

## Evaluación de los genes *MGMT*, *SOCS1* y *SOCS3* como posibles biomarcadores y/o blancos terapéuticos en Glioblastoma.

M. Ventero<sup>1</sup>, V. Barbera<sup>1</sup>, M. Fuentes<sup>2</sup>, J. Sanz<sup>2</sup>, L. Fernandez<sup>3</sup>, P. Dorado<sup>3</sup>, P. Garcia<sup>1</sup>, M. Saceda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Elche, FISABIO. Elche, España*

<sup>2</sup> *Instituto de Biología Molecular y Celular de Universidad Miguel Hernández de Elche. Elche, España*

<sup>3</sup> *ERESA grupo medico*

El glioblastoma es un tipo de tumor del sistema nervioso central (SNC), según la clasificación realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se engloba dentro de los tumores astrocíticos de grado IV. En este grado se encuentran aquellas lesiones que presentan una alta actividad mitótica, por lo que son propensas a la necrosis y, en general, se relacionan con una mala evolución pre-quirúrgica y post-quirúrgica y desenlaces mortales [1]. Hasta la fecha, es el tipo de tumor del SNC más frecuente en adultos y también el que presenta una mayor tasa de letalidad, ya que la mayoría de los pacientes diagnosticados mueren a lo largo del primer año [2].

El tratamiento frente al glioblastoma comienza por una intervención quirúrgica, si ésta es viable, con el fin de extirpar la mayor parte del tumor, seguida de sesiones de radioterapia y quimioterapia. El objetivo de esta terapia consiste en reducir o eliminar el tumor y alargar en la medida de lo posible la esperanza de vida del paciente. Aun así, existen ciertas situaciones que dificultan la consecución de dicho objetivo: la resistencia de las células tumorales a la radiación cuando se encuentran en hipoxia; la presencia de la barrera hemato-encefálica y la infiltración del tumor a los tejidos cerebrales circundantes, lo que impide su eliminación total mediante cirugía, entre otras. Los mejores resultados a la hora de tratar a pacientes con Glioblastoma, se han obtenido cuando se les ha administrado temodal, cuyo principio activo es la temozolamida (quimioterapia) junto con ciclos de radioterapia [3].

Actualmente, los marcadores moleculares constituyen una herramienta clave para el diagnóstico y pronóstico de los diferentes tipos de tumores, así como para facilitar la elección del tratamiento más adecuado para cada uno de ellos. En el caso del Glioblastoma, todavía no se dispone de biomarcadores que ayuden a predecir el comportamiento del tumor frente a un tratamiento determinado, aunque hasta la fecha se han identificado diferentes genes que podrían estar relacionados con la radio y quimiorresistencia presentada por algunos Glioblastomas. Entre estos genes se encuentran el gen *MGMT* (O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferasa), el gen *SOCS1* (proteína supresora de la señalización por citoquinas 1) y el gen *SOCS3* (proteína supresora de la señalización por citoquinas 3).

El gen *MGMT* codifica una enzima encargada de reparar el ADN denominada O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa. Por lo tanto, su acción atenúa el efecto de muerte celular causado por la Temozolamida [4]. Esta ha sido una de las razones por las que se

ha relacionado directamente la expresión de este gen con el pronóstico y la evolución de los tumores gliales. Los estudios realizados hasta ahora han mostrado una regulación epigenética mediante la metilación del promotor del mismo. Se ha comprobado que los tumores que tienen metilado el promotor del gen *MGMT* presentan un mejor pronóstico frente al tratamiento con quimioterapia [5][6]. Uno de nuestros objetivos es determinar el grado de expresión de *MGMT*, tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína, en cultivos primarios de Glioblastoma, y a su vez establecer una relación entre el grado de metilación del promotor de *MGMT* y su expresión.

Hasta la fecha, la mayoría de los cultivos primarios que hemos estudiado presentan una fuerte correlación entre la metilación del promotor de *MGMT* y la ausencia de expresión a nivel de mRNA de dicho gen. También, hemos observado que los cultivos primarios en su desarrollo "in vitro" tienden a perder la expresión del gen *MGMT*.

HGUE GB 37		HGUE GB 39	
Pase celular	% expresión <sub>relativa</sub> <i>MGMT</i>	Pase celular	% expresión <sub>relativa</sub> <i>MGMT</i>
1	100 %	1	100 %
4	20 %	8	0.5 %
6	----	9	---

HGUE GB 40		HGUE GB 42	
Pase celular	% expresión <sub>relativa</sub> <i>MGMT</i>	Pase celular	% expresión <sub>relativa</sub> <i>MGMT</i>
1	100 %	2	100 %
4	0.4 %	4	----
6	----		

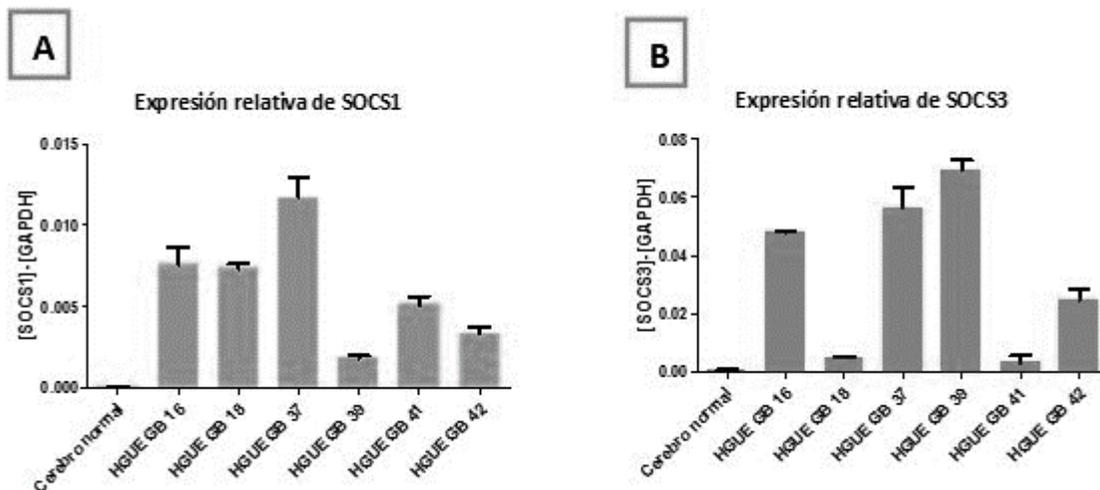
**Tabla 1:** Porcentajes de expresión relativa (Nivel de expresión del gen objeto de estudio – nivel de expresión del gen *GAPDH* utilizado como control positivo) del gen *MGMT* obtenidos a partir de PCR a tiempo a real. Se muestran los datos de los cultivos primarios HGUE GB 37, HGUE GB 39, HGUE GB 40, HGUE GB

42 en diferentes pases de su desarrollo "in vitro".

Los genes *SOCS* codifican proteínas supresoras de la señalización por citoquinas. Las citoquinas son proteínas que están implicadas, principalmente, en la respuesta inmune y las alteraciones en la regulación de su señalización están asociadas con diversas situaciones patológicas, como por ejemplo algunos tipos de cánceres. Además, los niveles de estas proteínas, en concreto de *SOCS1* y *SOCS3*, se han encontrado alterados en diversos tipos de cánceres, entre ellos, los tumores gliales [7] y la metilación de sus promotores se ha asociado con la resistencia a la radioterapia [8].

En nuestro grupo de investigación, hemos estudiado la expresión de los genes *SOCS1* y *SOCS3* a nivel de mRNA mediante PCR a tiempo real en cultivos primarios de Glioblastoma. Hemos comprobado que estos cultivos celulares presentan una sobreexpresión de dichos genes con respecto al cerebro normal. Actualmente, estamos estableciendo un perfil de expresión de *SOCS1* y *SOCS3* es los cultivos tumorales disponibles, y también se les están realizando tratamientos periódicos con radioterapia. Uno de nuestros objetivos es poder relacionar la expresión de *SOCS1* y/o *SOCS3* con la

resistencia a la radioterapia y así, evaluar el posible uso de estos genes como biomarcadores pronósticos en Glioblastoma.



**Figura 1:** Nivel de expresión relativo (Nivel de expresión del gen objeto de estudio – nivel de expresión del gen *GAPDH* utilizado como control positivo) de los cultivos primarios analizados. A: Expresión del gen *SOCS1*. B: Expresión del gen *SOCS3*.

Por otra parte, y en esta línea de investigación, se están llevando a cabo experimentos con ARN de interferencia, con el fin de suprimir la expresión de *SOCS1* y *SOCS3* seguidos de sesiones de radioterapia. Con el fin de valorar el efecto que tiene en los cultivos primarios la radiación tras la supresión de uno de estos dos genes. Hasta ahora hemos observado que algunos de los cultivos primarios en los que se suprimió la expresión de *SOCS3* mostraron una mayor radiorresistencia que los cultivos controles.

En todos estos estudios y análisis, siempre hay que tener en cuenta la gran heterogeneidad intra e inter-tumoral que existe en Glioblastoma, así como la variedad de mecanismos de resistencia que tiene un mismo tipo de tumor frente a un tratamiento específico [9]. Por ello, en nuestro equipo hemos buscado una estrategia complementaria para estudiar la implicación de estos genes en la radiorresistencia, basada en la creación de clones resistentes a la radioterapia y que proceden de estos cultivos primarios. Mediante análisis de ciclo celular por citometría de flujo, se ha comprobado que estos clones son más resistentes a la radioterapia que su cultivo primario de origen. Además todos ellos, presentan una mayor expresión del gen *SOCS1* con respecto a dicho cultivo.

### **Bibliografía**

[1] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) (2007). World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon

[2] Bochenek-Cibor J, Krupa M, Moskała M, Trojanowski T (2014) "Astrocytoma malignum in glioblastoma multiforme vertens with long term survival-case report and a literature review". *Przegl Lek* 71:454-5.

[3] Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P (2014) "Glioblastoma multiforme – an overview". *Contemp Oncol* 18: 307-12.

[4] Hegi M, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma". *N Engl J Med* 352:997-1003.

[5] Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR (2008) "Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (*MGMT*) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate *MGMT* activity". *J Clin Oncol* 26:4189-99.

[6] Bobola MS, Alnoor M, Chen JY, Kolstoe DD, Silbergeld DL, Rostomily RC, Blank A, Chamberlain MC, Silber JR (2015) "O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity is associated with response to alkylating agent therapy and with *MGMT* promoter methylation in glioblastoma and anaplastic glioma". *BBA Clin* 3:1-10.

[7] Tobelaim W, Beurivage C, Champagne A, Pomerleau V, Simoneau A, Walid C, Yeganeh M, Thibault P, Klinck R, Carrier J, Ferbeyre G, Ilangumaran S, Saucier C (2015) "Tumour-promoting role of *SOCS1* in colorectal cancer cells". *Sci Rep* 5:14301

[8] Zhou H, Miki R, Eeva M, Fike FM, Seligson D, Yang L, Yoshimura A, Teitell MA, Jamieson CA, Cacalano NA (2007) "Reciprocal regulation of *SOCS1* and *SOCS3* enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme". *Clin Cancer Res* 13:2344-53.

[9] Combs SE, Schmid TE, Vaupel P, Multhoff G (2016) "Stress Response Leading to Resistance in Glioblastoma-The Need for Innovative Radiotherapy (iRT) Concepts". *Cancers (Basel)* 13;8