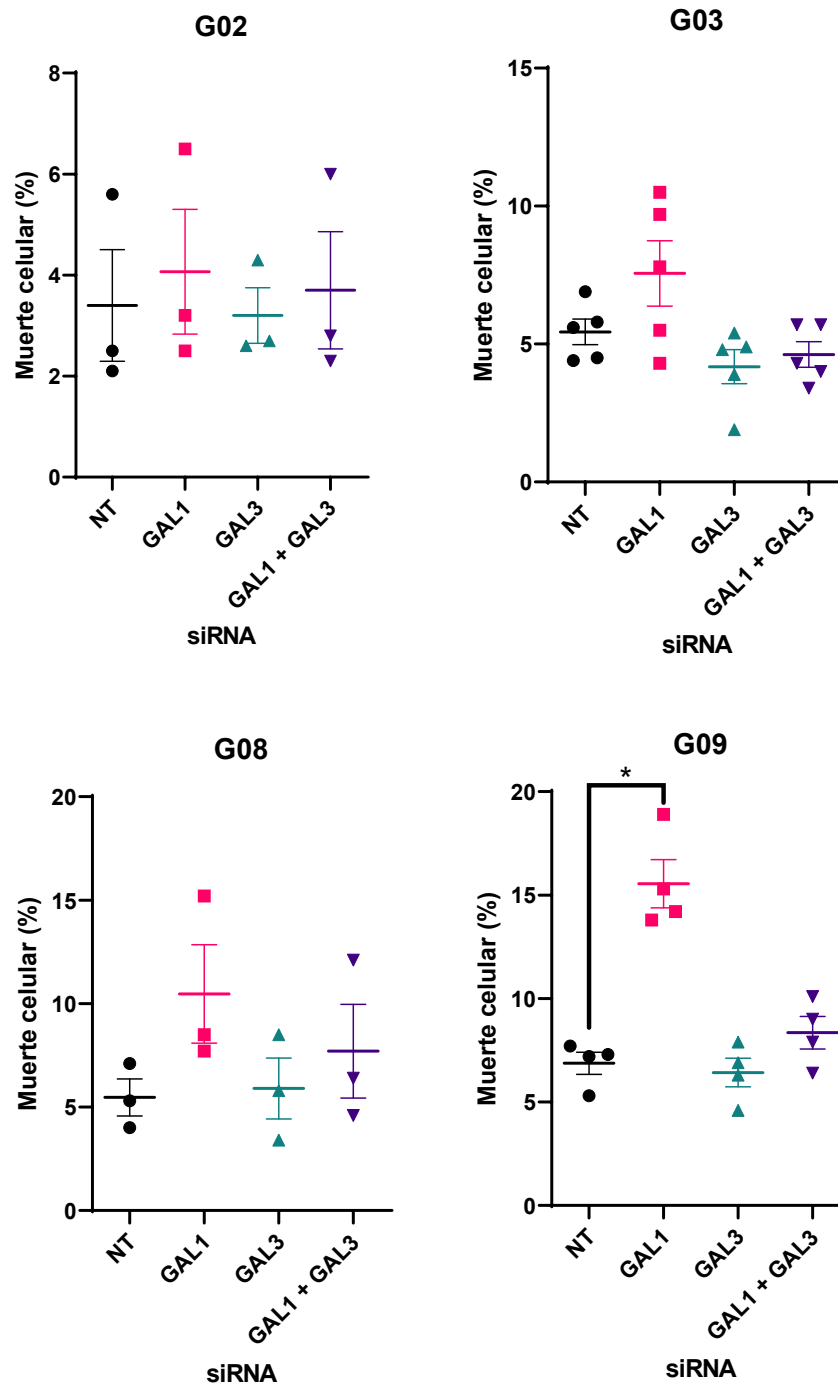


Figura 60. Muerte celular en las líneas de CMG luego de 72 horas de silenciar Gal-1, Gal-3 o ambas (Gal-1 + Gal-3) o tratar con siRNA inespecífico (NT). Se realizó un ANOVA de un factor con $p < 0,05$. Asteriscos indican

diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0,05$. Las barras marcan media y error estándar.

En la Figura 61 se puede observar que el silenciamiento de Gal-1 afecta la migración en todas las líneas ensayadas. Por más que el grado de disminución es variable entre las diferentes líneas de CMG, el efecto es claro en todos los casos. En la línea G09 se observa el efecto más pronunciado, con una disminución de aproximadamente 40%, mientras que en la línea G03 se ve el efecto menor con un poco más de 20% de disminución de la migración. Es interesante que, aunque se observaron muchas diferencias entre líneas de CMG al silenciar HIF1 α , HIF2 α , CSPG5 y FN1, se observa un patrón similar entre las líneas al silenciar Gal-1. En cuanto al rol de Gal-3 se ve un efecto similar, pero de menor grado, aunque solamente en las líneas G02 y G08 el silenciamiento de esta lectina tiene un efecto significativo, llevando a una disminución de la migración. En la línea G09 silenciar Gal-3 no parece tener efecto mientras que en la línea G03 hay una tendencia parecida a la vista en las líneas G02 y G08, pero el efecto no es significativo. El silenciamiento combinado permite determinar si hay un efecto aditivo, sinérgico o redundante entre ambas galectinas. En las líneas G02 y G08 la migración disminuye significativamente pero no más que al silenciar Gal-1 o Gal-3 individualmente. En las líneas G03 y G09, el silenciamiento de ambas galectinas en simultaneo parece disminuir la migración levemente pero no en forma significativa.

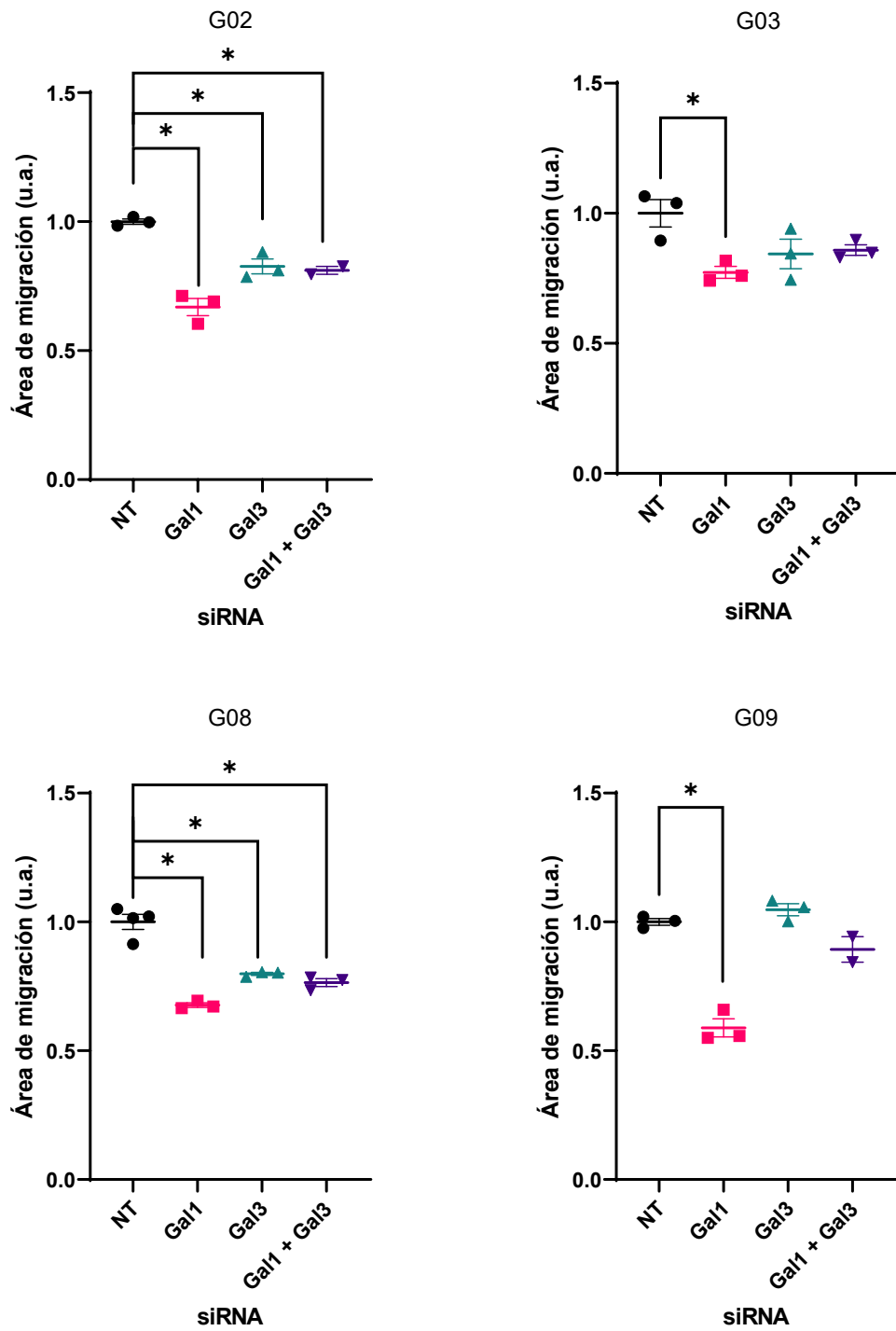


Figura 61. Migración mediante el ensayo migratorio de esfera en líneas de CMG tratadas con siRNA control inespecífico (NT), contra Gal1, Gal3 o contra ambos (Gal1 + Gal3). Se realizó un ANOVA de un factor con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0,05$. Las barras marcan media y error estándar.

Mediante ensayos de herida, se pudo observar que en las líneas G08 y G09 el silenciamiento de Gal-1 reduce significativamente la migración mientras que en las líneas G02 y G03 no causa diferencias significativas. Por su parte, el silenciamiento de Gal-3 reduce la migración significativamente en las líneas G03, G08 y G09. El silenciamiento combinado de Gal-1 y Gal-3 tiene un efecto significativo solamente en las líneas G03 y G09.

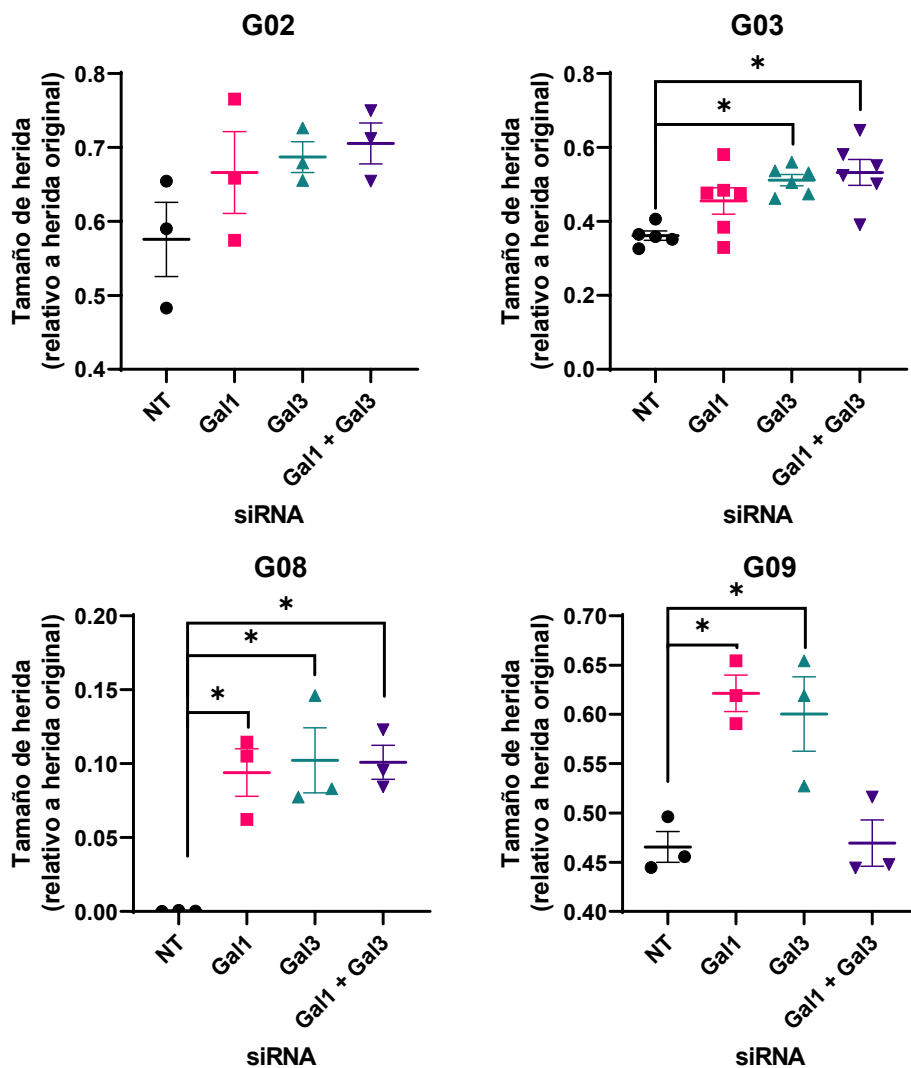


Figura 62. Migración mediante el ensayo de herida en líneas de CMG tratadas con ARN de interferencia (siRNA) control (NT), contra galectina 1 (Gal1), galectina 3 (Gal3) o contra ambos (Gal1 + Gal3). Se realizó un ANOVA de un factor con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Tukey con $p < 0,05$. Las barras marcan media y error estándar.

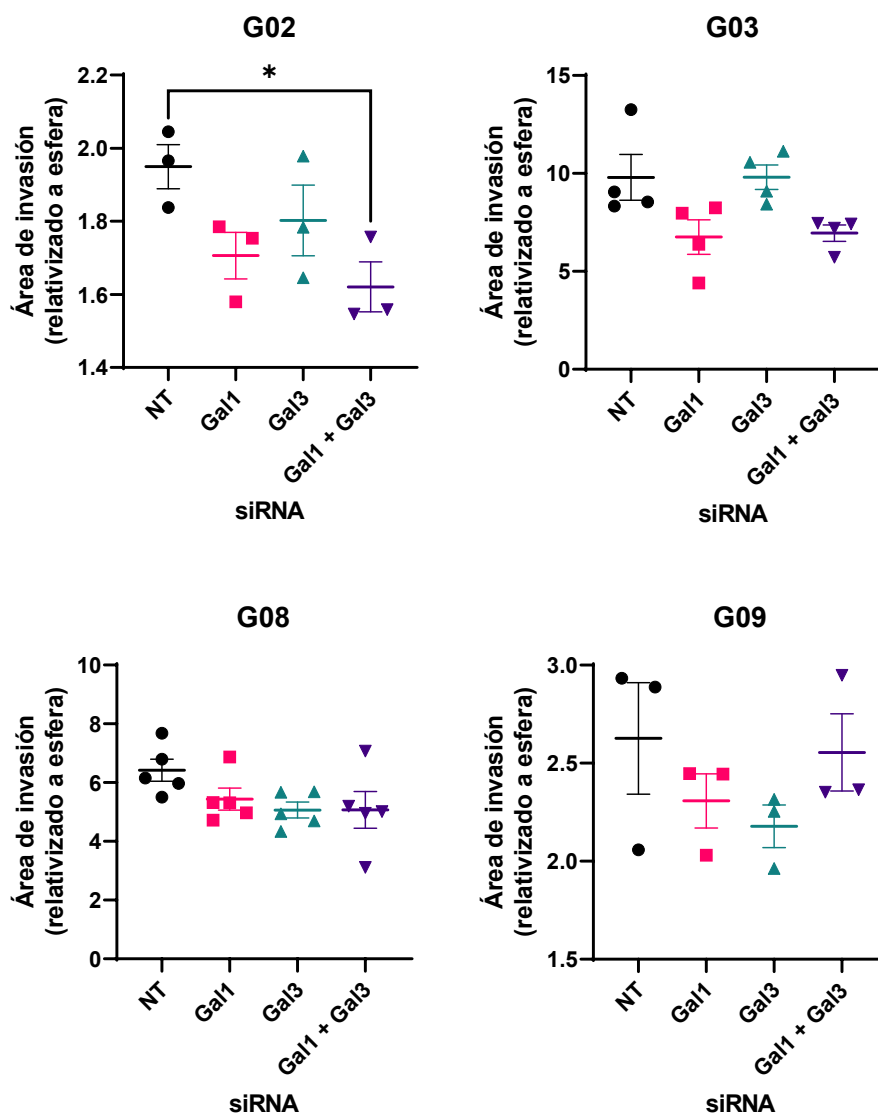


Figura 63. Invasión en líneas de CMG tratadas con ARN de interferencia (siRNA) control (NT), contra galectina 1 (Gal1), galectina 3 (Gal3) o contra ambos (Gal1 + Gal3). Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0,05$. Las barras marcan media y error estándar.

Al evaluar la invasión (Figura 63) vemos que no se ven muchas diferencias significativas entre los tratamientos, pero si se ve una tendencia. Se tendría que evaluar en mayor profundidad para establecer si esas tendencias son diferencias reales. En los ensayos de invasión, en general se ven menos diferencias entre tratamientos que en los ensayos de

migración, posiblemente, debido a que el proceso invasivo incluye múltiples pasos y por lo tanto suele requerir mayores tiempos para observar efectos evidentes. En este trabajo, no fue posible realizar ensayos de invasión más prolongados ya que implicaron el uso transitorio de siRNAs. La única diferencia significativa se observa en la línea G02 entre el silenciamiento control (NT) y el silenciamiento combinado de Gal-1 y Gal-3.

Queda claro que Gal-1 influye sobre la migración en todas las líneas ya que su silenciamiento lleva a una disminución significativa en las cuatro líneas. Gal-3 en cambio tiene un efecto significativo en las líneas G02 y G08. Es interesante notar que el silenciamiento combinado no tuvo mayor efecto que los silenciamientos por separados en migración. En el caso de invasión, como ya se observó anteriormente, hay menos sensibilidad de la técnica y la única diferencia significativa que se observó es en la línea G02 donde el silenciamiento doble de las galectinas redujo la invasión. Sin duda falta indagar en el rol de las galectinas en migración e invasión, pero el hecho de que parecen tener un efecto parecido en todas las líneas CMG es prometedor, ya que, como se ha visto, la heterogeneidad entre líneas puede llevar a efectos opuestos para algunos blancos.

Migración frente a otros estímulos

En los ensayos de migración realizados en estas líneas de CMG encontramos líneas celulares con menor o mayor capacidad migratoria, por ejemplo, en condiciones basales, observamos que las líneas G08 y G09 exhiben una mayor capacidad migratoria que las líneas G02 y G03. Además, dentro de estas líneas, G08 y G09 aumentan su migración en hipoxia, mientras que las líneas G02 y G03, incluso la disminuyen. Con estos resultados nos preguntamos si las líneas G02 y G03 tienen menor capacidad migratoria absoluta, es decir, si no tienen la habilidad de migrar más, independientemente del tratamiento, o si en respuesta a otros estímulos sí podrían aumentar su migración. Para indagar en este tema se decidió someter las células a un tratamiento que puede aumentar la migración, pero que es

independiente de la hipoxia. Se ha publicado que el medio condicionado por macrófagos tipo M2 induce la migración en células madre de glioma³³⁵. Este efecto también se ha visto en cáncer de colon³³⁶ y en cáncer de mama³³⁷.

Para evaluar si esto ocurre también en CMG, las líneas fueron expuestas a un medio de cultivo que contiene 50% medio condicionado de macrófagos con distinta polarización *in vitro* (M0, M1 o M2) y se evaluó la migración mediante el ensayo migratorio de esfera. Como control se utilizó medio condicionado por la misma línea celular. Este medio condicionado por la misma línea celular también podría inducir migración ya que puede generar un efecto de hambre por el consumo de nutrientes³³⁸, o pueden acumularse moléculas de señalización producidas por el mismo tumor. Al observar los resultados del ensayo migratorio de esfera empleando medios condicionados (Figura 64), se pueden observar dos patrones. Antes de analizar el efecto del medio condicionado de macrófagos, es interesante notar que el medio condicionado propio genera un aumento en la migración en las líneas G02, G03 y G09. Este resultado es interesante porque muestra que, por más que la hipoxia no induce migración en las líneas G02 y G03, otros estímulos si pueden inducirla. En las líneas G03 y G08 se observa que el medio condicionado de macrófagos puede inducir aún más la migración. Por lo tanto, la falta de inducción en hipoxia de algunas líneas no sería por una falla en los mecanismos que regulan la migración. Por el contrario, es posible que cada línea de CMG responda de manera diferencial a distintos estímulos. Por ejemplo, mientras que la línea G09 aumenta significativamente su migración en hipoxia, la línea G03 lo hace frente a los medios condicionados por macrófagos. Es interesante notar, una vez más, la heterogeneidad entre las líneas de CMG en su respuesta a estímulos.

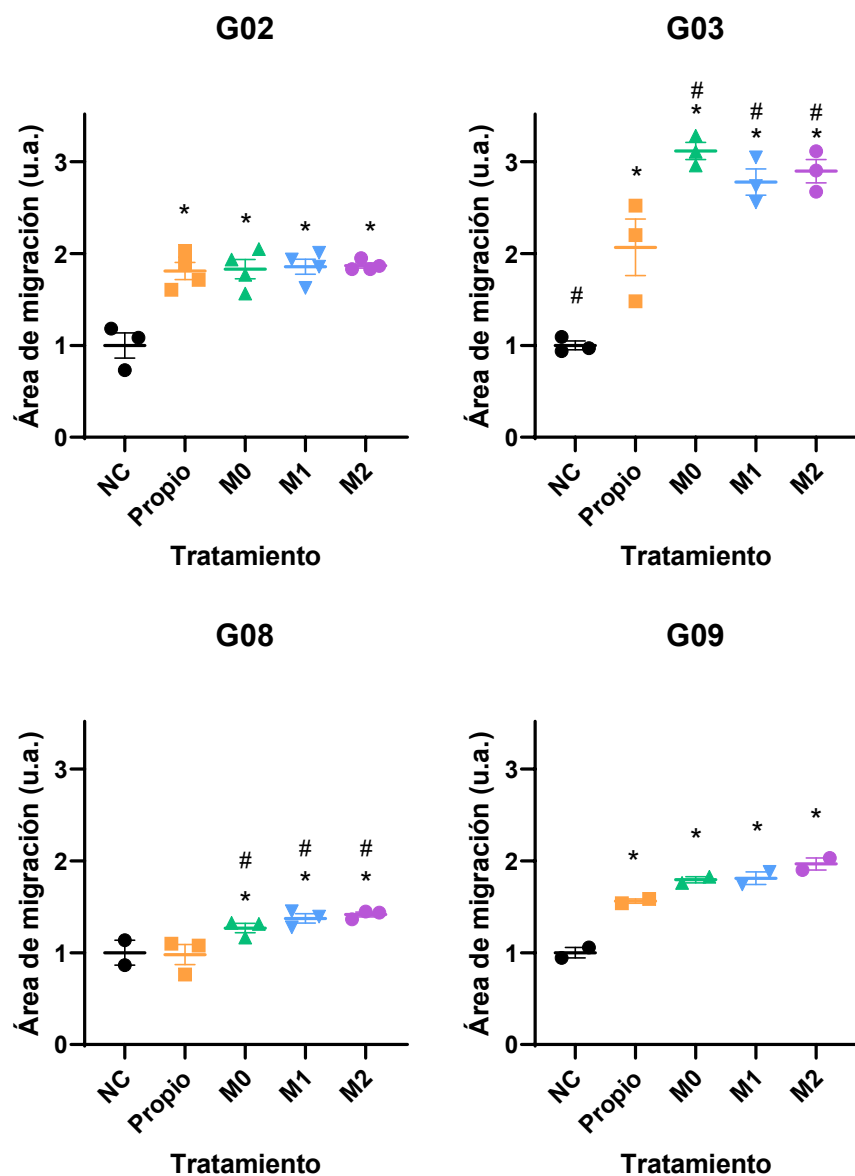


Figura 64. Migración mediante el ensayo de spreading en líneas de CMG tratadas con medio condicionado de macrófagos. NC indica sin tratamiento de medio condicionado, Propio es medio condicionado por la correspondiente línea de CMG, M0, M1, y M2 son medios condicionados de los respectivos macrófagos. Se realizó un ANOVA de dos factores con $p < 0,05$. Los asteriscos indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0,05$ comparado con la condición NC, los numerales indican diferencias significativas por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0,05$ comparado con la condición Propio. Las barras marcan media y error estándar.

Conclusiones del capítulo

Con los resultados de este capítulo se logró el último objetivo del trabajo: evaluar posibles blancos y su efecto sobre la migración e invasión. Se evaluó el rol de HIF1 α y HIF2 α en la migración y se observó que estos factores controlan la migración en todas las líneas de CMG. Llamativamente, el silenciamiento de ambas proteínas tuvo un efecto diferente en distintas líneas de CMG. En las líneas G08 y G09, HIF1 y HIF2 estimulan la migración ya que al silenciar las respectivas subunidades α la migración disminuye. En G02 y G03, en cambio, se ve el efecto opuesto, ya que HIF1 y HIF2 inhiben la migración. Esto concuerda con el patrón de migración observado en normoxia e hipoxia, en donde mientras en G08 y G09 la hipoxia aumenta la migración, en G02 la disminuye. En G03 no se observan cambios significativos en la migración en hipoxia, pero las proteínas HIF inhiben dicha migración y se estabilizan con hipoxia. En los procesos de invasión, se observa un patrón similar a los observados en migración en respuesta a hipoxia. Con estos resultados se puede concluir que la hipoxia afecta la migración y parte de esta respuesta esta mediada por las proteínas HIF, pero que el efecto de estas proteínas no es el mismo en todas las líneas CMG.

Al evaluar la participación de CSPG5 en la migración de las CMG, se pudo observar que su silenciamiento conllevó un aumento moderado de la migración en las líneas G02, G03 y G09. Por más que CSPG5 parece inhibir la migración, su efecto no parece ser determinante en cuanto a la migración de las CMG.

Por su parte, el análisis del rol de la fibronectina en la migración de estas células se realizó tanto mediante silenciamientos génico, como utilizando fibronectina y/o laminina como sustratos. Mediante el silenciamiento génico se observó que en G03 y G08 la disminución de los niveles de expresión de FN1 genera un aumento de migración (en G02 se observa la misma tendencia). En este caso las esferas formadas tienen una menor abundancia de fibronectina (endógena) y el sustrato (laminina) no posee fibronectina. En la evaluación de

la migración alterando la composición del sustrato, se observó que la migración en las líneas parece aumentaren presencia de menores concentraciones de fibronectina ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) combinadas con laminina, pero mayores concentraciones ($4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) conllevan un efecto opuesto. Como se mencionó previamente, en estos ensayos las células están expresando fibronectina, la cual podría estar favoreciendo la adhesión intercelular en las esferas y por lo tanto dificultando la migración sobre el sustrato (laminina). Al silenciar FN1, se reduce la fibronectina endógena y se favorece así la liberación de células de la esfera y la consecuente migración de estas sobre la laminina. Por otra parte, al agregar fibronectina al sustrato ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), sin alterar los niveles de expresión endógenos, se favorecería la adhesión de las células con el sustrato por sobre la adhesión intercelular dentro de las esferas. Por último, si la concentración de fibronectina en el sustrato (no en la esfera) supera ciertos niveles, es posible que ésta promueva una adhesión al sustrato tan fuerte, que dificulte la migración. Sin duda la fibronectina tiene un efecto sobre la migración y parece depender de su concentración. Por lo tanto, este resultado amerita profundizar el estudio del rol de la fibronectina en la migración de las CMG.

Los roles de Gal-1 y Gal-3 se estudiaron tanto individualmente como en conjunto. En los ensayos de viabilidad se observó que el silenciamiento de Gal-1 aumenta significativamente la muerte celular en G09, por lo tanto, hay que interpretar los ensayos de migración con cautela. Al silenciar Gal-1 se puede ver una disminución en la migración en todas las líneas CMG estudiadas. Al silenciar Gal-3 la migración disminuye significativamente en G02, G08 y G09. El silenciamiento simultáneo de ambas galectinas no pareció tener efecto mayor que el de cada una de ellas por separado. En cuanto a los efectos sobre la capacidad invasiva de las CMG, no se observan diferencias significativas, con la excepción de la línea G02, en la cual silenciamiento simultaneo de Gal-1 y Gal-3 reduce significativamente la invasión. Posiblemente, la falta de efecto significativo se deba a la baja sensibilidad de esta técnica. Sin duda el efecto de estas proteínas sobre la migración es considerable y homogéneo entre las líneas. Esto indica que estas galectinas, particularmente Gal-1, es un blanco potencial para afectar la migración.

Por último, se evaluó el efecto de otros posibles inductores de la migración para determinar si líneas de CMG que menos migran y que no muestran inducción de la migración en respuesta a hipoxia (G02 y G03) pueden, bajo ciertos estímulos, migrar más. Se encontró que, en todas las líneas, o el medio condicionado propio o los medios condicionados por macrófagos son capaces de inducir la migración significativamente.

Conclusiones finales y perspectivas

Los GBM se caracterizan por su agresividad y heterogeneidad. A pesar de décadas de investigación, el tratamiento estándar sólo ha cambiado sutilmente, y no logra extender la mediana de la supervivencia de los pacientes más allá de unos 15 meses²⁵. La imposibilidad para tratar efectivamente a estos tumores se debe, en gran parte, a la heterogeneidad intratumoral, ya que dificulta el desarrollo de tratamientos que puedan afectar a todo el tumor. Además, la población de CMG exhibe una mayor radio- y quimio-resistencia, dando lugar a tumores recurrentes⁴¹. El GBM también se caracteriza por su naturaleza difusa, con células tumorales que logran incluso migrar a distancias considerables de la masa tumoral. Su difusión impide la resección quirúrgica completa, lo que provoca tanto recidivas cerca de los márgenes, como lesiones satélite distantes⁸². Esta característica es una de las que lo convierte en uno de los tumores más agresivos. Otro rasgo característico de los GBM son los focos de hipoxia que se encuentran frecuentemente en los tumores¹⁹⁶. Distintas estrategias terapéuticas en GBM, como el bevacizumab, buscan inhibir la angiogénesis y, por lo tanto, aumentar la hipoxia y los efectos deletéreos que esta causa sobre el tumor. Lamentablemente, uno de los efectos contraindicados de estas estrategias es el aumento de la invasividad del tumor generada por la hipoxia⁸⁸.

A partir de lo mencionado, se planteó la hipótesis de que las diversas líneas de CMG derivadas de pacientes poseen diferentes capacidades migratorias e invasivas, determinadas, al menos en parte, por sus respectivos perfiles transcriptómicos. Además, se propuso que la hipoxia actúa como un estímulo que induce la capacidad migratoria de las CMG. Para poner a prueba esta hipótesis, el primer objetivo que se planteó fue caracterizar la capacidad migratoria e invasiva de distintas líneas de CMG derivadas de pacientes, tanto en normoxia como en hipoxia. Mediante ensayos de migración e invasión *in vitro* se encontró una heterogeneidad considerable de las líneas de CMG evaluadas. Ciertas líneas celulares tales como G08 y G09 mostraron una capacidad migratoria basal significativamente mayor a la de otras líneas de CMG, como las G02 y G03. Llamativamente, cuando se determinó la capacidad invasiva se encontró que no había una correlación

directa entre la capacidad migratoria y la invasiva, ya que G09, una de las líneas de CMG con mayor migración, demostró una baja capacidad invasiva y, G03, una línea de CMG con baja migración, exhibió la mayor capacidad invasiva. Estos resultados remarcaban las diferencias entre ambos procesos. Al estudiar el efecto de la hipoxia sobre la migración e invasión se volvió a ver una elevada heterogeneidad entre las distintas líneas de CMG. Notablemente, a diferencia de lo esperado, la hipoxia no induce la migración y la invasión en todas las líneas de CMG examinadas. En este sentido, mientras que en las líneas G08 y G09 la hipoxia, tal como se esperaba, induce la migración, en la línea G02 la disminuye. En la línea G03 no se observaron diferencias significativas. Este resultado fue sorprendente porque, hasta el momento, toda la bibliografía referida al efecto de la hipoxia sobre GBM posiciona a ésta como una inductora de la migración e invasión^{202,339,340}. Al presente se ha reportado que solamente en macrófagos y monocitos la hipoxia es capaz de inhibir la capacidad migratoria^{239,240}. Queda pendiente entonces establecer si la línea G02 comparte o no vías y mecanismos con estas células del sistema inmune en respuesta a hipoxia. Por último, se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de adhesión de las líneas de CMG. Se observó que las líneas G02 y G03 tienen mayor capacidad de adhesión que las líneas G08 y G09. La adhesión es un proceso clave para la migración ya que a muy baja adhesión la migración se inhibe por la imposibilidad que posee la célula para generar tensión; pero, una adhesión muy alta también inhibe la migración ya que la célula no puede desprenderse para avanzar³⁴¹. La regulación de la adhesión célula-célula también tiene un rol en la migración colectiva³⁴². Considerando que las líneas G02 y G03 muestran la mayor adhesión, es posible que ésta sea responsable de la baja capacidad migratoria. Esta alta adhesión se puede deber a múltiples factores y proteínas, incluyendo la expresión y actividad de las proteínas transmembrana de adhesión, y la composición de la MEC.

A continuación, en el segundo capítulo de resultados de esta tesis, se realizó un análisis de la transcriptómica de las líneas CMG en normoxia e hipoxia para indagar en la heterogeneidad que presentan sus transcriptomas y para analizar diferencias en vías y genes asociados a procesos de migración e invasión, tanto entre las diferentes líneas de CMG como en la respuesta de cada una de ellas a condiciones de hipoxia. Al analizar las

diferencias y similitudes entre las muestras se encontró, como era esperable, que “línea celular” era la variable responsable de la mayor variabilidad entre las muestras. La única excepción para esto fue en el caso de la línea G02, en donde las muestras en hipoxia difirieron considerablemente incluso de las muestras de la línea G02 en normoxia. Esto coincide con que la línea G02 es la que mostró el mayor cambio a nivel transcriptómico frente a condiciones de hipoxia. El análisis de similitud entre muestras también mostró que las líneas G08 y G09 son más similares entre sí que con las otras líneas CMG. Estos resultados confirman la heterogeneidad entre las líneas de CMG, la cual es reflejo de la heterogeneidad inter-tumoral de los GBM.

Con el objetivo de identificar posibles blancos terapéuticos que interfieren en la migración e invasión de las CMG, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes entre las líneas. Para ello, se comparó la expresión de genes en cada línea CMG con la mediana de todas las muestras en normoxia. Analizando los genes expresados diferencialmente para cada línea de CMG, se buscaron genes ligados a la migración, invasión y procesos relacionados. Se encontraron varios genes de interés ligados a estos procesos, cuya expresión muestra una correlación, tanto positiva (por ejemplo, NCAN) como negativa (por ejemplo, SEMA3C y CDH8) con la capacidad migratoria de las CMG. En cuanto a la invasión, se buscaron genes expresados diferencialmente entre G03 y G08, las dos líneas de CMG con mayor invasión, y G02 y G09, las dos líneas de CMG con menor invasión. Los genes encontrados incluyeron LGALS3 y TSPAN7 en G03 y G08 y COL2A1 en G02 y G09. Luego, se evaluaron los genes inducidos y disminuidos con hipoxia en cada línea de CMG que siguieron un patrón de cambio similar al de la capacidad migratoria (en hipoxia vs normoxia). Notablemente se encontraron ciertos genes inducidos en las líneas G08 y G09, pero no en G02 y G03. Estos genes, entre ellos CSPG5, podrían estar relacionados con la migración.

Después de analizar la expresión diferencial de genes, se determinaron conjuntos de genes diferencialmente enriquecidos entre las líneas de CMG. Analizar las vías, más allá de los genes individuales, permite definir qué procesos están afectados y permite reconocer si existen procesos en común entre las diferentes muestras, más allá de que la expresión diferencial de genes individuales sea distinta. Al comparar las vías enriquecidas basalmente

en las líneas G02 y G03 con respecto a las líneas G08 y G09, se observó que estas tienen enriquecidas vías asociadas a la adhesión celular y a los componentes de la MEC. Esto apoya lo observado en los ensayos de adhesión, los cuales muestran que las líneas G02 y G03 poseen una mayor capacidad de adhesión que las líneas G08 y G09. Cuando se analizaron las vías afectadas por hipoxia en las distintas líneas de CMG, se observó que estas mismas vías de adhesión y de componentes de la MEC que se encontraban enriquecidas en las líneas G02 y G03, eran vías que se enriquecían en respuesta a hipoxia en las líneas G08 y G09. Este fenómeno puede parecer contradictorio ya que las líneas G02 y G03 muestran una menor migración basal y en las líneas G08 y G09 aumenta la migración en hipoxia. Una interpretación posible de este comportamiento podría consistir en que las líneas G02 y G03 tengan una adhesión tan elevada que sea capaz de inhibir la migración. En cambio, si en las líneas G08 y G09 hay una baja adhesión, el aumento de esta podría favorecer la capacidad migratoria de estas líneas. Esto sería un ejemplo que permite comprender que la adhesión celular no tiene necesariamente una relación lineal con la migración. Para profundizar el análisis de estas vías, se analizaron los genes líderes de cada una de ellas, es decir los genes responsables del enriquecimiento de las vías. En estos casos, encontramos que CSPG5, FN1 y varias lamininas y colágenos eran genes líderes.

Al analizar las vías afectadas por la hipoxia, también observamos que la vía de HIF fue inducida en respuesta a hipoxia en todas las líneas. Por más que este resultado pueda considerarse previsible, es un dato relevante, ya que, en respuesta a hipoxia, dos de las cuatro líneas de CMG (G02 y G03) no inducen su capacidad migratoria. Esto podría deberse, por ejemplo, a una falla en la detección de la falta de oxígeno por las células. Sin embargo, como mencionamos previamente, la inducción de la vía de HIF muestra que todas las líneas son capaces de responder a hipoxia. Analizando esta vía, también determinamos su enriquecimiento en la línea G02 en normoxia. Al profundizar en la vía, observamos que, en comparación con el resto de las líneas, en G02 se reduce la expresión PHD1 en hipoxia, lo cual podría impactar en una mayor estabilidad de HIF1. También encontramos que HIF3, que inhibe a HIF1 y HIF2²⁰¹, se induce con hipoxia en todas las líneas CMG menos en la línea G02. En conjunto estos resultados podrían explicar los grandes cambios transcriptómicos

que se observan en esta línea en respuesta a hipoxia. En el análisis de la actividad de HIF también hay que considerar el tiempo de hipoxia, ya que la hipoxia tardía muestra distintos efectos que la hipoxia temprana. En estudios en células endoteliales, se encontró que HIF1 α tiene un pico de estabilización a las 4 horas de iniciada la hipoxia, y sus niveles de expresión se reducen significativamente a partir de las 8 horas en adelante. Por su parte, HIF2 α tiene un pico a las 8 horas de hipoxia y sus niveles se vuelven a reducir a las 24 horas. Se ha demostrado que este proceso surge de la reactivación de las PHDs y de la inestabilidad del mensajero de HIF1 α ³⁴³. La hipoxia prolongada también se regula mediante un ARN antisentido de HIF1³⁴⁴.

En base a todos estos análisis y con el propósito de encontrar posibles blancos terapéuticos orientados a interferir en la migración e invasión de las CMG, confeccionamos una lista de genes que podrían, en principio, participar del control de estos procesos. Finalmente, de esta lista seleccionamos ciertos genes para estudiar *in vitro* su relevancia biológica en la migración e invasión.

Inicialmente analizamos el rol de las proteínas HIF. Como ya se mencionó, estas proteínas detectan la hipoxia y modulan la respuesta a ella. En base a los resultados de la transcriptómica, decidimos analizar si las proteínas HIF, que según la bibliografía inducen la migración e invasión en GBM^{192,345}, ejercen o no el mismo rol en todas las líneas CMG. Particularmente, nos interesó su rol en las líneas G02 y G03, ya que en estas líneas de CMG ni la migración ni la invasión aumentan con hipoxia. Al silenciar HIF1 α y HIF2 α mediante ARN pequeños de interferencia, se observó que en las líneas G08 y G09 la migración e invasión disminuyen, indicando que estos factores regulan ambos procesos. Notablemente, el silenciamiento de HIF1 α y HIF2 α tuvo, aún en normoxia, efectos sobre la migración, revelando que la vía de HIF está activa también en presencia de oxígeno. Por otra parte, resultó llamativo que en las líneas G08 y G09, HIF1 α y HIF2 α presentan una participación característica. En la línea G09 HIF1 α resultó ser la única HIF relevante para la migración, mientras que en la línea G08, ambos HIF inducen la migración. Aún en estas líneas tan similares es posible encontrar diferencias. Tras el silenciamiento de HIF1 α y HIF2 α en las líneas G02 y G03, observamos una inducción de la migración. Esto indicaría que las

proteínas HIF, en estas líneas, están inhibiendo la migración. Al igual que en la línea G08, se observó que las proteínas HIF son relevantes, aún en normoxia. Este rol de HIF1 y HIF2 es novedoso en GBM, ya que, hasta el momento de escribir de esta tesis, no existen publicaciones que indiquen que los factores HIF inhiban la migración. Además, este resultado va de la mano con el hecho de que la hipoxia inhibe la migración de estas dos líneas de CMG. Los resultados de los ensayos de migración e invasión luego de silenciar los genes HIF resaltan la importancia de no generalizar sobre los GBM. A pesar de las similitudes en el diagnóstico de estos tumores, las CMG de cada paciente muestran comportamientos muy diferentes frente a la hipoxia, en las cuales los factores HIF también pueden desempeñar roles particulares. Por lo tanto, el desarrollo de cualquier tipo de terapia dirigida a afectar la respuesta de estos tumores a hipoxia tiene que considerar la elevada heterogeneidad inter-tumoral de los GBM. En esta tesis sólo hemos analizado cuatro líneas de CMG, pero es muy probable que la variabilidad de las CMG de diferentes pacientes sea aún mayor que la vista en este trabajo. Este resultado también es relevante en el contexto del tratamiento con bevacizumab, un anticuerpo anti VEGF que, al inhibir la angiogénesis, induce hipoxia. Una de las contraindicaciones de este tratamiento fue la inducción de la invasión tumoral desencadenada por la hipoxia. Considerando que en este trabajo se identificaron líneas de CMG (G02 y G03) cuya migración no se induce con la hipoxia, sería interesante estudiar si existe un subconjunto de GBM que se comporten como estas líneas y por ello respondan mejor a bevacizumab. Muchas veces, como se plantea en el área de la medicina de precisión, los tratamientos se vuelven más eficaces no por encontrar una droga novedosa, sino por detectar subpoblaciones de pacientes con mejor respuesta a un tratamiento ya conocido.

Luego de evaluar las proteínas HIF se estudiaron dos componentes de la MEC que surgieron como genes blanco del análisis bioinformático: neuroglicano C (CSPG5) y fibronectina (FN1). CSPG5 es un proteoglicano de la MEC poco estudiado. En este trabajo se evaluó su rol en migración en las líneas de CMG y se observó que en G02 y G03 su silenciamiento conllevó un aumento de la migración, revelando que CSPG5 tiene un rol inhibitorio sobre la migración de estas líneas CMG. En la línea G09, en cambio pareciera tener un rol inductor

de la migración. Aun así, estos efectos son sutiles y el silenciamiento de CSPG5, por sí solo, no parece tener un gran efecto sobre la migración; por lo tanto, se descartó profundizar en su rol en las líneas de CMG. FN1, por su parte, es un componente de la MEC y en el cerebro se encuentra en los espacios perivasculares, sitio por donde las células de GBM frecuentemente migran. En el análisis de la secuenciación de ARN se observó que esta proteína se encontraba considerablemente más expresada en las líneas CMG de baja migración. Los experimentos *in vitro* demostraron que FN1 tiene un rol complejo en la migración. Silenciar FN1 conlleva un aumento de la migración en las líneas G02, G03 y G08. Al medir la migración sobre un sustrato compuesto por laminina y FN1, se observó una tendencia similar en las cuatro líneas de CMG, en la cual agregar fibronectina en ciertas concentraciones causa un aumento de la migración, pero el agregar de una mayor concentración la inhibe. Un fenómeno parecido está descrito en estudios realizados en presencia de HA¹²⁴ y CSPGs¹³² en donde la concentración de estos factores determina su efecto. Pareciera que dependiendo de la concentración y el origen de la fibronectina (endógeno o exógeno), esta proteína puede inhibir o inducir la migración. Sería interesante seguir indagando y evaluar su efecto sobre la invasión de CMG.

En este trabajo también pudimos estudiar el rol de Gal-1 y Gal-3 en la migración e invasión. En todas las líneas de CMG se observó que el silenciamiento de Gal-1 y Gal-3 reduce la migración al menos en uno de los ensayos. En la línea G09 se observa la mayor inhibición. A pesar de la heterogeneidad en las líneas de CMG, en este caso se observó una respuesta similar en todas las líneas. Este resultado indica que las galectinas son proteínas que ameritan seguir siendo estudiadas como potenciales blancos contra la capacidad migratoria de los GBM.

Finalmente, evaluamos el efecto de distintos medios condicionados sobre la migración de las CMG. En primer lugar, encontramos que los medios condicionados por la misma línea de CMG, causaron un aumento de la migración en tres de las cuatro líneas celulares estudiadas. Por su parte, los medios condicionados por macrófagos (con distinta polarización) también aumentaron la migración y este efecto se observó en todas las líneas de CMG. Es importante destacar que todos los medios condicionados utilizados

promovieron un aumento significativo de la migración en las líneas G02 y G03, las cuales tienen una migración basal reducida que no se incrementa en hipoxia. Esto permitió concluir que la baja migración y falta de inducción en hipoxia de la migración en G02 y G03 no se debe a una dificultad intrínseca de estas células para migrar, sino que esta capacidad depende del estímulo adecuado.

Respecto a las distintas hipótesis de esta tesis, la hipótesis referida a la heterogeneidad entre las distintas líneas de CMG no fue rechazada ya que, justamente se observó una gran variabilidad en cada una de las características estudiadas. En cuanto a la hipótesis sobre la inducción de la migración e invasión en respuesta a hipoxia, ésta fue rechazada. A diferencia de lo esperado, no se observó inducción de migración e invasión en hipoxia en todas las líneas de CMG. Si bien en G08 y G09 el comportamiento fue coherente con la hipótesis, en G02, G03 y G05 se observó un comportamiento distinto. En la línea G03 no se observaron cambios, mientras que en G02 y G05, incluso, se observó una disminución significativa de la migración.

En conclusión, al finalizar este trabajo, se lograron encontrar posibles blancos capaces de interferir en los procesos de migración e invasión en GBM, tanto en condiciones basales como en respuesta a hipoxia. Entre ellos, CSPG5, mostró un efecto limitado, indicando que su silenciamiento individual no es suficiente para causar un efecto considerable. Otros blancos, como Gal-1 y Gal-3, mostraron un efecto más contundente y con efectos similares en todas las líneas estudiadas. Si bien en este trabajo pudimos evaluar el rol de diferentes factores en la migración e invasión de CMG derivadas de pacientes, muchos otros factores con un posible rol en estos procesos quedaron sin ser estudiados, quedando pendientes para futuros proyectos. La secuenciación masiva y la bioinformática son herramientas invaluable para realizar análisis exploratorios y predictivos, pero sólo la validación en las células permite confirmar los resultados obtenidos. En esta tesis también se hizo muy evidente la relevancia de la medicina personalizada en el campo de los GBM. Los protocolos actuales que permiten derivar líneas de CMG a partir de muestras quirúrgicas, permiten obtener material para obtener información específica del tumor. Estos protocolos permiten contar con un número aceptable de muestras derivadas de pacientes para el testeo de

drogas y /o de diferentes esquemas terapéuticos. Queda claro entonces que englobar a todos los GBM como si fueran idénticos, no es una estrategia viable.

Bibliografía

1. Hardwidge, C. & Hettige, S. Tumours of the central nervous system. *Surgery (Oxford)* **30**, 155–161 (2012).
2. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020. *Neuro-Oncology* **25**, iv1–iv99 (2023).
3. Davis, M. E. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Seminars in Oncology Nursing* **34**, 420–429 (2018).
4. Miller, K. D. *et al.* Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **71**, 381–406 (2021).
5. Modrek, A. S., Bayin, N. S. & Placantonakis, D. G. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells* **6**, 43–52 (2014).
6. Jäkel, S. & Dimou, L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, (2017).
7. Martín Estebané, M. Origen y entrada de precursores microgliales durante el desarrollo embrionario de la retina de codorniz. (Universidad de Granada, 2017).
8. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* **23**, 1231–1251 (2021).
9. Park, Y. W. *et al.* The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 2—Summary of Imaging Findings on Pediatric-Type Diffuse High-Grade Gliomas, Pediatric-Type Diffuse Low-Grade Gliomas, and Circumscribed Astrocytic Gliomas. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **58**, 690–708 (2023).
10. Khan, A. A. *et al.* Proposed novel classification of circumscribed Lower-Grade Gliomas (cLGG) vs. infiltrating Lower-Grade Gliomas (iLGG): Correlations of radiological features and clinical outcomes. *World Neurosurgery: X* **23**, 100356 (2024).
11. Brat, D. J. *et al.* cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for ‘Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV’. *Acta Neuropathol* **136**, 805–810 (2018).
12. Brat, D. J. *et al.* Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* **64**, 920–927 (2004).
13. Yabo, Y. A., Niclou, S. P. & Golebiewska, A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **24**, 669–682 (2022).
14. Lauko, A., Lo, A., Ahluwalia, M. S. & Lathia, J. D. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. *Seminars in Cancer Biology* **82**, 162–175 (2022).
15. Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G. & Brat, D. J. ‘Pseudopalisading’ Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **65**, 529–539 (2006).
16. van't Hek, R. *et al.* Age and sex disparities in Latin-American adults with gliomas: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol* **164**, 535–543 (2023).
17. Prost, D. M. *et al.* Effects of time to chemoradiation on high-grade gliomas from the Buenos Aires Metropolitan Area. *PLOS ONE* **16**, e0249486 (2021).
18. Carrano, A., Juarez, J. J., Incontri, D., Ibarra, A. & Guerrero Cazares, H. Sex-Specific Differences in Glioblastoma. *Cells* **10**, 1783 (2021).

19. Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–173 (2006).
20. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
21. Wang, G. *et al.* Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* **32**, (2017).
22. Madurga, R. *et al.* Normal tissue content impact on the GBM molecular classification. *Briefings in Bioinformatics* **22**, bbaa129 (2021).
23. Yoon, B.-H. *et al.* IDH-wildtype secondary glioblastoma arising in IDH-mutant diffuse astrocytoma: a case report. *British Journal of Neurosurgery* **37**, 1233–1236 (2023).
24. Nahm, J. *et al.* Overall survival in patients with recurrent glioblastomas with combination chemotherapy and tumor treating fields (TTF). *JCO* **41**, e14057–e14057 (2023).
25. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**, 987–996 (2005).
26. Fernandes, C. *et al.* Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. in *Glioblastoma* (ed. De Vleeschouwer, S.) (Codon Publications, Brisbane (AU), 2017).
27. Rajaratnam, V. *et al.* Glioblastoma: Pathogenesis and current status of chemotherapy and other novel treatments. *Cancers* **12**, (2020).
28. Gilbert, M. R. *et al.* A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med* **370**, 699–708 (2014).
29. Chowdhary, S. A., Ryken, T. & Newton, H. B. Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis. *J Neurooncol* **122**, 367–382 (2015).
30. Lim, M., Xia, Y., Bettegowda, C. & Weller, M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 422–442 (2018).
31. Yang, M., Oh, I. Y., Mahanty, A., Jin, W.-L. & Yoo, J. S. Immunotherapy for Glioblastoma: Current State, Challenges, and Future Perspectives. *Cancers* **12**, 2334 (2020).
32. Martikainen, M. & Essand, M. Virus-Based Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers (Basel)* **11**, 186 (2019).
33. Rick, J., Chandra, A. & Aghi, M. K. Tumor treating fields: a new approach to glioblastoma therapy. *J Neurooncol* **137**, 447–453 (2018).
34. Huang, J. *et al.* Effects of beta1-integrin, fibronectin and laminin on invasive behavior of human gliomas. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **35**, 478–482 (2006).
35. Wenger, C. *et al.* A Review on Tumor-Treating Fields (TTFields): Clinical Implications Inferred From Computational Modeling. *IEEE Rev Biomed Eng* **11**, 195–207 (2018).
36. Birzu, C. *et al.* Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers* **13**, 47 (2021).
37. Kazmi, F., Soon, Y. Y., Leong, Y. H., Koh, W. Y. & Vellayappan, B. Re-irradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol* **142**, 79–90 (2019).
38. Perry, J. R. *et al.* Phase II Trial of Continuous Dose-Intense Temozolomide in Recurrent Malignant Glioma: RESCUE Study. *JCO* **28**, 2051–2057 (2010).
39. Wick, W. *et al.* Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med* **377**, 1954–1963 (2017).
40. Guidelines Detail. *NCCN* <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail>.
41. Osuka, S. & Meir, E. G. V. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest* **127**, 415–426 (2017).

42. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* **10**, 68 (2019).
43. Definition of hematopoietic stem cell - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/hematopoietic-stem-cell> (2011).
44. Casado-Díaz, A. Stem Cells in Regenerative Medicine. *J Clin Med* **11**, 5460 (2022).
45. Atashzar, M. R. et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *Journal of Cellular Physiology* **235**, 790–803 (2020).
46. Capp, J.-P. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *Journal of Oncology* **2019**, e5189232 (2019).
47. Maehle, A.-H. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and Records of the Royal Society* **65**, 359–378 (2011).
48. Stevens, L. C. & Little, C. C. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **40**, 1080–1087 (1954).
49. Solter, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* **7**, 319–327 (2006).
50. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730–737 (1997).
51. Hermann, P. C., Bhaskar, S., Cioffi, M. & Heeschen, C. Cancer stem cells in solid tumors. *Seminars in Cancer Biology* **20**, 77–84 (2010).
52. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 3983–3988 (2003).
53. Singh, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
54. Ricci-Vitiani, L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–115 (2007).
55. Medema, J. P. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat Cell Biol* **15**, 338–344 (2013).
56. Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G. & Rich, J. N. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer* **6**, 223–235 (2020).
57. Singh, S. K. et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Research* **63**, 5821–5828 (2003).
58. Abranches, E. et al. Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. *Development* **141**, 2770–2779 (2014).
59. Efroni, S., Melcer, S., Nissim-Rafinia, M. & Meshorer, E. Stem cells do play with dice: A statistical physics view of transcription. *Cell Cycle* **8**, 43–48 (2009).
60. Miranda, A. et al. Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 9020–9029 (2019).
61. Neftel, C. et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* **178**, 835–849.e21 (2019).
62. Ricci-Vitiani, L. et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**, 824–828 (2010).
63. Cheng, L. et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* **153**, 139–152 (2013).
64. Niclou, S. et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nature Communications* **10**, (2019).
65. Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L. & De Maria, R. Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **66**, 42–51 (2008).

66. Dragu, D. L., Necula, L. G., Bleotu, C., Diaconu, C. C. & Chivu-Economescu, M. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells* **7**, 1185–1201 (2015).
67. Fulda, S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Letters* **338**, 168–173 (2013).
68. Steinbichler, T. B. *et al.* Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biology* **53**, 156–167 (2018).
69. Eckerdt, F. & Plataniias, L. C. Emerging Role of Glioma Stem Cells in Mechanisms of Therapy Resistance. *Cancers* **15**, 3458 (2023).
70. Ropolo, M. *et al.* Comparative Analysis of DNA Repair in Stem and Nonstem Glioma Cell Cultures. *Molecular Cancer Research* **7**, 383–392 (2009).
71. Wang, J. *et al.* Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. *Stem Cells* **28**, 17–28 (2010).
72. Venere, M. *et al.* Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ* **21**, 258–269 (2014).
73. Kim, S.-H. *et al.* EZH2 protects glioma stem cells from radiation-induced cell death in a MELK/FOXN1-dependent manner. *Stem Cell Reports* **4**, 226–238 (2015).
74. Alvarado, A. G. *et al.* Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell Stem Cell* **20**, 450–461.e4 (2017).
75. Domenis, R. *et al.* Systemic T Cells Immunosuppression of Glioma Stem Cell-Derived Exosomes Is Mediated by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *PLoS One* **12**, e0169932 (2017).
76. Zhou, W. *et al.* Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol* **17**, 170–182 (2015).
77. Otvos, B. *et al.* Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells* **34**, 2026–2039 (2016).
78. Pollard, S. M. *et al.* Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell* **4**, 568–580 (2009).
79. Videla Richardson, G. A. *et al.* Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence: Lineage Choice of Glioma Stem Cells. *Brain Pathology* **26**, 43–61 (2016).
80. Geltrex Matrix Products - AR. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cell-culture/organoids-spheroids-3d-cell-culture/extracellular-matrices-ecm/geltrex-matrix-products.html>.
81. Munthe, S. *et al.* Migrating glioma cells express stem cell markers and give rise to new tumors upon xenografting. *J Neurooncol* **130**, 53–62 (2016).
82. Hou, L. C., Veeravagu, A., Hsu, A. R. & Tse, V. C. K. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurgical focus* **20**, E3 (2006).
83. Cunha, M. L. V. da & Maldaun, M. V. C. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **65**, 424–433 (2019).
84. Pasquier, B., Pasquier, D., N'Golet, A., Panh, M. H. & Couderc, P. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature. *Cancer* **45**, 112–125 (1980).
85. Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S. & Sontheimer, H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Reviews Neuroscience* **15**, 455–465 (2014).

86. Bernstein, J. J. & Woodard, C. A. Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery* **36**, 124–132; discussion 132 (1995).
87. Gritsenko, P. G., Ilina, O. & Friedl, P. Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol* **226**, 185–199 (2012).
88. De Groot, J. F. *et al.* Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: Radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-oncology* **12**, 233–242 (2010).
89. Kramer, N. *et al.* *In vitro* cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **752**, 10–24 (2013).
90. Paw, I., Carpenter, R. C., Watabe, K., Debinski, W. & Lo, H.-W. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Letters* **362**, 1–7 (2015).
91. SenGupta, S., Parent, C. A. & Bear, J. E. The principles of directed cell migration. *Nature reviews. Molecular cell biology* **22**, 529–547 (2021).
92. Lämmermann, T. & Sixt, M. Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 636–644 (2009).
93. Charras, G. & Paluch, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 730–736 (2008).
94. Bear, J. E. & Haugh, J. M. Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet. *Curr Opin Cell Biol* **30**, 74–82 (2014).
95. Ladoux, B. & Mège, R.-M. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 743–757 (2017).
96. Haeger, A., Krause, M., Wolf, K. & Friedl, P. Cell jamming: Collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**, 2386–2395 (2014).
97. Liu, Y.-J. *et al.* Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell* **160**, 659–672 (2015).
98. Ruprecht, V. *et al.* Cortical Contractility Triggers a Stochastic Switch to Fast Amoeboid Cell Motility. *Cell* **160**, 673–685 (2015).
99. Modes of cell migration | CytoSMART. <https://cytosmart.com/resources/resources/modes-cell-migration>.
100. Zhong, J., Paul, A., Kellie, S. J. & O'Neill, G. M. Mesenchymal Migration as a Therapeutic Target in Glioblastoma. *Journal of Oncology* **2010**, e430142 (2010).
101. Cui, Y., Cole, S., Pepper, J., Otero, J. J. & Winter, J. O. Hyaluronic acid induces ROCK-dependent amoeboid migration in glioblastoma cells. *Biomater. Sci.* **8**, 4821–4831 (2020).
102. Volovetz, J. *et al.* Identifying conserved molecular targets required for cell migration of glioblastoma cancer stem cells. *Cell Death Dis* **11**, 1–12 (2020).
103. Accogli, A., Addour-Boudrahem, N. & Srour, M. Chapter 4 - Neurogenesis, neuronal migration, and axon guidance. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Gallagher, A., Bulteau, C., Cohen, D. & Michaud, J. L.) vol. 173 25–42 (Elsevier, 2020).
104. Zarco, N., Norton, E., Quiñones-Hinojosa, A. & Guerrero-Cázares, H. Overlapping migratory mechanisms between neural progenitor cells and brain tumor stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3553–3570 (2019).
105. Inoue, A. *et al.* Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol* **37**, 1121–1131 (2010).
106. Liu, C.-A. *et al.* Migration/Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1115 (2018).
107. Giese, A. & Westphal, M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* **39**, 235–250; discussion 250–252 (1996).

108. Alieva, M. *et al.* Intravital imaging of glioma border morphology reveals distinctive cellular dynamics and contribution to tumor cell invasion. *Sci Rep* **9**, 2054 (2019).
109. Oliveira, R. *et al.* Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* **6**, 7 (2005).
110. Osswald, M. *et al.* Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **528**, 93–98 (2015).
111. Seker-Polat, F., Pinarbasi Degirmenci, N., Solaroglu, I. & Bagci-Onder, T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers* **14**, 443 (2022).
112. Seano, G. & Jain, R. K. Vessel co-option in glioblastoma: emerging insights and opportunities. *Angiogenesis* **23**, 9–16 (2020).
113. Caspani, E. M., Crossley, P. H., Redondo-Garcia, C. & Martinez, S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PLoS One* **9**, e101402 (2014).
114. Watkins, S. *et al.* Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun* **5**, 4196 (2014).
115. Buyanova, I. S. & Arsalidou, M. Cerebral White Matter Myelination and Relations to Age, Gender, and Cognition: A Selective Review. *Frontiers in Human Neuroscience* **15**, (2021).
116. Wang, J. *et al.* Invasion of white matter tracts by glioma stem cells is regulated by a NOTCH1–SOX2 positive-feedback loop. *Nat Neurosci* **22**, 91–105 (2019).
117. Budday, S., Ovaert, T. C., Holzapfel, G. A., Steinmann, P. & Kuhl, E. Fifty Shades of Brain: A Review on the Mechanical Testing and Modeling of Brain Tissue. *Arch Computat Methods Eng* **27**, 1187–1230 (2020).
118. Zimmermann, D. R. & Dours-Zimmermann, M. T. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* **130**, 635–653 (2008).
119. Aguilera-Márquez, J. d. R. *et al.* Biomaterials: Emerging systems for study and treatment of glioblastoma. *Neurology Perspectives* **2**, S31–S42 (2022).
120. Tavianatou, A. G. *et al.* Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *The FEBS Journal* **286**, 2883–2908 (2019).
121. Miyata, S. & Kitagawa, H. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1861**, 2420–2434 (2017).
122. Messam, B. J., Tolg, C., McCarthy, J. B., Nelson, A. C. & Turley, E. A. RHAMM Is a Multifunctional Protein That Regulates Cancer Progression. *Int J Mol Sci* **22**, 10313 (2021).
123. Park, J. B., Kwak, H.-J. & Lee, S.-H. Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adhesion & Migration* **2**, 202 (2008).
124. Chen, J.-W. E. *et al.* Influence of Hyaluronic Acid Transitions in Tumor Microenvironment on Glioblastoma Malignancy and Invasive Behavior. *Front Mater* **5**, 39 (2018).
125. Hayen, W., Goebeler, M., Kumar, S., Riessen, R. & Nehls, V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci* **112 (Pt 13)**, 2241–2251 (1999).
126. Kim, M.-S. *et al.* Hyaluronic acid induces osteopontin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to enhance the motility of human glioma cells. *Cancer Res* **65**, 686–691 (2005).
127. Marino, S. *et al.* The Extracellular Matrix in Glioblastomas: A Glance at Its Structural Modifications in Shaping the Tumoral Microenvironment—A Systematic Review. *Cancers* **15**, (2023).
128. Krishnaswamy, V. R., Benbenishty, A., Blinder, P. & Sagi, I. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3229–3248 (2019).

129. Logun, M. T. *et al.* Surfen-mediated blockade of extratumoral chondroitin sulfate glycosaminoglycans inhibits glioblastoma invasion. *The FASEB Journal* **33**, 11973 (2019).
130. Onken, J. *et al.* Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas. *J Neurooncol* **120**, 73–83 (2014).
131. Logun, M. T. *et al.* Glioma Cell Invasion is Significantly Enhanced in Composite Hydrogel Matrices Composed of Chondroitin 4- and 4,6-Sulfated Glycosaminoglycans. *J Mater Chem B Mater Biol Med* **4**, 6052–6064 (2016).
132. Silver, D. J. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. *J Neurosci* **33**, 15603–15617 (2013).
133. Y, K. *et al.* Role of extracellular matrix and microenvironment in regulation of tumor growth and LAR-mediated invasion in glioblastoma. *PloS one* **13**, (2018).
134. A, W. *et al.* Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *Journal of neuro-oncology* **77**, (2006).
135. Chiquet-Ehrismann, R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 986–990 (2004).
136. Xia, S. *et al.* Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro Oncol* **18**, 507–517 (2016).
137. Lee, J. *et al.* Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Research* **1288**, 125–134 (2009).
138. Hirata, E. *et al.* Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci* **100**, 1451–1459 (2009).
139. Anlar, B. & Gunel-Ozcan, A. Tenascin-R: role in the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1385–1389 (2012).
140. Brösicke, N. & Faissner, A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhesion & Migration* **9**, 131–140 (2015).
141. Dityatev, A., Seidenbecher, C. I. & Schachner, M. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends in Neurosciences* **33**, 503–512 (2010).
142. Sim, H., Hu, B. & Viapiano, M. S. Reduced Expression of the Hyaluronan and Proteoglycan Link Proteins in Malignant Gliomas *. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 26547–26556 (2009).
143. Giese, A. *et al.* Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* **38**, 755–764 (1996).
144. Morell, P. & Quarles, R. H. Characteristic Composition of Myelin. in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition* (Lippincott-Raven, 1999).
145. Benarroch, E. E. Extracellular matrix in the CNS: Dynamic structure and clinical correlations. *Neurology* **85**, 1417–1427 (2015).
146. Kazanskaya, G. M. *et al.* Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma. *Histochem Cell Biol* **149**, 235–244 (2018).
147. Noell, S. *et al.* Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma. *Cell Tissue Res* **347**, 429–441 (2012).
148. Solé, S., Petegnief, V., Gorina, R., Chamorro, A. & Planas, A. M. Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 338–349 (2004).
149. Rascher, G. *et al.* Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol* **104**, 85–91 (2002).
150. Ljubimova, J. Y. *et al.* Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res* **61**, 5601–5610 (2001).

151. Khazenzon, N. M. *et al.* Antisense inhibition of laminin-8 expression reduces invasion of human gliomas in vitro. *Mol Cancer Ther* **2**, 985–994 (2003).
152. Sun, T. *et al.* Blockade of a Laminin-411-Notch Axis with CRISPR/Cas9 or a Nanobioconjugate Inhibits Glioblastoma Growth through Tumor-Microenvironment Cross-talk. *Cancer Res* **79**, 1239–1251 (2019).
153. Wang, Y. *et al.* COL1A2 inhibition suppresses glioblastoma cell proliferation and invasion. *J Neurosurg* **138**, 639–648 (2023).
154. Chintala, S. K., Sawaya, R., Gokaslan, Z. L. & Rao, J. S. The effect of type III collagen on migration and invasion of human glioblastoma cell lines in vitro. *Cancer Lett* **102**, 57–63 (1996).
155. Senner, V., Ratzinger, S., Mertsch, S., Grässel, S. & Paulus, W. Collagen XVI expression is upregulated in glioblastomas and promotes tumor cell adhesion. *FEBS Lett* **582**, 3293–3300 (2008).
156. Zhang, B. *et al.* Nidogen-1 expression is associated with overall survival and temozolomide sensitivity in low-grade glioma patients. *Aging (Albany NY)* **13**, 9085–9107 (2021).
157. Xu, X., Ban, Y., Zhao, Z., Pan, Q. & Zou, J. MicroRNA-1298-3p inhibits proliferation and invasion of glioma cells by downregulating Nidogen-1. *Aging (Albany NY)* **12**, 7761–7773 (2020).
158. Li, H. *et al.* Activated Notch1 maintains the phenotype of radial glial cells and promotes their adhesion to laminin by upregulating nidogen. *Glia* **56**, 646–658 (2008).
159. Andrews, R. N. *et al.* Fibronectin Produced by Cerebral Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Perivascular Extracellular Matrix in Late-Delayed Radiation-Induced Brain Injury. *Radiation Research* **190**, 361–373 (2018).
160. Kabir, F. & Apu, M. N. H. Multi-omics analysis predicts fibronectin 1 as a prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. *Genomics* **114**, 110378 (2022).
161. Serres, E. *et al.* Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* **33**, 3451–3462 (2014).
162. Yu, S. *et al.* GBP2 enhances glioblastoma invasion through Stat3/fibronectin pathway. *Oncogene* **39**, 5042–5055 (2020).
163. Mikheev, A. M. *et al.* Periostin is a novel therapeutic target that predicts and regulates glioma malignancy. *Neuro-Oncology* **17**, 372–382 (2015).
164. Huizer, K. *et al.* Periostin Is Expressed by Pericytes and Is Crucial for Angiogenesis in Glioma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **79**, 863–872 (2020).
165. Guelfi, S., Duffau, H., Bauchet, L., Rothhut, B. & Hugnot, J.-P. Vascular Transdifferentiation in the CNS: A Focus on Neural and Glioblastoma Stem-Like Cells. *Stem Cells International* **2016**, 2759403 (2016).
166. Quesnel, A., Karagiannis, G. S. & Filippou, P. S. Extracellular proteolysis in glioblastoma progression and therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1874**, 188428 (2020).
167. Rempe, R. G., Hartz, A. M. S. & Bauer, B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 1481–1507 (2016).
168. Sun, J., Zhao, B., Du, K. & Liu, P. TRAF6 correlated to invasion and poor prognosis of glioblastoma via elevating MMP9 expression. *NeuroReport* **30**, 127 (2019).
169. Wang, M., Wang, T., Liu, S., Yoshida, D. & Teramoto, A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol* **20**, 65–72 (2003).
170. Zhao, Y. *et al.* Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: A potential role in glioblastoma invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **369**, 1215–1220 (2008).

171. Chang, L. *et al.* Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma Corrigendum in /mmr/12/5/7815. *Molecular Medicine Reports* **12**, 6702–6710 (2015).
172. Kargiotis, O. *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene* **27**, 4830–4840 (2008).
173. Lakka, S. S. *et al.* Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* **23**, 4681–4689 (2004).
174. Shiomi, T. & Okada, Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 145–152 (2003).
175. Eto, K. *et al.* RGD-independent Binding of Integrin $\alpha 9 \beta 1$ to the ADAM-12 and -15 Disintegrin Domains Mediates Cell-Cell Interaction*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 34922–34930 (2000).
176. Chantry, A., Gregson, N. A. & Glynn, P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **264**, 21603–21607 (1989).
177. Wang, Z., Li, W., Chen, S. & Tang, X. X. Role of ADAM and ADAMTS proteases in pathological tissue remodeling. *Cell Death Discov.* **9**, 1–6 (2023).
178. Siney, E. J. *et al.* Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 Mediate Migration and Differentiation in Glioblastoma Sphere-Forming Cells. *Mol Neurobiol* **54**, 3893–3905 (2017).
179. Held-Feindt, J. *et al.* Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int J Cancer* **118**, 55–61 (2006).
180. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* **29**, 258–289 (2008).
181. Ichikawa, T., Otani, Y., Kurozumi, K. & Date, I. Phenotypic Transition as a Survival Strategy of Glioma. *Neurologia medico-chirurgica* **56**, 387–395 (2016).
182. Mahabir, R. *et al.* Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-Oncology* **16**, 671–685 (2014).
183. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–1428 (2009).
184. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
185. Elias, M. C. *et al.* TWIST is Expressed in Human Gliomas, Promotes Invasion. *Neoplasia* **7**, 824–837 (2005).
186. Holand, K., Salm, F. & Arcaro, A. The Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway as a Therapeutic Target in Grade IV Brain Tumors. *Current Cancer Drug Targets* **11**, 894–918 (2011).
187. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* **10**, 415–433 (2000).
188. Halliday, J. *et al.* In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5248–5253 (2014).
189. Hatzikirou, H., Basanta, D., Simon, M., Schaller, K. & Deutsch, A. ‘Go or Grow’: the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA* **29**, 49–65 (2012).
190. Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. & Westphal, M. Cost of migration: Invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 1624–1636 (2003).

191. Godlewski, J. *et al.* MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Mol Cell* **37**, 620–632 (2010).
192. Bikfalvi, A., Moenner, M., Javerzat, S., North, S. & Hagedorn, M. Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem Soc Trans* **39**, 1560–1564 (2011).
193. Narayana, A. *et al.* Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival: Clinical article. *Journal of Neurosurgery* **110**, 173–180 (2009).
194. Norden, A. D. *et al.* Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* **70**, 779–787 (2008).
195. Mahase, S. *et al.* Hypoxia-Mediated Mechanisms Associated with Antiangiogenic Treatment Resistance in Glioblastomas. *The American Journal of Pathology* **187**, 940–953 (2017).
196. Collingridge, D. R., Piepmeier, J. M., Rockwell, S. & Knisely, J. P. Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother Oncol* **53**, 127–131 (1999).
197. Domènech, M., Hernández, A., Plaja, A., Martínez-Balibrea, E. & Balaña, C. Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 12608 (2021).
198. Bullitt, E. *et al.* Vessel tortuosity and brain tumor malignancy: a blinded study. *Acad Radiol* **12**, 1232–1240 (2005).
199. Semenza, G. L. & Wang, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447–5454 (1992).
200. Tirpe, A. A., Gulei, D., Ciortea, S. M., Crivii, C. & Berindan-Neagoe, I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 6140 (2019).
201. Yazdani, B. & Sirous, H. Expression analysis of HIF-3 α as a potent prognostic biomarker in various types of human cancers: a case of meta-analysis. *Res Pharm Sci* **17**, 508–526 (2022).
202. Monteiro, A. R., Hill, R., Pilkington, G. J. & Madureira, P. A. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells* **6**, 45 (2017).
203. Murugesan, T., Rajajeyabalachandran, G., Kumar, S., Nagaraju, S. & Jegatheesan, S. K. Targeting HIF-2 α as therapy for advanced cancers. *Drug Discovery Today* **23**, 1444–1451 (2018).
204. Li, Z. *et al.* Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* **15**, 501–513 (2009).
205. Kaur, B. *et al.* Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-Oncology* **7**, 134–153 (2005).
206. Yang, S.-L., Wu, C., Xiong, Z.-F. & Fang, X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Molecular Medicine Reports* **12**, 2411–2416 (2015).
207. Qiang, L. *et al.* HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ* **19**, 284–294 (2012).
208. McCord, A. M. *et al.* Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res* **7**, 489–497 (2009).
209. Kang, S.-H. *et al.* Activated STAT3 Regulates Hypoxia-Induced Angiogenesis and Cell Migration in Human Glioblastoma. *Neurosurgery* **67**, 1386 (2010).
210. Torrisi, F. *et al.* The Role of Hypoxia and SRC Tyrosine Kinase in Glioblastoma Invasiveness and Radioresistance. *Cancers* **12**, 2860 (2020).
211. Fujiwara, S. *et al.* Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *International Journal of Oncology* **30**, 793–802 (2007).

212. Proescholdt, M. A. *et al.* Function of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* **14**, 1357–1366 (2012).
213. Song, Y. *et al.* Hypoxia-induced PLOD2 promotes proliferation, migration and invasion via PI3K/Akt signaling in glioma. *Oncotarget* **8**, 41947–41962 (2017).
214. Liu, Z. *et al.* EGFRvIII/integrin β 3 interaction in hypoxic and vitronectinenriching microenvironment promote GBM progression and metastasis. *Oncotarget* **7**, 4680–4694 (2015).
215. Burden-Gulley, S. M. *et al.* Novel cryo-imaging of the glioma tumor microenvironment reveals migration and dispersal pathways in vivid three-dimensional detail. *Cancer Res* **71**, 5932–5940 (2011).
216. Joseph, J. P., Harishankar, M. K., Pillai, A. A. & Devi, A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncology* **80**, 23–32 (2018).
217. Zhong, L. *et al.* (TS)2WM: Tumor Segmentation and Tract Statistics for Assessing White Matter Integrity with Applications to Glioblastoma Patients. *NeuroImage* **223**, 117368 (2020).
218. Ormond, D. R., D'Souza, S. & Thompson, J. A. Global and Targeted Pathway Impact of Gliomas on White Matter Integrity Based on Lobar Localization. *Cureus* (2017) doi:10.7759/cureus.1660.
219. Martin, J. A. & Wang, Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet* **12**, 671–682 (2011).
220. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* **37**, 907–915 (2019).
221. Pertea, M. *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* **33**, 290–295 (2015).
222. Chen, Y., Lun, A. T. L. & Smyth, G. K. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. Preprint at <https://doi.org/10.12688/f1000research.8987.2> (2016).
223. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**, R106 (2010).
224. Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**, R25 (2010).
225. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* **43**, e47 (2015).
226. Scott, D. W. The New S Language. *Technometrics* **32**, 103–104 (1990).
227. Murtagh, F. *Multidimensional Clustering Algorithms*. (Physica-Verlag HD, 1985).
228. Liu, R. *et al.* Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic Acids Res* **43**, e97 (2015).
229. Smyth, G. K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3**, (2004).
230. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 550 (2014).
231. Schubert, M. *et al.* Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat Commun* **9**, 20 (2018).
232. Garcia-Alonso, L., Holland, C. H., Ibrahim, M. M., Turei, D. & Saez-Rodriguez, J. Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Res* **29**, 1363–1375 (2019).
233. Cornwell, M. *et al.* VIPER: Visualization Pipeline for RNA-seq, a Snakemake workflow for efficient and complete RNA-seq analysis. *BMC Bioinformatics* **19**, 135 (2018).
234. Korotkevich, G. *et al.* Fast gene set enrichment analysis. 060012 Preprint at <https://doi.org/10.1101/060012> (2021).

235. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
236. Morris-Hanon, O. *et al.* The Cell Cycle Inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 Control Proliferation but Enhance DNA Damage Resistance of Glioma Stem Cells. *Neoplasia (United States)* **19**, (2017).
237. Morris-Hanon, O. *et al.* Palbociclib Effectively Halts Proliferation but Fails to Induce Senescence in Patient-Derived Glioma Stem Cells. *Molecular Neurobiology* **56**, (2019).
238. deGooijer, M., GuillénNavarro, M., vanTellingen, O., Bernards, R. & Wurdinger, T. An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways. *Trends in Molecular Medicine* **24**, (2018).
239. Turner, L., Scotton, C., Negus, R. & Balkwill, F. Hypoxia inhibits macrophage migration. *European Journal of Immunology* **29**, 2280–2287 (1999).
240. Qu, X. *et al.* Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* **83**, 668–673 (2005).
241. Grimshaw, M. J. & Balkwill, F. R. Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation – a potential mechanism. *European Journal of Immunology* **31**, 480–489 (2001).
242. Dmitriev, R. I., Zhdanov, A. V., Nolan, Y. M. & Papkovsky, D. B. Imaging of neurosphere oxygenation with phosphorescent probes. *Biomaterials* **34**, 9307–9317 (2013).
243. Grundy, T. J. *et al.* Differential response of patient-derived primary glioblastoma cells to environmental stiffness. *Sci Rep* **6**, 23353 (2016).
244. DiMilla, P. A., Barbee, K. & Lauffenburger, D. A. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J* **60**, 15–37 (1991).
245. Janiszewska, M. The microcosmos of intratumor heterogeneity: the space-time of cancer evolution. *Oncogene* **39**, 2031–2039 (2020).
246. Brown, D. V., Stylli, S. S., Kaye, A. H. & Mantamadiotis, T. Multilayered Heterogeneity of Glioblastoma Stem Cells: Biological and Clinical Significance. in *Stem Cells Heterogeneity in Cancer* (ed. Birbrair, A.) 1–21 (Springer International Publishing, Cham, 2019). doi:10.1007/978-3-030-14366-4_1.
247. Perrin, S. L. *et al.* Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: Implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochemical Society Transactions* **47**, 625–638 (2019).
248. Michaud, J. *et al.* Integrative analysis of RUNX1 downstream pathways and target genes. *BMC Genomics* **9**, 363 (2008).
249. Xia, N., Li, H., Gao, L., Yuan, Y. & Shang, H. Expression Characteristics and Biological Functional Role of FLG in Gastric Cancer. Preprint at <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3889637/v1> (2024).
250. Peppino, G. *et al.* Teneurins: Role in Cancer and Potential Role as Diagnostic Biomarkers and Targets for Therapy. *Int J Mol Sci* **22**, 2321 (2021).
251. Aust, G., Zhu, D., Van Meir, E. G. & Xu, L. Adhesion GPCRs in Tumorigenesis. in *Adhesion G Protein-coupled Receptors: Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease* (eds. Langenhan, T. & Schöneberg, T.) 369–396 (Springer International Publishing, Cham, 2016). doi:10.1007/978-3-319-41523-9_17.
252. Plasterer, C. *et al.* Neuronatin is a modifier of estrogen receptor-positive breast cancer incidence and outcome. *Breast Cancer Res Treat* **177**, 77–91 (2019).
253. Xu, D. S. *et al.* Neuronatin in a subset of glioblastoma multiforme tumor progenitor cells is associated with increased cell proliferation and shorter patient survival. *PLoS One* **7**, e37811 (2012).
254. Angelucci, C., Lama, G. & Sica, G. Multifaceted Functional Role of Semaphorins in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2144 (2019).

255. Steup, A. *et al.* Sema3C and Netrin-1 Differentially Affect Axon Growth in the Hippocampal Formation. *Molecular and Cellular Neuroscience* **15**, 141–155 (2000).
256. Malik, M. F. A., Satherley, L. K., Davies, E. L., Ye, L. & Jiang, W. G. Expression of Semaphorin 3C in Breast Cancer and its Impact on Adhesion and Invasion of Breast Cancer Cells. *Anticancer Research* **36**, 1281–1286 (2016).
257. Boudjadi, S. & Beaulieu, J.-F. ITGA1 (integrin, alpha 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* vol. 19 (2015).
258. Short, K., Wiradjaja, F. & Smyth, I. Let's stick together: the role of the Fras1 and Frem proteins in epidermal adhesion. *IUBMB Life* **59**, 427–435 (2007).
259. Pavlakis, E., Chiotaki, R. & Chalepakis, G. The role of Fras1/Frem proteins in the structure and function of basement membrane. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**, 487–495 (2011).
260. Sun, L. *et al.* Extracellular matrix protein ITGBL1 promotes ovarian cancer cell migration and adhesion through Wnt/PCP signaling and FAK/SRC pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **81**, 145–151 (2016).
261. De, A. *et al.* Glial Cell Adhesion Molecule (GlialCAM) Determines Proliferative versus Invasive Cell States in Glioblastoma. *J. Neurosci.* **43**, 8043–8057 (2023).
262. De, A. *et al.* HepaCAM Suppresses Glioblastoma Stem Cell Invasion in the Brain. 2022.08.24.504654 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.08.24.504654> (2022).
263. Varga, I. *et al.* Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma. *Pathol. Oncol. Res.* **18**, 413–420 (2012).
264. Kang, J. *et al.* Tescalcin expression contributes to invasive and metastatic activity in colorectal cancer. *Tumor Biol.* **37**, 13843–13853 (2016).
265. Bouchart, C., Trépant, A.-L., Hein, M., Van Gestel, D. & Demetter, P. Prognostic impact of glioblastoma stem cell markers OLIG2 and CCND2. *Cancer Medicine* **9**, 1069–1078 (2020).
266. Singh, S. K. *et al.* Post-translational Modifications of OLIG2 Regulate Glioma Invasion through the TGF- β Pathway. *Cell Rep* **16**, 950–966 (2016).
267. Memi, F., Killen, A. C., Barber, M., Parnavelas, J. G. & Andrews, W. D. Cadherin 8 regulates proliferation of cortical interneuron progenitors. *Brain Struct Funct* **224**, 277–292 (2019).
268. Ren, H. *et al.* Clinical significance of low expression of CADM3 in breast cancer and preliminary exploration of related mechanisms. *BMC Cancer* **24**, 367 (2024).
269. Zhang, H. *et al.* RSPO2 enhances cell invasion and migration via the WNT/ β -catenin pathway in human gastric cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **120**, 5813–5824 (2019).
270. Dong, X. *et al.* RSPO2 suppresses colorectal cancer metastasis by counteracting the Wnt5a/Fzd7-driven noncanonical Wnt pathway. *Cancer Letters* **402**, 153–165 (2017).
271. Liu, S. *et al.* R-spondin2 enhances canonical Wnt signaling to maintain the stemness of glioblastoma cells. *Cancer Cell Int* **18**, 156 (2018).
272. Shao, S. *et al.* Tetraspanin 7 promotes osteosarcoma cell invasion and metastasis by inducing EMT and activating the FAK-Src-Ras-ERK1/2 signaling pathway. *Cancer Cell Int* **22**, 183 (2022).
273. Li, X., Law, J. W. S. & Lee, A. Y. W. Semaphorin 5A and plexin-B3 regulate human glioma cell motility and morphology through Rac1 and the actin cytoskeleton. *Oncogene* **31**, 595–610 (2012).
274. Powner, D., Kopp, P. M., Monkley, S. J., Critchley, D. R. & Berditchevski, F. Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochemical Society Transactions* **39**, 563–567 (2011).
275. Xing, C. *et al.* CD9 knockdown suppresses cell proliferation, adhesion, migration and invasion, while promoting apoptosis and the efficacy of chemotherapeutic drugs and imatinib in Ph+ ALL SUP-B15 cells. *Molecular Medicine Reports* **22**, 2791–2800 (2020).

276. Chen, Q. *et al.* YY1 targets tubulin polymerisation-promoting protein to inhibit migration, invasion and angiogenesis in pancreatic cancer via p38/MAPK and PI3K/AKT pathways. *Br J Cancer* **121**, 912–921 (2019).
277. Ren, Q., Hou, Y., Li, X. & Fan, X. Silence of TPPP3 suppresses cell proliferation, invasion and migration via inactivating NF- κ B/COX2 signal pathway in breast cancer cell. *Cell Biochem Funct* **38**, 773–781 (2020).
278. Xu, X. *et al.* TPPP3 promote epithelial-mesenchymal transition via Snail1 in glioblastoma. *Sci Rep* **13**, 17960 (2023).
279. Debray, C. *et al.* Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 1393–1398 (2004).
280. Ai, Y. *et al.* Exosomal LncRNA LBX1-AS1 Derived From RBPJ Overexpressed-Macrophages Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma Progress via miR-182-5p/FOXO3. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
281. Seephan, S. *et al.* CAMSAP3 negatively regulates lung cancer cell invasion and angiogenesis through nucleolin/HIF-1 α mRNA complex stabilization. *Life Sciences* **322**, 121655 (2023).
282. Andreeva, A. V. & Kutuzov, M. A. Cadherin 13 in cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* **49**, 775–790 (2010).
283. Kim, T.-H., Yoon, J. H. & Cho, S.-G. Kisspeptin Promotes Glioblastoma Cell Invasiveness Via the Gq-PLC-PKC Pathway. *Anticancer Research* **40**, 213–220 (2020).
284. Liang, Y., Niederstrasser, H., Edwards, M., Jackson, C. E. & Cooper, J. A. Distinct Roles for CARMIL Isoforms in Cell Migration. *Mol Biol Cell* **20**, 5290–5305 (2009).
285. Guo, S. S. & Fässler, R. KANK proteins. *Current Biology* **32**, R990–R992 (2022).
286. Tadijan, A., Samaržija, I., Humphries, J. D., Humphries, M. J. & Ambriović-Ristov, A. KANK family proteins in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **131**, 105903 (2021).
287. Jiang, M. *et al.* Identification of a ferroptosis-related prognostic signature and validation of ITGA6-AS1 in enhancing cell proliferation, migration and invasion in glioma. *International Immunopharmacology* **137**, 112438 (2024).
288. Peng, J. & Zhang, D. Coexpression of EphA10 and Gli3 promotes breast cancer cell proliferation, invasion and migration. *J Invest Med* **69**, 1215–1221 (2021).
289. Chen, H. *et al.* RASAL1 influences the proliferation and invasion of gastric cancer cells by regulating the RAS/ERK signaling pathway. *Human Cell* **27**, 103–110 (2014).
290. Liu, H., Li, Z., Li, L., Peng, H. & Zhang, Z. EBP1 suppresses growth, migration, and invasion of thyroid cancer cells through upregulating RASAL expression. *Tumor Biol.* **36**, 8325–8331 (2015).
291. Chang, R.-X. *et al.* Overexpression of RASAL1 indicates poor prognosis and promotes invasion of ovarian cancer. *Open Life Sciences* **14**, 133–140 (2019).
292. Zhu, Y. *et al.* Vitamin C through upregulating SYNPO2 level suppresses the proliferation and migration of glioma cells. *J BUON* **26**, (2021).
293. Kato, M., Khan, S., d’Aniello, E., McDonald, K. J. & Hart, D. N. J. The novel endocytic and phagocytic C-Type lectin receptor DCL-1/CD302 on macrophages is colocalized with F-actin, suggesting a role in cell adhesion and migration. *J Immunol* **179**, 6052–6063 (2007).
294. Wang, S. *et al.* BOC targets SMO to regulate the Hedgehog pathway and promote proliferation, migration, and invasion of glioma cells. *Brain Research Bulletin* **216**, 111037 (2024).
295. He, Y. *et al.* Doublecortin-like kinase 2 promotes breast cancer cell invasion and metastasis. *Clin Transl Oncol* **25**, 1102–1113 (2023).
296. Goto, K. *et al.* Oligophrenin-1 Is Associated with Cell Adhesion and Migration in Prostate Cancer. *Pathobiology* **81**, 190–198 (2014).
297. Pillet, L.-E. *et al.* The intellectual disability protein Oligophrenin-1 controls astrocyte morphology and migration. *Glia* **68**, 1729–1742 (2020).

298. Aono, S. *et al.* Expression and identification of a new splice variant of neuroglycan C, a transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in the human brain. *J Neurosci Res* **83**, 110–118 (2006).
299. Liu, T. *et al.* WFDC3 inhibits tumor metastasis by promoting the ER β -mediated transcriptional repression of TGFBR1 in colorectal cancer. *Cell Death Dis* **14**, 1–14 (2023).
300. Villalobos-Hernandez, A. *et al.* SOCS1 inhibits migration and invasion of prostate cancer cells, attenuates tumor growth and modulates the tumor stroma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **20**, 36–47 (2017).
301. Stevenson, N. J. *et al.* Suppressor of cytokine signalling (SOCS) 1 and 3 enhance cell adhesion and inhibit migration towards the chemokine eotaxin/CCL11. *FEBS Letters* **584**, 4469–4474 (2010).
302. Teng, Y., Ross, J. L. & Cowell, J. K. The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *JAKSTAT* **3**, e28086 (2014).
303. Wick, W., Platten, M. & Weller, M. Glioma Cell Invasion: Regulation of Metalloproteinase Activity by TGF- β . *J Neurooncol* **53**, 177–185 (2001).
304. Bi, H.-X., Shi, H.-B., Zhang, T. & Cui, G. PRDM14 Promotes the Migration of Human Non-small Cell Lung Cancer Through Extracellular Matrix Degradation in vitro. *Chinese Medical Journal* **128**, 373 (2015).
305. Issac, J., Raveendran, P. S. & Das, A. V. RFX1: a promising therapeutic arsenal against cancer. *Cancer Cell Int* **21**, 253 (2021).
306. Xu, Y., Wang, L., Buttice, G., Sengupta, P. K. & Smith, B. D. Interferon γ Repression of Collagen (COL1A2) Transcription Is Mediated by the RFX5 Complex *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 49134–49144 (2003).
307. Zhao, L. *et al.* STAT1 determines aggressiveness of glioblastoma both in vivo and in vitro through wnt/ β -catenin signalling pathway. *Cell Biochem Funct* **38**, 630–641 (2020).
308. Müller, H. & Helin, K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1470**, M1–M12 (2000).
309. Xue, L., Yue, S. & Zhang, J. FOXP1 has a low expression in human gliomas and its overexpression inhibits proliferation, invasion and migration of human glioma U251 cells. *Molecular Medicine Reports* **10**, 467–472 (2014).
310. Gene Ontology Consortium *et al.* The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics* **224**, iyad031 (2023).
311. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 25–29 (2000).
312. Gene Ontology overview. *Gene Ontology Resource* <http://geneontology.org/docs/ontology-documentation/> (2024).
313. Liberzon, A. *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* **1**, 417–425 (2015).
314. Schaeffer, D., Somarelli, J. A., Hanna, G., Palmer, G. M. & Garcia-Blanco, M. A. Cellular Migration and Invasion Uncoupled: Increased Migration Is Not an Inexorable Consequence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Molecular and Cellular Biology* **34**, 3486–3499 (2014).
315. Kruger, R. P., Aurandt, J. & Guan, K.-L. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 789–800 (2005).
316. Hsieh, W.-T. *et al.* Exogenous endothelin-1 induces cell migration and matrix metalloproteinase expression in U251 human glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **118**, 257–269 (2014).
317. Ginouvès, A., Ilc, K., Macías, N., Pouyssegur, J. & Berra, E. PHDs overactivation during chronic hypoxia ‘desensitizes’ HIF α and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4745–4750 (2008).

318. Camby, I. *et al.* Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **61**, 585–596 (2002).
319. Toussaint, L. G. *et al.* Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. *Molecular Cancer* **11**, (2012).
320. Sullivan, R. & Graham, C. H. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 319–331 (2007).
321. Fedele, A. O., Whitelaw, M. L. & Peet, D. J. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol Interv* **2**, 229–243 (2002).
322. Pouyssegur, J. & Mechta-Grigoriou, F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. **387**, 1337–1346 (2006).
323. Raheja, L. F., Genetos, D. C., Wong, A. & Yellowley, C. E. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1 α . *Cell Biology International* **35**, 981–989 (2011).
324. Yasuda, Y. *et al.* Cloning and chromosomal mapping of the human gene of neuroglycan C (NGC), a neural transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan with an EGF module. *Neurosci Res* **32**, 313–322 (1998).
325. Pintér, A., Hevesi, Z., Zahola, P., Alpár, A. & Hanics, J. Chondroitin sulfate proteoglycan-5 forms perisynaptic matrix assemblies in the adult rat cortex. *Cell Signal* **74**, 109710 (2020).
326. Kinugasa, Y. *et al.* Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 1045–1049 (2004).
327. Ichihara-Tanaka, K., Oohira, A., Rumsby, M. & Muramatsu, T. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J Biol Chem* **281**, 30857–30864 (2006).
328. Dalton, C. J. & Lemmon, C. A. Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cells* **10**, 2443 (2021).
329. Camby, I. *et al.* Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathology* **11**, 12–26 (2001).
330. Rorive, S. *et al.* Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *GLIA* **33**, 241–255 (2001).
331. HM, S., M, K., W, O. & J, B. Glycobiology in malignant gliomas: expression and functions of galectins and possible therapeutic options. *Current pharmaceutical biotechnology* **13**, 2299–2307 (2012).
332. Gordower, L. *et al.* Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumours and related angiogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **25**, 319–330 (1999).
333. Park, D., Ryu, K.-S., Choi, D., Kwak, J. & Park, C. Characterization and role of fucose mutarotase in mammalian cells. *Glycobiology* **17**, 955–962 (2007).
334. Bertuzzi, S., Quintana, J. I., Ardá, A., Gimeno, A. & Jiménez-Barbero, J. Targeting Galectins With Glycomimetics. *Front. Chem.* **8**, (2020).
335. Nusblat, L. M., Carroll, M. J. & Roth, C. M. Crosstalk between M2 macrophages and glioma stem cells. *Cell Oncol.* **40**, 471–482 (2017).
336. Zhang, Y., Sime, W., Juhas, M. & Sjölander, A. Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *European Journal of Cancer* **49**, 3320–3334 (2013).
337. Vallega, K. A., Bosco, D. B., Ren, Y. & Sang, Q.-X. A. Macrophage-Conditioned Media Promotes Adipocyte Cancer Association, Which in Turn Stimulates Breast Cancer Proliferation and Migration. *Biomolecules* **12**, 1757 (2022).

- 338. Chen, R. Q. *et al.* The Binding of PD-L1 and Akt Facilitates Glioma Cell Invasion Upon Starvation via Akt/Autophagy/F-Actin Signaling. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
- 339. Bar, E. E. Glioblastoma, Cancer Stem Cells and Hypoxia. *Brain Pathology* **21**, 119–129 (2011).
- 340. Chédeville, A. L., Lourdusamy, A., Monteiro, A. R., Hill, R. & Madureira, P. A. Investigating Glioblastoma Response to Hypoxia. *Biomedicines* **8**, 310 (2020).
- 341. Janiszewska, M., Primi, M. C. & Izard, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of biological chemistry* **295**, 2495–2505 (2020).
- 342. Collins, C. & Nelson, W. J. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell–cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology* **36**, 62–70 (2015).
- 343. Jaśkiewicz, M. *et al.* The transition from HIF-1 to HIF-2 during prolonged hypoxia results from reactivation of PHDs and HIF1A mRNA instability. *Cellular & Molecular Biology Letters* **27**, 109 (2022).
- 344. Downes, N. *et al.* Hypoxic regulation of hypoxia inducible factor 1 alpha via antisense transcription. *J Biol Chem* **299**, 105291 (2023).
- 345. Joseph, J. V. *et al.* Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis. *Cancer Letters* **359**, 107–116 (2015).