

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE GENES Y PROTEÍNAS DE
AUTOFAGIA EN TUMORES DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL**

Elena Bueno Martínez

2016



EL DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "*Estudio de genes y proteínas de autofagia en tumores del sistema nervioso central*", que presenta la licenciada en Biotecnología Dña. Elena Bueno Martínez ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca a 20 de octubre de 2016.

Fdo.: Dr. Rogelio González Sarmiento



Durante el transcurso de este trabajo, Elena Bueno Martínez ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral del Programa Nacional de Formación de profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, cultura y deporte.

El presente trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI13/01741).

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido directa o indirectamente en este trabajo y sin las cuales no hubiera sido posible. Es por ello que me gustaría expresar mi agradecimiento con estas líneas.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi director, el Dr. Rogelio González Sarmiento, por la confianza depositada en mí y haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo. No tengo palabras para agradecer su dedicación, cariño, apoyo y preocupación. Mucho ha pasado desde ese año 2007 en que se convirtió en mi profesor favorito y me trasladó su pasión por la ciencia: búsqueda de becas, proyectos científicos, artículos, seminarios, tesis, diagnóstico, reuniones, correcciones... Todo ha hecho que, no sólo lo vea como un maestro en ciencia, sino como un modelo de integridad y mejor persona. Si pudiera volver a empezar este camino de nuevo, sin duda volvería a llamar a su puerta.

Quiero agradecer de manera muy especial a mis compañeros de la Unidad de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca y del Laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer. Todos han pasado de ser compañeros a ser amigos. Hemos compartido triunfos y fracasos, risas y llantos, quejas del heteroduplex y del western blot, contaminaciones en cultivos, temperaturas bajo cero en Navidad, congresos, karaokes, cañas y viajes. Sin vosotros este trabajo no habría sido posible. Gracias a Marta, por ser la mejor compañera de laboratorio posible, por todas las PCRs contaminadas que hemos intercambiado y los heteros conjuntos; a Vanessa, por capturarme los cristales de esa primera inmuno, las horas en el microscopio de fluorescencia y encenderme el mechero siempre que se lo pedía; a Marian, por esos inolvidables *"re-route the flute"*, *"balconing"* y *"beautiful hair"* y demostrarme con su entusiasmo que los 30 son de verdad los nuevos 20; a Javi, por poner siempre la nota de humor a los días más grises y hacer que ir a trabajar se convirtiera en un placer; a Ruslán, por todas las flores, el interés y la sonrisa diaria; a Ricardo, por quitarme el miedo a la escritura y hacer que pueda contar que abrí un hueso con destornillador; a Athe, por demostrar en primera persona que las pucelanas molamos, y mucho, y por las horas de conversación amenizándome las tardes y los viajes en coche; a Eva, por enseñarme lo que es el fuera de juego y revisarme la tesis, incluso siendo de autofagia; a Jessi por ser mi barrera y porque, a pesar de lo que se diga, no dejaría que se quemara si ardiera el laboratorio; a Iskander, por arreglárselas para meter mi disfraz de torera en la maleta de Glasgow y pasarse la tarde hinchando globos; a Diego y Catia porque, aunque se fueron muy pronto, se ganaron un huequito entre nosotros muy difícil de cubrir. Gracias también a esos "mayores" que leyeron hace ya mucho: Carlos, por su disponibilidad, sus múltiples servicios informáticos y por sufrir la "T" del teclado tanto como yo; Irene, por ser la mejor predecesora y enseñarme a usar el temido SPSS; Sara, por explicarme los secretos de la facultad y del diagnóstico genético; Mónica, por ser la primera en darme una oportunidad; Dani, porque sólo con ser Dani ya mola; José Luis, Laurita, Chus y muchos más. Gracias también a los nuevos porque, aunque fuera en las últimas etapas, han formado parte de esto.

Gracias a Nieves, por su sentido del humor, su ayuda y cariño diario, y a Estrella, por su competencia y su sonrisa permanente en los labios. No puedo olvidarme de mis residentes e, incluso, de muchos de mis alumnos que, aunque en ocasiones me desesperaran, también se han convertido en grandes amigos para mí. A todos vosotros, ¡muchas gracias, chicos!

Quiero reconocer la inestimable ayuda del Dr. Juan Gómez Moreta, del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca, de Mónica Lara Almunia, del Servicio de Neurocirugía del Hospital Son Espases y del Dr. Carlos Alberto Rodríguez Arias, del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Valladolid, por el envío de muestras y datos clínicos de los pacientes.

Me gustaría agradecer a los pacientes su generosa colaboración. Este trabajo no tendría sentido sin ellos.

Querría mencionar también al Dr. César Cobaleda, que me devolvió la fe en la investigación cuando más lo necesitaba, y al Dr. Javier Pino, que me abrió las puertas de su Servicio en un momento de necesidad. Sin ellos no estaría aquí hoy.

No puedo olvidarme de mis amigos, los de siempre, los Biotecs, Rurálidos y mis niñas. Gracias por las comidas de los jueves, las horas eternas discutiendo sobre ciencia o despotricando sobre ella, las llamadas nocturnas de desahogo, los WhatsApps de ánimo semanales, el trapicheo de artículos, ejemplos de proyectos o becas. Y... ¿por qué no? Gracias por todo lo que no ha sido ciencia. Por las clases, las fiestas, la carrera, los roles, los batidos, los kebabs, los viajes, las quedadas... Por estar siempre ahí para mí, sin importar donde estemos en realidad.

Muchas gracias a mi familia por su amor incondicional. Gracias a mi hermana Isabel y a mis padres, sobre todo a ellos, por dármelo todo hasta llegar aquí. Por demostrarme que con trabajo, dedicación y esfuerzo se conquistan los sueños. Por quererme y mostrarlo a diario desde hace ya 29 años, sin tomarse un único día de vacaciones. Por creer en mí más que nadie y apoyarme siempre. Por hacerme como soy.

Por último, gracias a José por ser mi compañero de viaje. Por todas las aventuras que hemos vivido. Por estar a mi lado, animarme y decirme que yo puedo con todo. Por alimentarme esas noches de escritura y aprender lo que es un glioblastoma, un astrocitoma y la ruta de Sonic Hedgehog, incluso aunque finalmente la tesis no fuera sobre ella. Gracias, porque esta tesis también tiene un poquito de ti.

ÍNDICES

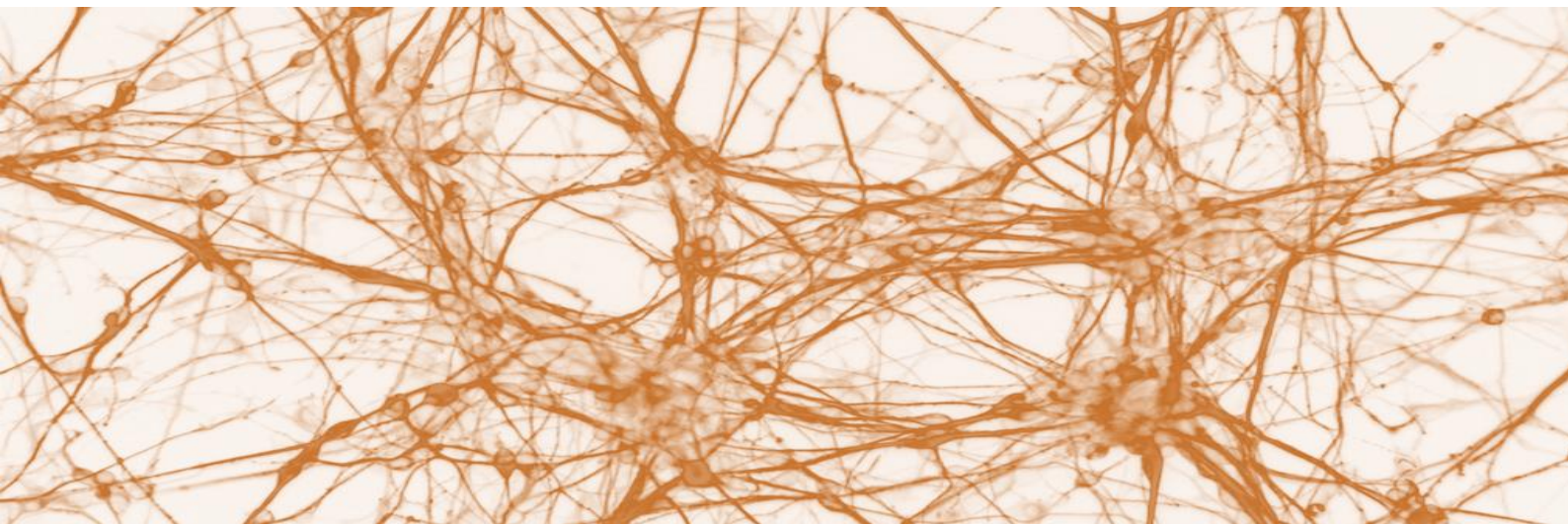


TABLA DE ABREVIATURAS.....	23
INTRODUCCIÓN	29
1. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	31
1.1 GENERALIDADES	31
1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LOS TUMORES DEL SNC	31
1.3 CLASIFICACIÓN DE TUMORES DEL SNC	33
1.4 TUMORES ASTROCÍTICOS.....	34
2. EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	36
2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	37
2.2 SUPERVIVENCIA DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	37
2.3 TRATAMIENTO DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	38
2.4 ALTERACIONES GENÉTICAS Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN EL GBM. BIOMARCADORES	40
3. LA AUTOFAGIA	43
3.1 BASES MOLECULARES DE LA AUTOFAGIA.....	44
3.1.1 Iniciación del fagoforo.	45
3.1.2 Nucleación del fagoforo	46
3.1.3 Expansión de la membrana del autofagosoma.....	47
3.1.4 Cierre del autofagosoma, formación del autofagolisosoma y degradación de su contenido... ..	48
3.2 ORIGEN DE LA MEMBRANA EN LA BIOGÉNESIS DEL AUTOFAGOSOMA.....	49
3.3 LA AUTOFAGIA SELECTIVA	50
3.4 AUTOFAGIA Y CÁNCER	52
3.4.1 La autofagia como supresor tumoral	53
3.4.2 La autofagia como promotor de la progresión tumoral	53
3.5 MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA COMO TRATAMIENTO ANTITUMORAL.....	54
3.5.1 Activadores autofágicos.....	54
3.5.2 Inhibidores autofágicos.....	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. PACIENTES	63
2. LÍNEAS CELULARES TUMORALES	63
3. FÁRMACOS	64
4. ANTICUERPOS	64
5. EXTRACCIÓN DE DNA.....	65
5.1 Extracción de DNA a partir de sangre periférica.....	65
5.2 Extracción de DNA a partir de tejido tumoral.....	66
5.3 Extracción de DNA a partir de líneas celulares	66
6. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR.....	66

7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	67
8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	67
9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA.....	68
10. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN™.....	68
11. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES.....	70
12. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	70
13. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	70
14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	71
14.1 Extracción de proteínas a partir de tejido tumoral.....	71
14.2 Extracción de proteínas a partir de líneas celulares.....	72
15. WESTERN BLOT.....	72
16. INMUNOFLUORESCENCIA.....	73
17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
RESULTADOS.....	77
1. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GBM.....	79
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GBM.....	82
2.1 Análisis de la expresión de la proteína LC3B.....	83
2.2 Análisis de la expresión de la proteína p62.....	86
2.3 Análisis de la expresión de la proteína TRAF6.....	88
2.4 Análisis de la expresión de la proteína PKCz.....	90
2.5 Análisis de la expresión de la proteína mTOR.....	93
2.6 Análisis de la expresión de la proteína Beclin1.....	95
2.7 Análisis de la expresión de la proteína PI3KCA.....	97
2.8 Análisis de la correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia.....	98
2.9 Estado de la autofagia y su valor pronóstico.....	99
2.10 Análisis de alteraciones en el promotor de hTERT en GBM: valor pronóstico y relación con la expresión de proteínas de autofagia.....	100
2.11 Análisis de de la expresión de proteínas de autofagia y la clasificación molecular tumoral.....	100
3. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS BASADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	102
3.1 Caracterización del efecto del Taxol® (paclitaxel) en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	102
3.1.1 Estudio del efecto del Taxol® (paclitaxel) en la proliferación de líneas celulares de GBM.....	102
3.1.2 Estudio del efecto del Taxol® (paclitaxel) en la morfología de líneas celulares de GBM.....	104
3.1.3 Análisis del efecto del Taxol® (paclitaxel) en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	106

3.2	Caracterización del efecto de la metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	112
3.2.1	Estudio del efecto de la metformina en la proliferación de líneas celulares de GBM.....	112
3.2.2	Estudio del efecto de la metformina en la morfología de líneas celulares de GBM.....	114
3.2.3	Análisis del efecto de la metformina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme	116
3.3	Caracterización del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	121
3.3.1	Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme	121
3.3.2	Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme	123
3.3.3	Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	125
3.4	Caracterización del efecto de la cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	127
3.4.1	Estudio del efecto de la cloroquina en la proliferación de líneas celulares de GBM.....	127
3.4.2	Estudio del efecto de la cloroquina en la en la morfología de líneas de GBM	127
3.4.3	Análisis del efecto de la cloroquina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme	131
3.5	Caracterización del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	139
3.5.1	Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	133
3.5.2	Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	135
3.5.3	Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme	137
3.6	Caracterización del efecto del Panobinostat® (LBH589) en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	139
3.6.1	Estudio del efecto del Panobinostat® (LBH589) en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	139
3.6.2	Estudio del efecto del Panobinostat® (LBH589) en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	143
3.6.3	Análisis del efecto del Panobinostat® (LBH589) en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme	143
3.7	Caracterización del efecto de la sinergia Panobinostat®(LBH589)+cloroquina en líneas celulares de GBM.....	145
3.7.1	Estudio del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	145

3.7.2	Estudio del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	147
3.7.3	Análisis del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme	149
DISCUSIÓN	153
1	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GBM.....	155
2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GBM	157
2.1	LC3B.....	157
2.2	p62.....	159
2.3	TRAF6.....	160
2.4	PKCz	161
2.5	mTOR	161
2.6	Beclin1	162
2.7	PI3KCA	163
2.8	Análisis de la correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia	164
2.9	Estado de la autofagia	165
2.10	Análisis de alteraciones en el promotor de hTERT en glioblastoma multiforme	166
2.11	Análisis de la expresión de proteínas de autofagia y la clasificación molecular tumoral	100
3	NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS BASADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	167
3.1	Análisis del efecto del paclitaxel en líneas celulares de glioblastoma multiforme.....	167
3.2	Análisis del efecto de la metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme	168
3.3	Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme	170
3.4	Análisis del efecto de la cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme	171
3.5	Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme	172
3.6	Análisis del efecto del Panobinostat® (LBH589) en líneas celulares de glioblastoma multiforme	173
3.7	Análisis del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme	173
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXOS	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del desarrollo neuroectodérmico y los principales tumores del SNC.	31
Figura 2. Histopatología del astrocitoma pilocítico.	34
Figura 3. Histopatología del astrocitoma difuso.	35
Figura 4. Histopatología del astrocitoma anaplásico.	35
Figura 5. Histopatología del glioblastoma multiforme.	36
Figura 6. Distribución de los principales tumores malignos del SNC.	37
Figura 7. Mecanismo de acción de la temozolamida.	38
Figura 8. Dianas moleculares de las nuevas estrategias terapéuticas del GBM.	40
Figura 9. Principales alteraciones genéticas y epigenéticas en el glioblastoma multiforme.	41
Figura 10. Esquema de los diferentes tipos de autofagia.	44
Figura 11. Moléculas claves en la iniciación del proceso de autofagia.	46
Figura 12. Moléculas claves en la nucleación del fagoforo.	47
Figura 13. Sistemas de conjugación responsables de la expansión de la membrana.	48
Figura 14. Modelos sobre la biogénesis de la membrana del autofagosoma.	49
Figura 15. Mecanismo general de autofagia selectiva.	51
Figura 16. Estructura de p62/SQSTM1.	52
Figura 17. Roles de la autofagia durante la tumorigénesis.	53
Figura 18. Esquema de algunos moduladores de autofagia y la etapa en la que actúan.	55
Figura 19. Programa de amplificación estándar.	67
Figura 20. Secuencia correspondiente al promotor de TERC.	68
Figura 21. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas Taqman™ del polimorfismo del gen <i>ATG16L1 rs2241880</i>	69
Figura 22. Gráfico de citometría de flujo.	71
Figura 23. Fundamento teórico del Western blot.	73
Figura 24. Imagen de la línea celular LN229 marcada con un anticuerpo secundario fluorescente frente al anticuerpo anti- α Tubulina. El núcleo está marcado con DAPI.	74
Figura 25. Curvas de supervivencia en función del genotipo del polimorfismo <i>ATG10 rs1864183</i> en GBM.	82
Figura 26. Western blot de la expresión de LC3B en algunos de los tumores de GBM estudiados.	83
Figura 27. Representación gráfica de la expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en GBM.	84
Figura 28. Curvas de supervivencia en función de la expresión de LC3B-I y LC3B-II en los pacientes con GBM.	85
Figura 29. Representación gráfica de la expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en ABG.	85
Figura 30. Western blot de la expresión de p62 en algunos de los tumores de GBM estudiados.	86
Figura 31. Representación gráfica de la expresión de la proteínas p62 en muestras tumorales de GBM.	87
Figura 32. Curvas de supervivencia en función de la expresión de p62 en los pacientes con GBM.	87
Figura 33. Representación gráfica de la expresión de la proteína p62 en muestras tumorales de ABG.	88
Figura 34. Western blot de la expresión de TRAF6 en algunos de los tumores de GBM estudiados.	89
Figura 35. Representación gráfica de la expresión de la proteínas TRAF6 en muestras tumorales de GBM.	89

Figura 36. Representación gráfica de la expresión de la proteína TRAF6 en muestras tumorales de ABG	90
Figura 37. WB de la expresión de PKC ζ en algunos de los tumores de GBM estudiados.	90
Figura 38. Representación gráfica de la expresión de la proteínas PKC ζ en muestras tumorales de GBM.	91
Figura 39. Curvas de supervivencia en función de la expresión de PKC ζ en los pacientes con GBM	92
Figura 40. Representación gráfica de la expresión de la proteína PKC ζ en muestras tumorales de ABG	92
Figura 41. Western blot de la expresión de mTOR en algunos de los tumores de GBM estudiados.	93
Figura 42. Representación gráfica de la expresión de la proteínas mTOR en muestras tumorales de GBM.	93
Figura 43. Representación gráfica de la expresión de la proteína mTOR en muestras tumorales de ABG	94
Figura 44. Western blot de la expresión de Beclin1 en algunos de los tumores de GBM estudiados.	95
Figura 45. Representación gráfica de la expresión de la proteínas Beclin1 en muestras tumorales de GBM.	95
Figura 46. Representación gráfica de la expresión de la proteína Beclin1 en muestras tumorales de ABG.	96
Figura 47. Western blot de la expresión de PI3KCA en algunos de los tumores de GBM estudiados.	97
Figura 48. Representación gráfica de la expresión de la proteína PI3KCA en muestras tumorales de GBM.	97
Figura 49. Representación gráfica de la expresión de la proteína PI3KCA en muestras tumorales de ABG.	98
Figura 50. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 5, 10, 20, 35, 50 y 75nM de paclitaxel.	103
Figura 51. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 5nM de paclitaxel.	103
Figura 52. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM.	105
Figura 53. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM.	106
Figura 54. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM.	107
Figura 55. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM.	108
Figura 56. Expresión de mTOR en las líneas celulares A172 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM.	108
Figura 57. Inmunofluorescencia de p62 en líneas celulares de glioblastoma tras 72h con paclitaxel 5nM.	109
Figura 58. Inmunofluorescencia de LC3B en líneas celulares de GBM tras 72h con paclitaxel 5nM.	110
Figura 59. Inmunofluorescencia de mTOR en líneas celulares de GBM tras 72h con paclitaxel 5nM.	111
Figura 60. Inmunofluorescencia de α -tubulina en líneas celulares de GBM tras 72h en tratamiento con paclitaxel 5nM.	112
Figura 61. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 0.5, 1, 2.5, 5, 6.5 y 8mM de metformina.	113
Figura 62. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de GBM T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.	113
Figura 63. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de la línea celular de glioblastoma multiforme LN18 a las tres semanas de tratamiento con metformina 8mM.	114

Figura 64. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.	115
Figura 65. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.....	116
Figura 66. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.....	117
Figura 67. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.....	118
Figura 68. Expresión de la proteína mTOR en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.....	119
Figura 69. Expresión de la proteína p62 en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM.	119
Figura 70. Expresión de la proteína LC3B en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM.	120
Figura 71. Expresión de la proteína Beclin1 en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM....	120
Figura 72. Expresión de la proteína mTOR en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM.....	121
Figura 73. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 0.5, 1, 2, 3 y 6µM de Decitabina® y metformina 8mM.	122
Figura 74. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6µM de Decitabina® y metformina 8mM.	122
Figura 75. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6µM de Decitabina® y metformina 8mM.	124
Figura 76. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y metformina 8mM.	125
Figura 77. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y metformina 8mM.	126
Figura 78. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y metformina 8mM.	127
Figura 79. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 10, 25, 50, 75, 100 y 125µM de cloroquina.	128
Figura 80. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 25µM cloroquina.	128
Figura 81. Cambios morfológicos de las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25µM.....	130
Figura 82. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25µM.....	131
Figura 83. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25µM.....	132
Figura 84. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25µM.....	133

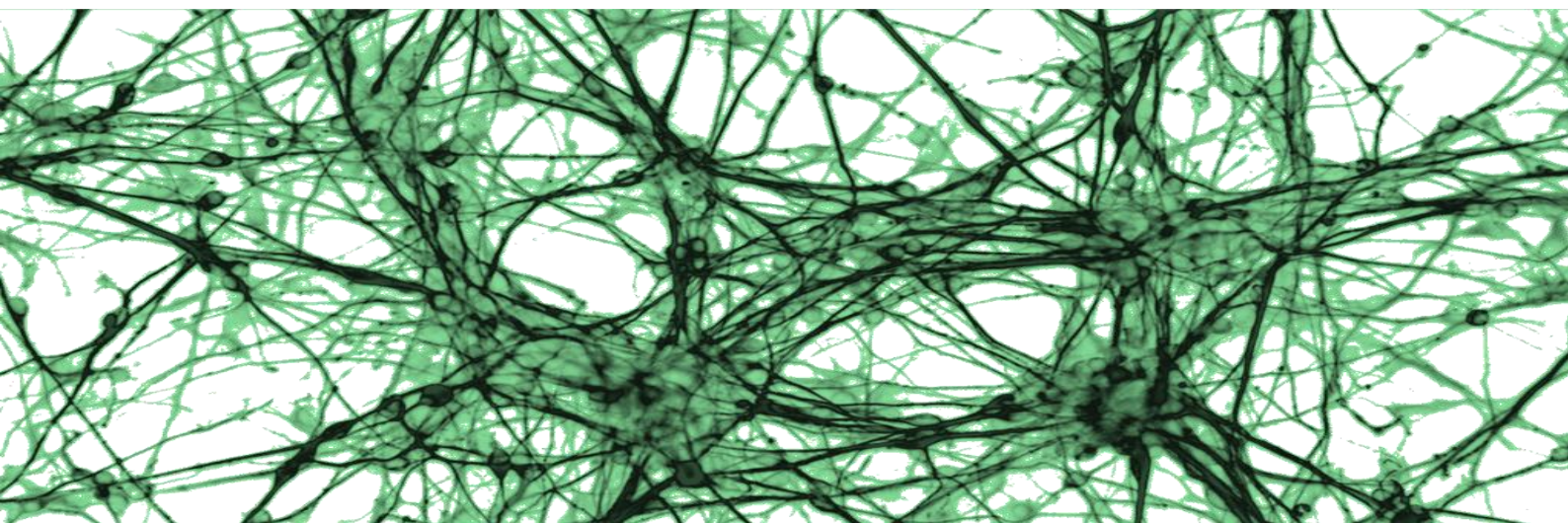
Figura 85. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 0.5, 1, 2, 3 y 6µM de Decitabina® y cloroquina 25µM.	134
Figura 86. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6µM de Decitabina® y cloroquina 25µM.	134
Figura 87. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6µM de Decitabina® y cloroquina 25µM.	136
Figura 88. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y cloroquina 25µM.	137
Figura 89. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y cloroquina 25µM.	138
Figura 90. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y cloroquina 25µM.	139
Figura 91. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM de Panobinostat®.	140
Figura 92. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 50nM de Panobinostat®.	140
Figura 93. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Panobinostat® 50nM.	142
Figura 94. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM.	143
Figura 95. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM.	144
Figura 96. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM.	145
Figura 97. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM de Panobinostat® y cloroquina 25µM.	146
Figura 98. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 50nM de Panobinostat® y 25µM de cloroquina.	146
Figura 99. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Panobinostat® 50nM y cloroquina 25µM.	148
Figura 100. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM y cloroquina 25µM.	149
Figura 101. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM y cloroquina 25µM.	150
Figura 102. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM y cloroquina 25µM.	151

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tumores del SNC más frecuentes incluyendo su grado de malignidad.....	33
Tabla 2. Proteínas implicadas en la autofagia en mamíferos, sus homólogos en levaduras y sus funciones.	45
Tabla 3. Tipos de autofagia selectiva y sus receptores.....	50
Tabla 4. Líneas celulares utilizadas y resumen de sus mutaciones.	63
Tabla 5. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot e inmunofluorescencia.	65
Tabla 6. Oligonucleótidos para la amplificación de la región promotora del gen TERT.	67
Tabla 7. Moléculas fluorescentes utilizadas en la amplificación con sondas Taqman™.....	68
Tabla 8. SNPs estudiados en este trabajo de genes relacionados con la autofagia.	69
Tabla 9. Principales características de los pacientes del estudio poblacional.	79
Tabla 10. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de pacientes y controles y su asociación con el riesgo a padecer GBM.	80
Tabla 11. Frecuencias alélicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de pacientes y controles y su asociación con el riesgo a padecer GBM.	81
Tabla 12. Principales características de los pacientes del estudio.	83
Tabla 13. Porcentajes de pacientes según la expresión de LC3B-I.	86
Tabla 14. Porcentajes de pacientes según la expresión de p62.	88
Tabla 15. Porcentajes de pacientes según la expresión de TRAF6.	90
Tabla 16. Porcentajes de pacientes según la expresión de PKC ζ y el sexo del paciente.	91
Tabla 17. Porcentajes de pacientes según la expresión de PKC ζ	93
Tabla 18. Porcentajes de pacientes según la expresión de mTOR y la edad de aparición del tumor.....	94
Tabla 19. Porcentajes de pacientes según la expresión de mTOR.....	95
Tabla 20. Porcentajes de pacientes según la expresión de Beclin1.....	96
Tabla 21. Porcentajes de pacientes según la expresión de PI3KCA.....	98
Tabla 22. Correlación entre la expresión de proteínas de autofagia en GBM usando el test de Spearman.....	99
Tabla 23. Correlación entre la expresión de proteínas de la autofagia en ABG usando el test de Spearman.....	99
Tabla 24. Porcentajes de pacientes teniendo en cuenta la expresión conjunta de LC3B-II y p62.....	100
Tabla 25. Porcentajes de pacientes con glioblastoma con mutaciones en el promotor de <i>hTERT</i>	100
Tabla 26. Porcentajes de pacientes según la expresión de p62 y la presencia de mutaciones en <i>hTERT</i>	101
Tabla 27. Datos clínicos de los pacientes con GBM del estudio de genotipado.....	199
Tabla 28. Datos clínicos de los pacientes del estudio de expresión de proteínas de autofagia.	205
Tabla 29. Perfil molecular de los glioblastomas analizados en la correlación entre las expresiones de proteínas de autofagia y el subtipo molecular tumoral.....	208
Tabla 30. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo <i>ATG2B</i> rs3759601.....	209
Tabla 31. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo <i>ATG5</i> rs2245214.	209
Tabla 32. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo <i>ATG10</i> rs1864183.....	210
Tabla 33. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo <i>ATG16L1</i> rs2241880.....	210
Tabla 34. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo <i>NOD2</i> rs2066844.	211

Tabla 35. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo <i>NOD2</i> rs2066845.....	211
Tabla 36. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de p62.....	212
Tabla 37. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de mTOR.....	212
Tabla 38. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de LC3B-I.....	213
Tabla 39. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de LC3B-II.....	213
Tabla 40. Relación de resultados no significativos en GBM respecto a la expresión de Beclin1.	214
Tabla 41. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de PKCz.	214
Tabla 42. Relación de resultados no significativos en GBM respecto a la expresión de PI3KCA.	215
Tabla 43. Relación de resultados no significativos en GBM respecto a la expresión de TRAF6.....	215
Tabla 44. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de p62.	216
Tabla 45. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de mTOR.	216
Tabla 46. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de LC3B-I.....	217
Tabla 47. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de LC3B-II.....	217
Tabla 48. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de Beclin1.	218
Tabla 49. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de PKCz.	218
Tabla 50. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de PI3KCA.	219
Tabla 51. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de TRAF6.....	219
Tabla 52. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto al estado de la autofagia.	220
Tabla 53. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de p62.	220
Tabla 54. Relación de resultados no significativos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de mTOR.	220
Tabla 55. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de LC3B-I.	220
Tabla 56. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de LC3B-II.	220
Tabla 57. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de Beclin1.....	220
Tabla 58. Relación de resultados no significativos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de PKCz.	221
Tabla 59. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de PI3KCA.....	221
Tabla 60. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de TRAF6.....	221
Tabla 61. Relación de resultados no significativos respecto a la comparación de la expresión de proteínas de autofagia y la clasificación molecular de los tumores analizados.....	221

***TABLA DE
ABREVIATURAS***



5-Aza: 5-aza-2'-desoxicitidina

ABG: Astrocitoma de bajo grado

AKT: *Protein Kinase B*

AMBRA1: *Activating Molecule in BECN1- Regulated Autophagy*

AMC: Autofagia mediada por chaperonas

AMPK: *AMP-activated Protein Kinase*

AMPS: *Ammonium Persulfate*

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

ATG: *Autophagy related Gene*

ATP: *Adenosin Triphosphate*

Barkor: *Beclin-1-associated autophagy-related key regulator (ATG14)*

BCL-2: *B-Cell CLL/Lymphoma 2*

BECN1: *Beclin1, autophagy related*

BEV: Bevacizumab

Bp: *Base pairs*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CBTRUS: *Central Brain Tumor Registry of the United States*

CDK1: *Cyclin-dependent Kinase 1*

CDKN2A: *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*

CIAA: Cloroformo:alcohol isoamílico

CLN3: *Ceroid-Lipofuscinosis, Neuronal 3*

CQ: Cloroquina

CYB5R2: *cytochrome b5 reductase 2*

DAPI: *4',6-diaminido-2-phenilindole*

DEPTOR: *DEP Domain Containing MTOR-Interacting Protein*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: *Dimethyl Sulfoxide*

DNA: *Desoxyribonucleic Acid*

DNMT: DNA metiltransferasa

dNTP: *Deoxynucleotide Triphosphate*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

EGFR (ERBB1): *Epidermal Growth Factor Receptor*

ERCC1/2: *Excision Repair Cross-Complementation Group 1/2*

ERK1: *Extracellular-signal-regulated kinase 1*

ESCRT: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FIP200: *Focal adhesion kinase family-interacting protein 200kD*

FGFR2: *Fibroblast growth factor receptor 2*

GABARAP: *GABA(A) Receptor-Associated Protein*

GAP: *GTPase-activating Protein*

GBM: *Glioblastoma Multiforme*

G-CIMP: *glioma-CpG island methylator phenotype*

HCMV: *Citomegalovirus*

HDAC: *Histone Deacetylase*

HDACi: *Histone Deacetylase inhibitor*

HER2 (ERBB2): *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

Hsp90: *Heat Shock Protein 90*

IC: *Intervalo de Confianza*

IDH1/2: *Isocitrato deshidrogenasa 1/2*

IL-8: *Interleucina-8*

IL-IR: *Interleukin-1 Receptor*

IQR: *Rango intercuartílico*

JNK: *JUN N-terminal Kinase*

KD: *Kinase Domain*

KIR: *KEAP1 Interacting Region*

KRAS: *Kirsten Rat Sarcome*

LAMP-2: *Lysosomal-Associated Membrane Protein 2*

LC3B: *Microtubule-Associated Protein 1B-light Chain 3*

LIR: *LC3-interacting Region*

MAPK: *Mitogen-activated Protein Kinase*

MDM2: *Murine Double Minute 2*

Met: *Metformina*

MGMT: *O⁶- metil guanina metil transferasa*

MMR: *Mismatch Repair System*

mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*

mTORC1/2: *mTOR Complex 1/2*

MTT: *Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*

NAD: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NOD2: *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*

NF1: *Neurofibromatosis 1*

NF-κB: *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells*

Nrf2: *NF-E2-related Factor 2*

O⁶-MeG: *O6-metil guanina.*

NSF: *N-ethylmaleimide-sensitive factor*

OMS: *Organización Mundial de la Salud*

OR: *Odd Ratio*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDK1: *Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 1*

PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptor*

PE: *Fosfatidiletanolamida*

PI: *Phosphatidylinositol*

PI(3)P: *Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIK3CA: *Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*

PKCζ: *Protein Kinase C ζ*

PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog*

PVDF: *Polyvinylidene Difluoride*

Rab7: *RAS-associated protein 7*

RANK: *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B*

Raptor: *Regulatory Associated Protein of mTORC1*

RAS: *Rat Sarcoma*

RB1: *Retinoblastoma 1*

Rictor: *Raptor Independent (Rapamycin Insensitive) Companion of mTORC2*

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay*

RNA: *Ribonucleic Acid*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

r.p.m.: *Revoluciones por minuto*

Rubicon: *RUN domain- and cysteine-rich domain-containing*

SAHA: *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*

SDH: *Succinato deshidrogenasa*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SNARE: *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor*

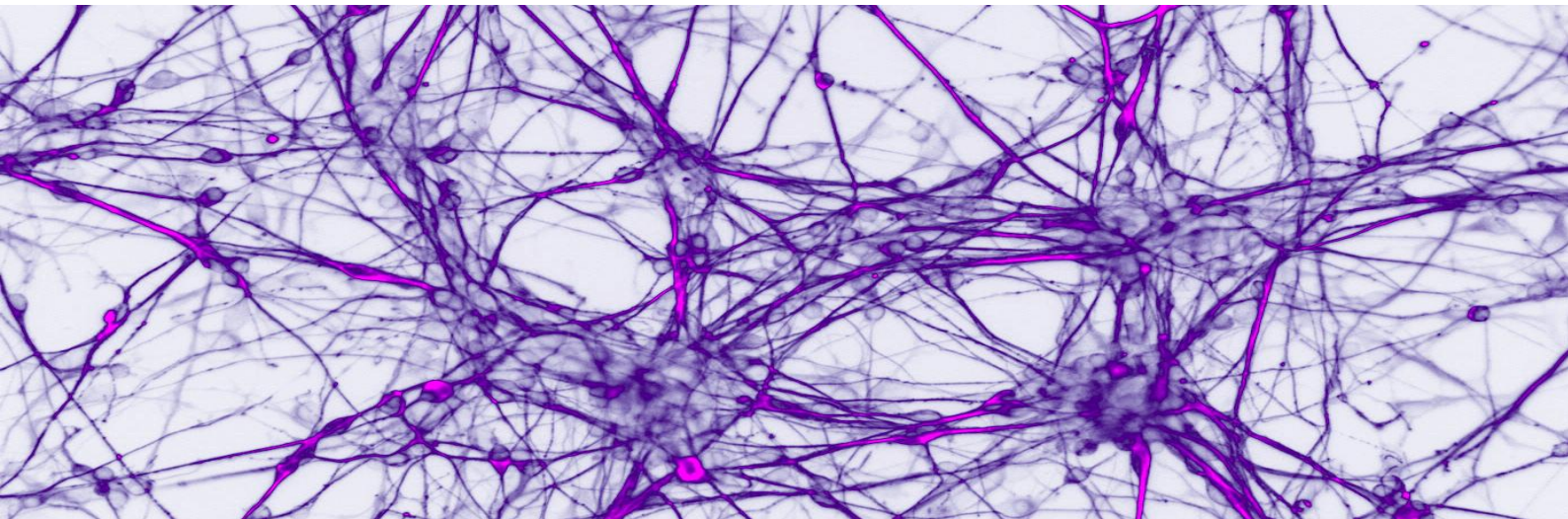
SNC: *Sistema Nervioso Central*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SQSTM1 (p62): *Sequestosome 1*

Taq: *Termus aquaticus*
TB: *TRAF6-binding*
TBE: *Tris Borato, EDTA*
TBS: *Tris Buffered Saline*
TBS-T: *Tris Buffered Saline + Tween20*
TCGA: *The Cancer Genome Atlas*
TEMED: *Tetramethylethylenediamine*
TERT: *telomerasa transcriptasa inversa*
TLR: *Toll-like Receptor*
TMZ: *Temozolamida*
TNF: *Tumor Necrosis Factor*
TNFR: *Tumor Necrosis Factor Receptor*
TP53: *Tumor Protein 53*
TRAF6: *TNF Receptor-Associated Factor 6*
TSC1/2: *Tuberous Sclerosis 1/2*
UBA: *Ubiquitin-associated domain*
UBD: *Ubiquitin Domain*
Ubl: *Ubiquitin-like*
ULK1/2: *Unc-51-like Kinase 1/2*
UV: *Ultravioleta*
UVRAG: *Ultraviolet irradiation Resistance-associated Gene*
VAMP-3: *Vesicle-associated membrane protein 3*
VEGF-A: *Vascular Endothelial Growth Factor A*
VHL: *Von Hippel-Lindau*
VPS34: *Phosphatidylinositol 3-kinase, Catalytic Subunit Type 3*
WIPI1/2: *WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 1/2*
WT: *Wild Type*
XRCC7: *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*
ZZ: *Zinc-finger*

INTRODUCCIÓN



1. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1.1 GENERALIDADES

El Sistema Nervioso Central (SNC) está compuesto por neuronas y células de la glía. Las neuronas son células especializadas en la recepción del estímulo y la conducción del impulso nervioso, mientras que la glía es el tejido conectivo encargado del mantenimiento, la protección y la nutrición de las primeras. Existen varios tipos de células gliales en el SNC: los astrocitos, los oligodendrocitos, las células del epéndimo y la microglía. Los astrocitos son células con forma estrellada que se encargan de proporcionar soporte físico a las neuronas, aportarles nutrientes mediante su unión a los vasos sanguíneos y fagocitar los desechos del cerebro. Los oligodendrocitos proporcionan soporte a los axones y producen las vainas de mielina. Las células del epéndimo revisten el conducto central de la médula espinal y los ventrículos cerebrales, protegiéndolos, y, además, producen y segregan líquido cefalorraquídeo. La microglía son células pequeñas con capacidad fagocítica que constituyen la principal defensa del SNC.

A diferencia de las neuronas, que pierden su capacidad proliferativa cuando el SNC madura, los precursores de las células de la glía mantienen la capacidad de dividirse y diferenciarse. Por ello, la mayoría de los tumores del SNC en adultos son de origen glial, denominándose genéricamente gliomas (Figura 1) ¹⁻³.

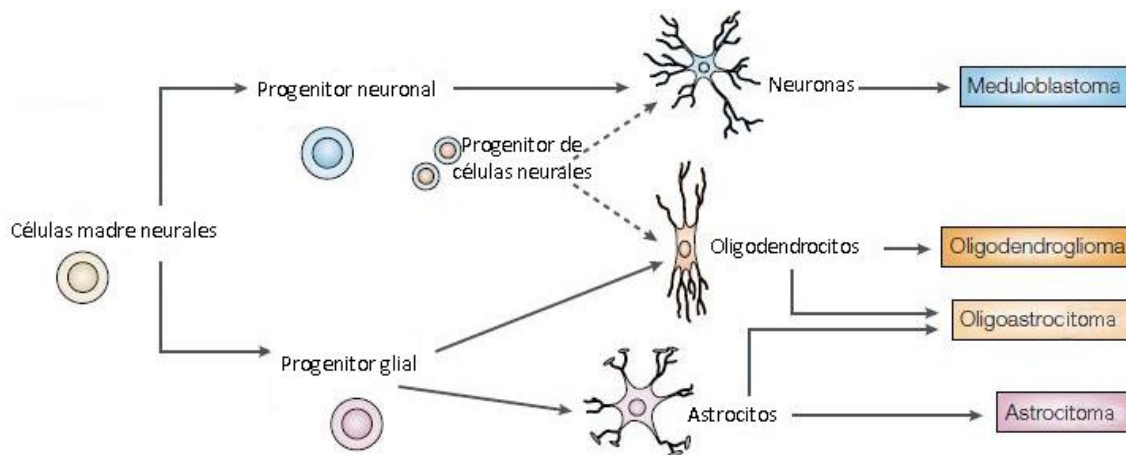


Figura 1. Esquema del desarrollo neuroectodérmico y los principales tumores del SNC.

El origen de los gliomas está abierto a debate. Una hipótesis sugiere que los gliomas derivan de la transformación de células gliales maduras; no obstante, la evidencia que apoya este tipo de gliomagénesis es limitada ^{4,5}. Actualmente se apoya preferentemente una gliomagénesis derivada de células madre neurales, de células progenitoras o de la dediferenciación de células neurales maduras debido a la activación de distintas rutas oncogénicas ^{6,7}.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LOS TUMORES DEL SNC

Los tumores malignos del SNC, excluyendo linfomas, tumores de la pituitaria y las glándulas pineales y tumores olfativos de la cavidad nasal, representan el 1,8% de todos los tumores humanos a nivel mundial y el 1,7% de la totalidad de los tumores en España. No obstante, la incidencia de estos tumores en España tiende a aumentar lentamente según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). Este incremento podría explicarse por el crecimiento de la población y su envejecimiento⁸. En España, la tasa de incidencia de estos tumores en mujeres es más baja que en hombres, siendo de 4,2 por cada 100000 y 6,1 por cada 100000 respectivamente (datos GLOBOCAN 2012)⁹⁻¹¹¹². No obstante, las mujeres suelen desarrollar más tumores benignos, fundamentalmente meningiomas, que se producen en el tejido aracnoideo de las meninges¹³. Factores étnicos, culturales y geográficos también son determinantes en la incidencia de estos tumores. En países desarrollados las tasas de incidencia de tumores malignos del SNC son más altas¹⁴. En Japón la incidencia de estos tumores es menos de la mitad que en el norte de Europa. Hay estudios que demuestran que en Estados Unidos las personas de raza blanca desarrollan más gliomas que las personas de raza negra, aunque la incidencia de tumores benignos es similar entre ambas razas¹⁵.

La etiología de los tumores del SNC es desconocida. Factores como la dieta, el tabaco o el alcohol no parecen tener un papel determinante en el desarrollo de estos tumores, aunque un estudio afirma que sí la altura y el índice de masa corporal¹⁶. Se ha observado también un aumento de la incidencia de estos tumores en mujeres post-menopáusicas, sugiriendo que las hormonas sexuales podrían tener un papel protector en el desarrollo de tumores primarios del SNC¹⁷. Se cree, además, que virus como el citomegalovirus (HCMV) podrían estar relacionados con el desarrollo de los gliomas¹⁸.

El principal factor de riesgo descrito en el desarrollo de tumores primarios malignos del SNC es la radiación ionizante¹⁹. Sustancias químicas como pesticidas, compuestos aromáticos policíclicos y disolventes se consideran potencialmente peligrosos¹⁹. Los campos electromagnéticos y algunos metales también se han relacionado con el riesgo de padecer gliomas, lo que ha llevado a pensar que el uso del teléfono móvil podría incrementar su incidencia; sin embargo, esta afirmación no es concluyente²⁰⁻²².

Existe, además, una predisposición genética a desarrollar este tipo de tumores en familias con mutaciones en genes relacionados con síndromes hereditarios poco frecuentes¹⁹. Entre ellos se encuentran la esclerosis tuberosa (genes *TSC1* y *TSC2*), el síndrome de Turcot (gen *APC*), el síndrome de Li-Fraumeni (gen *TP53*), el síndrome de Cowden (gen *PTEN*), el retinoblastoma (gen *RB*), el síndrome de Von Hippel-Lindau (gen *VHL*) o el síndrome de Lynch (genes del sistema de reparación mismatch repair (MMR))²³⁻²⁷.

Se sabe también que polimorfismos en genes implicados en la reparación del DNA (*ERCC1*, *ERCC2*, *XRCC7* o *MGMT*) o la regulación del ciclo celular (*CDKN2B*, *TP53* o *MDM2*) están relacionados con el riesgo a padecer gliomas^{13,19}.

1.3 CLASIFICACIÓN DE TUMORES DEL SNC

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una clasificación de todos los tumores del SNC en función de su histología y grado de malignidad (Tabla 1) ²⁸.

El grado de malignidad predice el comportamiento biológico del tumor, su respuesta a la terapia y el pronóstico del paciente y se establece en función de criterios histológicos tales como la atipia nuclear, la actividad mitótica, la proliferación microvascular y la presencia de zonas necróticas en el tumor ²⁹.

En términos generales, se designan como tumores de grado I aquellos con potencial proliferativo bajo y comportamiento fundamentalmente benigno, lo que hace posible su resección quirúrgica completa. Las neoplasias de grado II tienen naturaleza infiltrante, aun con una actividad proliferativa baja; a menudo estos tumores son recurrentes y muchos de ellos tienden a evolucionar a grados mayores de malignidad. Los tumores de grado III son tumores con clara evidencia de malignidad, atipia nuclear y elevada actividad mitótica. Finalmente, los tumores de mayor grado de malignidad son los tumores de grado IV, que caracterizan por tener una naturaleza altamente infiltrante, mucha activación mitótica, alta vascularización, zonas necróticas y estar asociados con una rápida evolución pre- y post-quirúrgica de la enfermedad y mal pronóstico ²⁸.

Tabla 1. Clasificación de los tumores del SNC más frecuentes según la OMS incluyendo su grado de malignidad.

TUMORES NEUROEPITELIALES	
Tumores astrocíticos	Tumores embrionarios
Astrocitoma pilocítico (grado I)	Meduloblastoma (grado IV)
Astrocitoma difuso (grado II)	Tumores neuroectodermales primitivos del SNC (PNET) (grado IV)
Astrocitoma anaplásico (grado III)	Tumor rabdoide/teratoide atípico (grado IV)
Glioblastoma multiforme (grado IV)	
Astrocitoma subependimario de células gigantes (grado I)	
Xantoastrocitoma pleomórfico (grado II)	
Tumores oligodendrogiales	TUMORES DE LOS NERVIOS CRANEALES Y PARAESPINALES
Oligodendroglioma (grado II)	Schwannoma (grado I)
Oligodendroglioma anaplásico (grado III)	Neurofibroma (grado I)
	Perineurioma (grado I, II y III)
	Tumor de la vaina nerviosa periférica maligno (MPNST) (grado II, III y IV)
Tumores oligoastrocíticos	TUMORES DE LAS MENINGES
Oligoastrocitoma (grado II)	Meningioma (grado I)
Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)	Meningioma atípico (grado II)
	Meningioma anaplásico (grado III)
Tumores ependimales	Hemangiopericitoma (grado II)
Subependimoma (grado I)	Hemangiopericitoma anaplásico (grado III)
Ependimoma mixopapilar (grado I)	Hemangioblastoma (grado I)
Ependimoma (grado II)	
Ependimoma anaplásico (grado III)	

1.4 TUMORES ASTROCÍTICOS

Los gliomas son los tumores malignos primarios más comunes del SNC, suponiendo más del 30% de los tumores intracraneales y más del 80% de las neoplasias cerebrales malignas. Los astrocitomas son los gliomas más comunes en adultos, representando el 76% de todos ellos ³⁰ y comprenden cuatro tipos tumorales en función del grado de malignidad.

Grado I (Astrocitoma Pilocítico)

Supone el 5-6% de todos los gliomas. Se trata de un tumor relativamente circunscrito y de baja proliferación (Figura 2). Afecta fundamentalmente a niños y jóvenes, siendo la edad media de aparición del tumor entre 15 y 20 años. Habitualmente aparece en el cerebelo, hipotálamo o en la tercera región ventricular. Su pronóstico es muy favorable debido a que suele eliminarse totalmente mediante cirugía, por lo que tratamiento con radioterapia o quimioterapia no suele ser necesario ²⁹. Su supervivencia es del 95% a los 10 años ³¹.

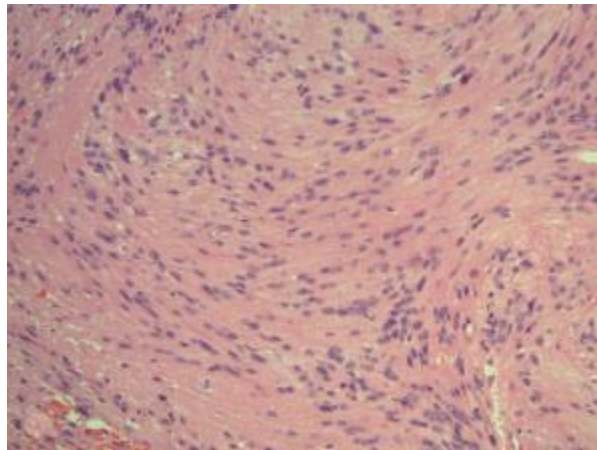


Figura 2. Histopatología del astrocitoma pilocítico.

Grado II (Astrocitoma Difuso o de Bajo Grado)

Representa el 5-10% de los gliomas y el 10-15% de todos los tumores astrocíticos. Se trata de un tumor con capacidad de infiltración del parénquima cerebral. La edad media de aparición del mismo es entre 30 y 40 años, mostrando predominancia en varones. Su localización suele ser supratentorial. Es un tumor bien diferenciado que se caracteriza por un incremento moderado de la celularidad, asociado a un crecimiento lento pero continuo y atipia nuclear ocasional ^{29,32} (Figura 3). A menudo el astrocitoma difuso evoluciona a astrocitoma de grado más alto (Grados III y IV). Su tratamiento habitual es la resección quirúrgica y la radioterapia ³³, aunque a menudo presenta recurrencia. La media de la supervivencia tras la cirugía es de 7-8 años ³⁴. Junto con el astrocitoma pilocítico conforma los llamados astrocitomas de bajo grado.

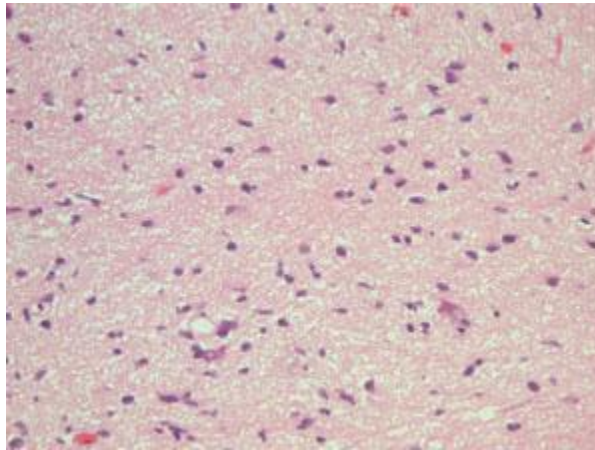


Figura 3. Histopatología del astrocitoma difuso.

Grado III (Astrocitoma Anaplásico)

Representa el 10-15% de los gliomas. Su edad de aparición es de 45-55 años y su localización también es supratentorial. Se considera el resultado de la progresión del astrocitoma difuso, habitualmente asociado a una pérdida del control del ciclo celular y un aumento de la angiogénesis. Este tumor también muestra un aumento de la celularidad, alta actividad mitótica y atipia nuclear²⁹ (Figura 4). El tratamiento habitual de este tipo tumoral es la cirugía y la radioterapia. En muchos casos, la quimioterapia también se considera tratamiento de elección, aunque no mejora el pronóstico³⁵. Habitualmente el astrocitoma anaplásico recurre e incluso progresa a grado IV. Su media de supervivencia es de 2 a 3 años³⁴.

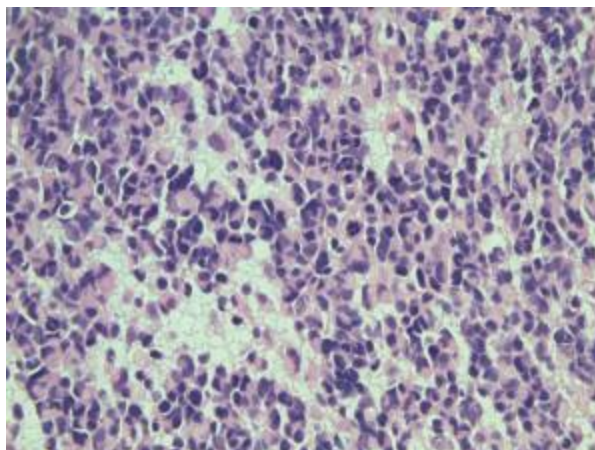


Figura 4. Histopatología del astrocitoma anaplásico.

Grado IV (Glioblastoma Multiforme (GBM))

Es el tumor más común entre los astrocitomas, suponiendo el 60-75% de ellos. Afecta

fundamentalmente a adultos, siendo las edades más comunes de aparición las comprendidas entre los 45 y 75 años. El glioblastoma multiforme se localiza fundamentalmente en los hemisferios cerebrales. Este tumor se caracteriza por tener células astrocíticas pleomórficas con marcada atipia nuclear y altísimas tasas mitóticas. Esta alta proliferación resulta en necrosis espontáneas y proliferación endotelial ²⁹ (Figura 5). Su tratamiento habitual consiste en una cirugía que consiga la máxima resección, seguido de radioterapia en combinación con el fármaco quimioterápico temozolamida (TMZ) ³⁶. A pesar de esto, la media de supervivencia de este tumor no supera los 14 meses ^{37,38}.

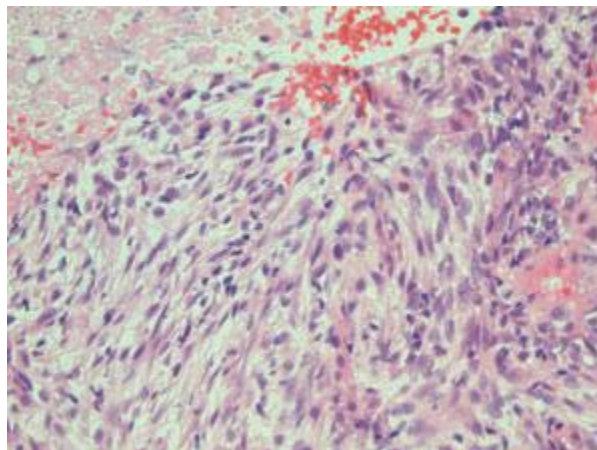


Figura 5. Histopatología del glioblastoma multiforme.

2. EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El glioblastoma multiforme es el tumor maligno del SNC más común y agresivo en adultos. Como se ha descrito anteriormente, se caracteriza por tener proliferación celular incontrolada, elevada capacidad de infiltración por todo el tejido, angiogénesis robusta, intensa resistencia a la apoptosis, propensión al desarrollo de focos necróticos y alta inestabilidad genómica ³⁹. A pesar de su alta capacidad de infiltración, raramente metastatiza ⁴⁰.

Se han establecido dos subgrupos de glioblastomas en función de su mecanismo de tumorigénesis: los glioblastomas primarios y secundarios. Los glioblastomas primarios se desarrollan *de novo*, sin la existencia de lesiones previas. Suponen el 90% de todos los glioblastomas y presentan un crecimiento muy rápido, postulándose que su tiempo de desarrollo es de tres meses. La edad media de aparición es 64 años ⁴¹. El 10% restante de glioblastomas son secundarios, desarrollados por la progresión de tumores de bajo grado, lo que puede llevar 4-5 años. Su crecimiento es más lento y, en general, presentan mejor pronóstico. La edad de aparición de los glioblastomas multiformes secundarios es de 39 años ⁴¹. A pesar de que la base genética y los mecanismos genéticos de desarrollo de los tumores son diferentes ⁴², los glioblastomas primarios y secundarios no muestran diferencias morfológicas y son clínica e histológicamente indiferenciables ⁴³.

2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Según el último informe del CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), el glioblastoma multiforme representa el 46,1% de todos los tumores malignos del SNC (Figura 6), con una incidencia de 3.20 (CI 3.17-3.22) por cada 100000 personas ⁴⁴. Es un tumor que aparece de manera más común en adultos, siendo la edad media de aparición de 64 años. No obstante, supone el 3% de todos los tumores malignos intracraneales en niños entre 0-19 años ⁴⁵. La incidencia de este tumor aumenta con la edad, alcanzando el máximo entre los 75-84 años. El glioblastoma es 1,6 veces más común en hombres que en mujeres, con tasas de incidencia de 3,99 y 2,54 por cada 100000 respectivamente. La etnia también parece ser un factor determinante, observándose tasas de incidencias dos veces más elevadas en personas de raza caucásica que en personas de raza negra ⁴⁴, especialmente entre aquellos que viven en zonas industriales ¹⁹.

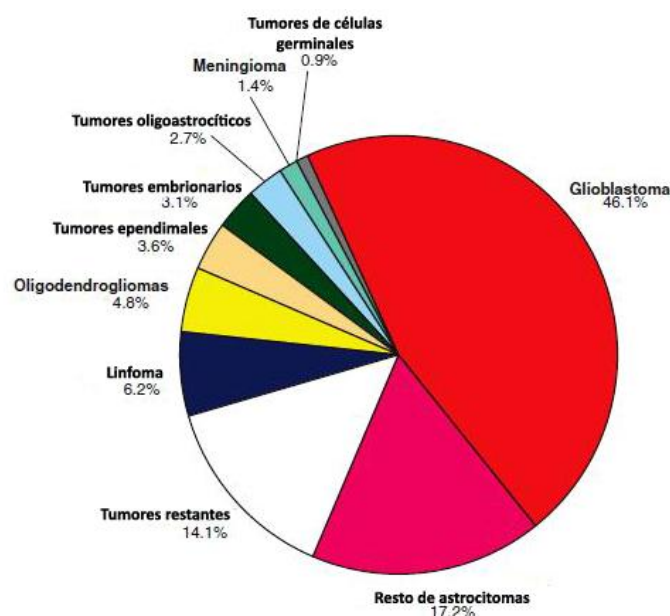


Figura 6. Distribución de los principales tumores malignos del SNC.

Como ya hemos señalado, la etiología del glioblastoma no se conoce completamente, aunque se sabe que algunos de los principales factores de riesgo en su desarrollo son la radiación ionizante y determinados compuestos químicos. Aunque la mayoría de glioblastomas son esporádicos, algunos síndromes como la esclerosis tuberosa, el síndrome de Lynch o la neurofibromatosis tipo I pueden aumentar el riesgo a desarrollar este tumor ⁴¹.

2.2 SUPERVIVENCIA DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El glioblastoma multiforme es uno de los tumores con peor pronóstico. La supervivencia relativa al año del diagnóstico es del 35%, del 13% tras el segundo año y tan solo el 5% de los

pacientes sobrevive 5 años. Sin embargo, estas estimaciones de supervivencia son ligeramente superiores si el diagnóstico se produce en pacientes menores de 20 años^{44,46}.

Los diferentes tratamientos para el glioblastoma multiforme tienen impacto en la supervivencia global del paciente. En términos generales se habla de una supervivencia de 12-14 meses en pacientes con el tratamiento estándar quirúrgico seguido de radioterapia en concomitancia con quimioterapia. En el caso de realizarse únicamente tratamiento quirúrgico, la media de supervivencia es de 6-10 meses, extendiéndose a 12 meses con radioterapia post-quirúrgica³⁷. La supervivencia es inferior en pacientes ancianos, teniendo medias de 8,5 meses con tratamiento estándar⁴⁷.

2.3 TRATAMIENTO DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El tratamiento estándar actual del GBM consiste en la máxima resección quirúrgica segura del tumor, junto con radioterapia y quimioterapia post-quirúrgica³⁷. El agente quimioterápico más utilizado es la temozolamida (Temodar®, Temodal®, TMZ), un fármaco alquilante administrado por vía oral capaz de añadir un grupo metilo a las purinas del DNA, formando O⁶-methylguanine (O⁶-MeG) (Figura 7), que promueve la muerte celular⁴⁸⁻⁵⁰. No obstante, la enzima O⁶-metil guanina metil transferasa (MGMT) es capaz de eliminar la O⁶-MeG, haciendo el tratamiento inefectivo. Se piensa que la pérdida del sistema de reparación MMR puede mediar también la resistencia a la TMZ⁵¹.

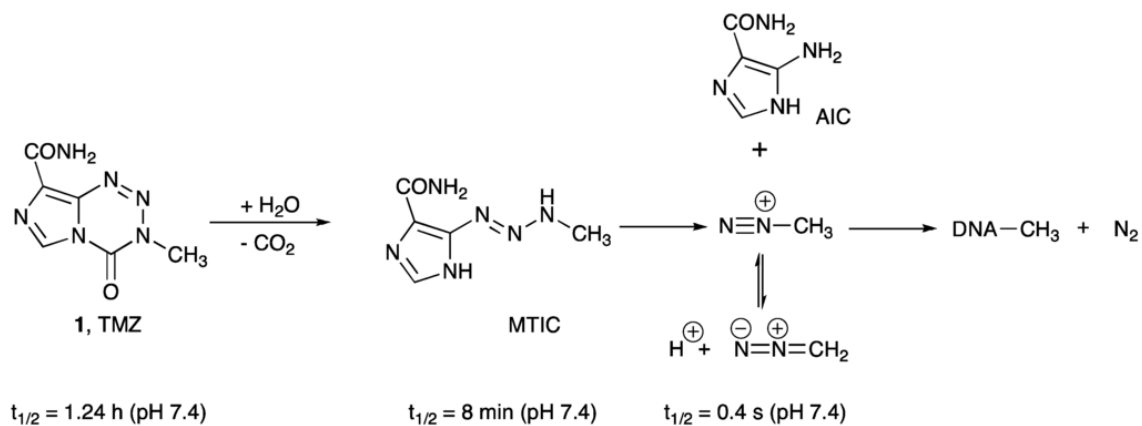


Figura 7. Mecanismo de acción de la temozolamida.

A pesar de lo agresivo del tratamiento de elección, prácticamente todos los glioblastomas recurren, habitualmente en el lugar del tumor primario. Esto se puede atribuir al comportamiento infiltrante del tumor, haciendo que la resección quirúrgica completa sea difícil; además, el GBM tiene extensas regiones de hipoxia en las que la ausencia de oxígeno puede disminuir la eficacia de la radiación ionizante. La presencia de la barrera hematoencefálica también limita la eficacia del transporte de la TMZ al tumor⁵¹. El único agente terapéutico aprobado para el tratamiento del

glioblastoma recurrente es el Bevacizumab (Avastin®, BEV) ⁵², un anticuerpo monoclonal contra el factor del crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). El VEGF-A activa la ruta de señalización de VEGFR, que promueve la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales, favoreciendo la formación de vasos sanguíneos.

La recurrencia del glioblastoma, junto con los mecanismos de resistencia a la TMZ y la aparición de clones celulares resistentes a medida que se administra el tratamiento hace necesario el desarrollo de nuevos tratamientos. Actualmente existen ensayos clínicos con inhibidores de receptores tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular, inhibidores del factor de crecimiento de las plaquetas, inhibidores de la ruta de señalización de RAS, inhibidores de la proteína quinasa C, inhibidores de la ruta *PI3K/AKT/mTOR*, inhibidores de histonas deacetilasas, inhibidores de integrinas ⁵², inhibidores de microtúbulos, inmunoterapia ⁵³ y nanopartículas que actúen como vehículos para su transporte a través de la barrera hematoencefálica (Figura 8) ⁴⁹.

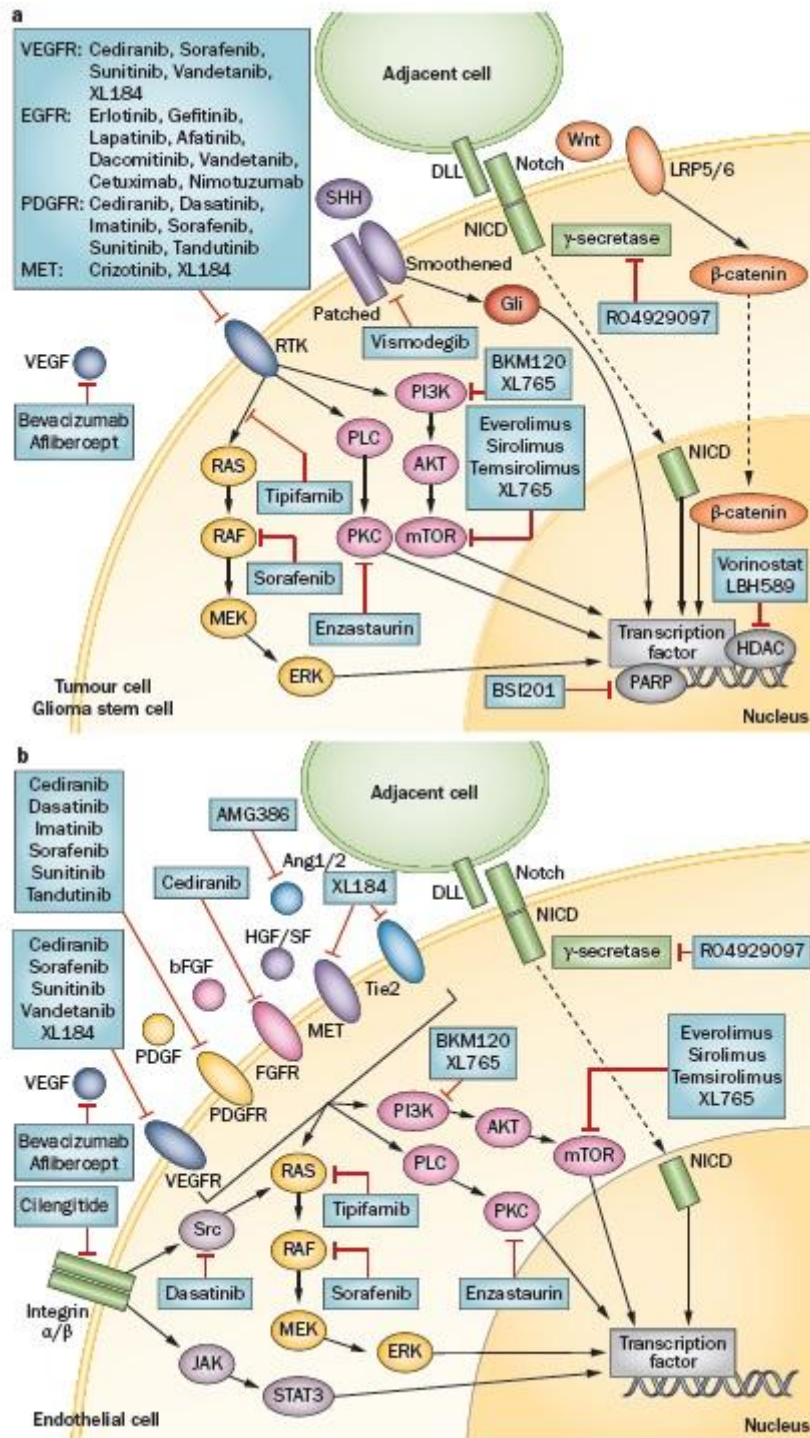


Figura 8. Dianas moleculares de las nuevas estrategias terapéuticas del GBM.

2.4 ALTERACIONES GENÉTICAS Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME. BIOMARCADORES

En las últimas décadas se han empezado a dilucidar los mecanismos genéticos y epigenéticos responsables de la iniciación, migración e invasión del GBM. En la mayor parte de los casos estos mecanismos generan alteraciones en rutas que regulan procesos como la proliferación, invasión,

metabolismo, muerte celular y angiogénesis, y pueden ser consecuencia de mutaciones genéticas o grandes amplificaciones o deleciones cromosómicas, alteraciones en la metilación de genes o variaciones en los niveles de microRNAs^{54,55}. Los genes alterados y el momento del desarrollo del tumor en el que se alteran se correlacionan con el tipo y grado tumoral (Figura 9).

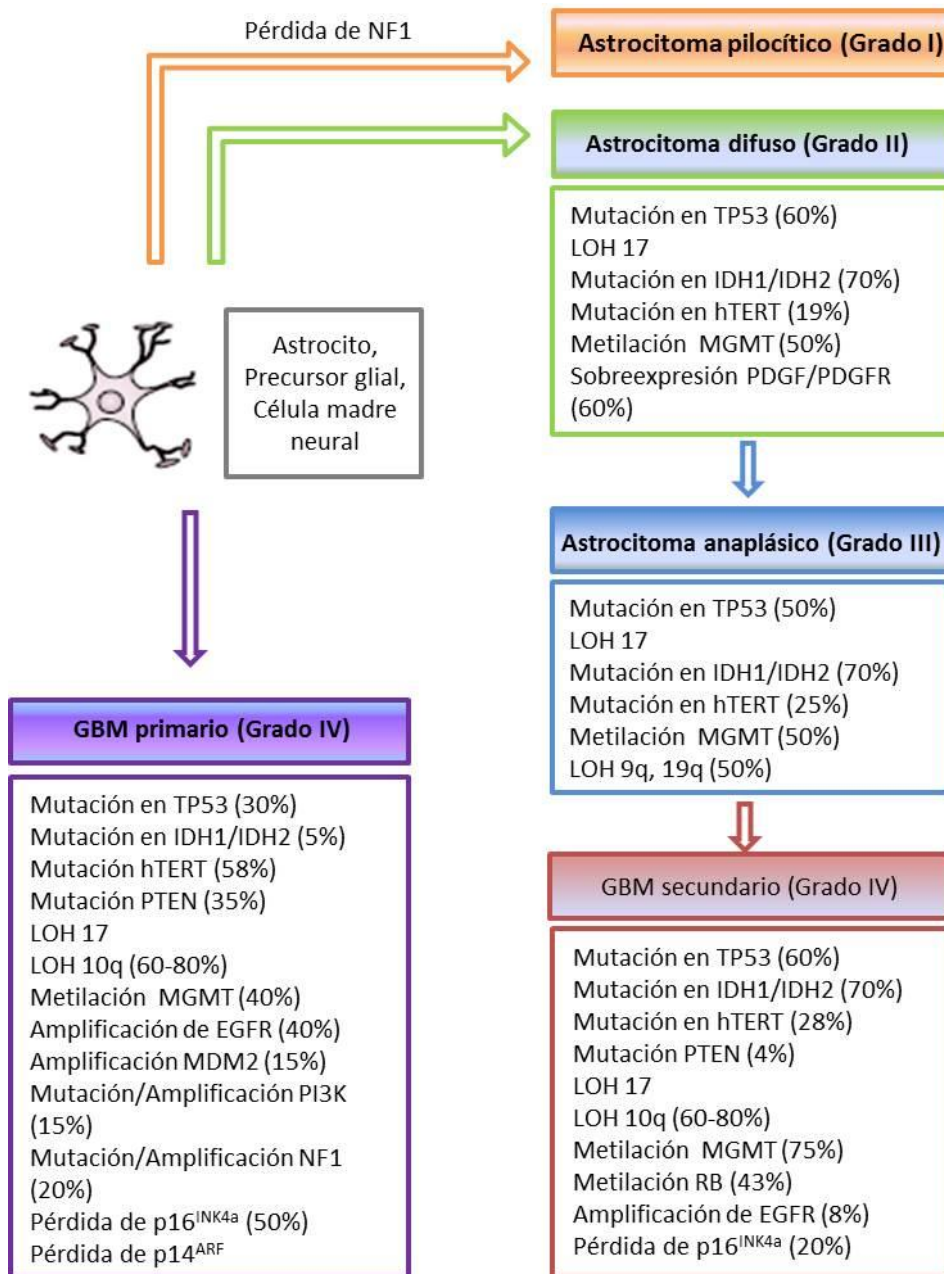


Figura 9. Principales alteraciones genéticas y epigenéticas en el glioblastoma multiforme.

A día de hoy, muchos de estos genes se consideran biomarcadores, de los cuales existen dos tipos: los pronósticos y los predictivos. Los pronósticos son aquellos que nos indican el resultado probable de la enfermedad independientemente del tratamiento recibido, mientras que los

predictivos nos informan de la respuesta probable de la enfermedad a la aplicación de un tratamiento ⁵⁶.

La ruta de señalización de *EGFR/PTEN/Akt/mTOR* es clave en el desarrollo del glioblastoma ⁵⁷. EGFR es una tirosina quinasa transmembrana cuya ruta de señalización promueve la división celular, la invasión y la resistencia a radioterapia y quimioterapia. Su amplificación ocurre habitualmente en el 40% de los glioblastomas primarios, pero raramente en los secundarios. Su sobreexpresión también es más habitual en los glioblastomas primarios (60%) frente al 10% de los secundarios ⁵⁸. Su transcrito alternativo 3 (*EGFRvIII*) es muy habitual. Esta variante presenta una delección de los exones 2 al 7, careciendo por tanto de dominio extracelular de unión a ligando y se expresa constitutivamente ⁵⁹. Los tumores con amplificación de *EGFR* o sobreexpresión de *EGFRvIII* tienen un pronóstico mucho más pobre que los que no lo presentan, lo que convierte a EGFR en un biomarcador pronóstico de la enfermedad. *PTEN*, cuyo locus se encuentra localizado en 10q23.3, se encuentra mutado de manera exclusiva en el 15-40% de los glioblastomas primarios ⁶⁰. Parece que pacientes con mutación de pérdida de función en este gen tiene tasas de supervivencia más cortas ⁴⁰.

La ruta *TP53/MDM2/p14^{ARF}* juega un papel crucial en el desarrollo de los glioblastomas secundarios. Las mutaciones en *TP53* son la primera alteración genética detectable en los astrocitomas difusos de bajo grado precursores, por lo que los glioblastomas secundarios también las tienen ^{32,39,61}. Mutaciones en *TP53* también ocurren en glioblastomas primarios, pero tan solo en el 30% de los casos. Además, en los glioblastomas secundarios, la mayoría de mutaciones se concentran en los codones 248 y 273, mientras que en los primarios se encuentran repartidos en toda la secuencia ⁵⁸. La amplificación de *MDM2* está presente en menos del 10% de glioblastomas y se da únicamente cuando no hay mutación en *TP53* ⁶². La pérdida de expresión de *p14^{ARF}* también es habitual, siendo más frecuente en glioblastomas primarios ⁶³.

La ruta *p16^{INK4a}/RB* parece ser importante en el desarrollo de ambos tipos de glioblastoma, aunque la delección de *p16^{INK4a}* es más frecuente en glioblastomas primarios y la metilación del gen *RB* en secundarios (43%) ⁵⁸.

También existen mutaciones en rutas implicadas en el metabolismo celular, siendo el gen afectado más frecuentemente el de las isoformas 1 y 2 de la enzima IDH. IDH1 se localiza en el citoplasma y cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato. IDH2 cataliza la misma reacción en la mitocondria. Se ha observado que tumores de grado II, III y glioblastomas secundarios con mutaciones en *IDH* presentan mejor pronóstico que los tumores del mismo grado sin mutación en *IDH*, convirtiendo *IDH* en un marcador pronóstico de la enfermedad ^{56,64}. Estas mutaciones probablemente constituyan un evento temprano en el desarrollo tumoral ya que se dan en astrocitomas de bajo grado precursores ⁶⁵ y suelen estar asociadas a otras alteraciones como las mutaciones en *TP53* ⁶⁴.

Recientemente se han identificado mutaciones somáticas en el promotor del gen de la

telomerasa transcriptasa reversa (*TERT*), que codifica la subunidad catalítica del complejo de la telomerasa. Las dos mutaciones más comunes son C228T y C250T, y se ha observado una mayor frecuencia en glioblastomas primarios que secundarios (58% y 28% respectivamente). En concreto, su mayor incidencia se ha dado en glioblastomas primarios con *IDH* germinal y amplificación de *EGFR* (92%)⁶⁶⁻⁶⁸. Parece que la presencia de mutaciones en el promotor de este gen se asocia con una supervivencia más corta, haciendo de *TERT* un marcador pronóstico del tumor⁴⁶.

La pérdida del brazo largo del cromosoma 10 (10q) es la alteración genética más común asociada tanto al glioblastoma primario como secundario, con frecuencias del 60-80% en ambos casos⁶⁹.

Aproximadamente el 40% de los glioblastomas primarios y más del 75% de los secundarios presentan hipermetilación de la región promotora del gen *MGMT*, que codifica la proteína O⁶-metil guanina metil transferasa. Esta enzima participa en la reparación del DNA eliminando los grupos alquilo de la posición O6 de la guanina, lo que protege a las células normales de la carcinogénesis, pero también repara el efecto alquilante de fármacos como la temozolamida. La metilación del promotor de *MGMT* supone el silenciamiento del gen por lo que, en estos casos, el tumor es capaz de responder al tratamiento con temozolamida^{70,71}.

Recientemente *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ha establecido una nueva clasificación molecular de los glioblastomas en función de las alteraciones genéticas que éstos poseen. Así, habría cuatro subtipos de glioblastoma: proneural, neural, clásico y mesenquimal⁷². El subtipo proneural se caracteriza por tener mutaciones en *TP53*, *PDGFR* e *IDH1*; aparece habitualmente en pacientes jóvenes y está asociado a mejor pronóstico y mayor supervivencia que otros subtipos, aunque es resistente a la quimioterapia³⁷. Este grupo, además, se puede subdividir en CpG (G-CIMP) positivo o negativo en función de los patrones de metilación del DNA. El subtipo clásico está caracterizado por tener mutaciones o amplificaciones en *EGFR*, *PDGFRA*, *PTEN*, ganancia de 7p y pérdida de 10q; aunque tiene peor pronóstico, responde mejor a la quimioterapia y radioterapia que el anterior grupo. Por último, el subtipo mesenquimal está asociado a mutaciones en *PTEN*, *TP53*, *NF1*, *NFκB* y *RB1*, se ha visto que no presenta mutaciones en *IDH1*, *ATRX* o *PDGFRA* y que habitualmente presenta el gen *CY5R2* hipometilado. Además, presenta respuesta parcial al tratamiento^{40,73}.

3. LA AUTOFAGIA

La palabra autofagia deriva del griego *auto* - uno mismo, y *phagos* – comer y se refiere a cualquier proceso celular de degradación proteolítica que implique el traslado de material citoplasmático al lisosoma⁷⁴. Hasta el momento se han identificado tres formas diferentes de autofagia: autofagia mediada por chaperonas (AMC), microautofagia y macroautofagia. En la primera, proteínas diana solubles que tienen un pentapéptido particular son reconocidas por proteínas chaperonas como la Hsc-70 y trasladadas al lisosoma a través de LAMP-2A (*lysosome-*

associated membrane protein 2), resultando en su degradación. En la microautofagia el material citoplasmático a degradar es directamente engullido por el lisosoma por reestructuración de su membrana. Finalmente, en la macroautofagia (a la que, a partir de ahora, se le referirá simplemente como autofagia), vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, engullen proteínas de vida larga, orgánulos dañados o incluso patógenos y los traslada a los lisosomas. Allí, la membrana exterior del autofagosoma se fusiona con la de lisosoma y su membrana interior y el contenido que transporta se degradan ⁷⁵⁻⁷⁷. Las macromoléculas resultantes de la degradación son transportadas de nuevo al citosol para su reutilización (Figura 10) ⁷⁸.

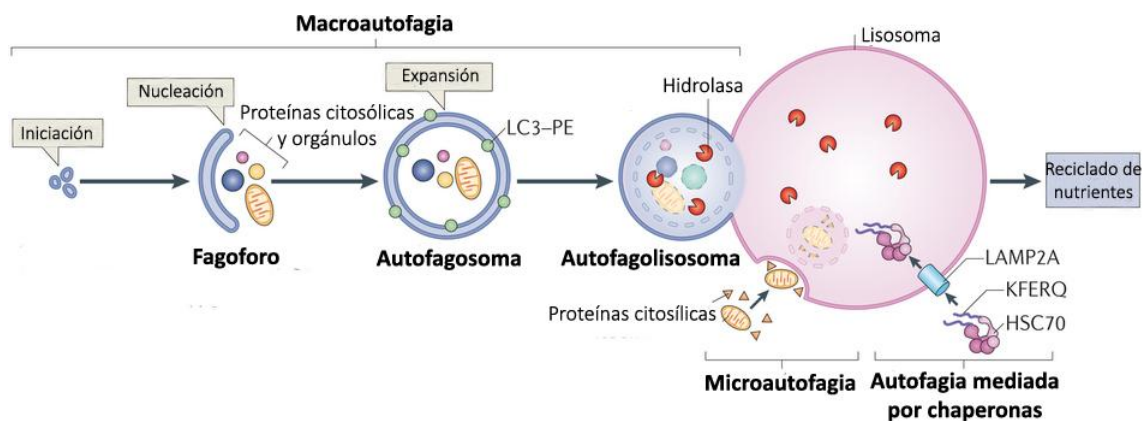


Figura 10. Esquema de los diferentes tipos de autofagia.

La autofagia es un proceso altamente controlado que supone la mayor vía celular regulada para la degradación de proteínas de vida larga y la única vía conocida para la degradación de orgánulos ⁷⁹. Este proceso se activa como mecanismo protector ante diferentes situaciones de estrés metabólico como privación de nutrientes y factores de crecimiento, estrés del retículo endoplasmático, presencia de citocinas, acumulación de calcio intracelular o hipoxia. Sin embargo, en ausencia de estrés, funciona basalmente para mantener la homeostasis celular mediante la degradación de orgánulos dañados, agregados proteicos anormales, proteínas mal plegadas y la eliminación de patógenos ⁷⁴. Estudios recientes sugieren que la autofagia puede actuar también como mecanismo protector del DNA, limitando su daño y la inestabilidad genómica ⁸⁰. No obstante, a pesar de que es fundamentalmente un mecanismo citoprotector, la autofagia también puede promover la llamada muerte celular programada tipo II o muerte autofágica. Sin embargo, no se conocen aún los mecanismos que pueden llevar a ella, aunque se ha propuesto que este tipo de muerte puede ocurrir como resultado de un auto-canibalismo extremo o a la degradación específica de factores citoprotectores ⁸¹.

3.1 BASES MOLECULARES DE LA AUTOFAGIA

La autofagia se ha estudiado en mamíferos desde la década de 1950, aunque no ha sido

hasta hace algo más de una década cuando se han llevado a cabo estudios moleculares en levaduras, permitiendo la identificación de 32 genes (*atg*) relacionados con este proceso. Con el tiempo, muchos homólogos han sido identificados en eucariotas superiores (ATG), sugiriendo que la autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución (Tabla 2)^{75,76}.

Tabla 2. Proteínas implicadas en la autofagia en mamíferos, sus homólogos en levaduras y sus funciones.

Proteína en mamíferos	Homólogo en levaduras	Función
ULK1/2	Atg1	Ser/Thr quinasa. Forma parte del complejo ULK1/2
ATG2A,B	Atg2	Proteína de membrana. Se une a WIPI4 y recluta a ATG9
ATG3	Atg3	Importante en la conjugación de LC3 con PE
ATG4A, B, C, D	Atg4	Cistein proteasa que procesa Pro-LC3
ATG5	Atg5	Forma parte del complejo ATG12-ATG5
Beclin1	Atg6	Componente del complejo Vps34 PI3P quinasa
ATG7	Atg7	Importante en la conjugación de ATG12-5 y ATG8-PE
LC3A, B, C	Atg8	Marcador del autofagosoma por conjugación con PE
GABARAP, GABARAPL1, GATE-16	Atg8	Marcador del autofagosoma por conjugación con PE
ATG9	Atg9	Proteína de membrana importante en la expansión del autofagosoma
ATG10	Atg10	Importante en la conjugación de ATG12-5
ATG12	Atg12	Forma parte del complejo ATG12-ATG5
ATG13	Atg13	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
ATG14L	Atg14	Subunidad del complejo Vps34 PI3P quinasa
ATG16L1	Atg16	Forma complejo ATG12-5 y participa en la conjugación ATG8-PE
FIP200	Atg17	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
WIPI1/2/3/4	Atg18, Atg21	Proteínas de unión a ATGs
ATG101		Componente del complejo ULK1/2 quinasa
AMBRA1		Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
P150	VPS15	Subunidad reguladora del complejo Vps34 PI3P quinasa
RUBICON		Regulador negativo del complejo Vps34 PI3P quinasa
UVRAG		Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
VPS34	Vps34	PI3 quinasa

El proceso de autofagia se divide en distintas etapas incluyendo la iniciación y nucleación del fagoforo, la inclusión de la carga, la elongación y cierre del autofagosoma, la formación del autofagolisosoma y la degradación del material celular.

3.1.1 Iniciación del fagoforo.

La inducción de la autofagia comienza con la formación del fagoforo o membrana de aislamiento. La iniciadora del proceso es la proteína quinasa ULK1 (Unc-51-like kinase 1) que forma un complejo tetramérico con ATG13, la proteína de andamiaje FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein 200kD) y la proteína ATG101, que se une y estabiliza a ATG13 (Figura 11)^{75-77,82}. ULK1 es capaz de fosforilar Atg13 y FIP200, induciendo la autofagia. Este complejo, a diferencia de lo observado en levaduras, se forma incluso en condiciones ricas en nutrientes^{83,84}. El parálogo de ULK1, ULK2 (Unc-51-like kinase 2), se cree que tiene redundancia funcional con ULK1⁸⁵. El complejo ULK1 quinasa está regulado por la serina / treonina quinasa mTOR (mammalian Target of Rapamycin) cuando ésta forma el complejo mTORC1. Este complejo está formado por mTOR, Raptor (Rapamycin-sensitive adapter protein of mTOR) y la proteína LST8^{86,87}. Bajo condiciones ricas en

nutrientes el complejo MTORC1 interactúa con el complejo ULK1 quinasa y fosforila ULK1 y ATG13, inhibiendo de esta manera la actividad de ULK1. En situación de privación de nutrientes, nitrógeno o ATP el complejo mTORC1 es inactivo y se disocia del complejo ULK1 quinasa, permitiendo a ULK1 fosforilar los otros componentes del complejo y a sí misma, dirigirse al sitio de ensamblaje de fagoforo y activar la autofagia ^{75,82,88}.

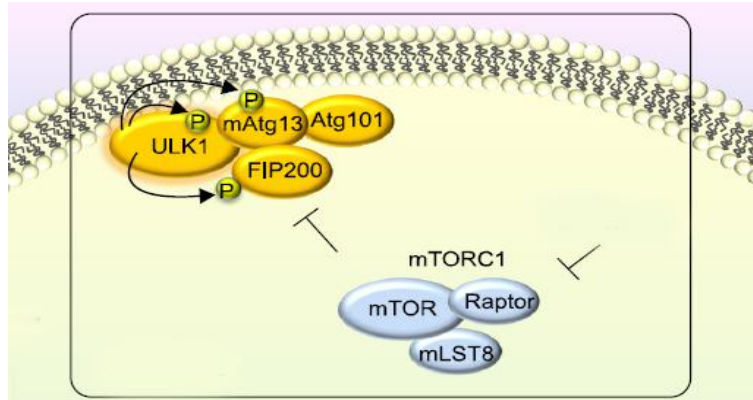


Figura 11. Moléculas claves en la iniciación del proceso de autofagia.

3.1.2 Nucleación del fagoforo

La nucleación del autofagosoma está controlada por la activación del complejo proteico PI3K de clase III. Este complejo se forma con la interacción de las proteínas Vps34 (Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase (PI3K) catalytic unit 3), p150, Beclin-1 y mATG14 (Figura 12). La interacción de Vps34 con mATG14 a través de su región "coiledcoil" dirige el complejo hacia la membrana emergente del autofagosoma. Se cree además que mATG14 es la proteína responsable del mantenimiento de la curvatura de la membrana del autofagosoma en formación. Beclin1 interactúa con Vps34, lo cual es necesario para que Vps34 sea capaz de fosforilar el fosfatidilinositol (PI) a fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), que se encarga de reclutar proteínas al fagoforo para guiar el crecimiento de la membrana ^{89,90}. Beclin1 es importante también en la regulación de la nucleación del autofagosoma ⁹¹. Habitualmente Beclin1 se encuentra interactuando con la proteína Bcl-2 a través de su dominio BH3. En condiciones normales Bcl-2 inhibe a Beclin1, mientras que, en condiciones de estrés, Beclin1 se disocia de Bcl-2, permitiendo la activación de Vps34 y estimulando consecuentemente la autofagia ^{92,93}.

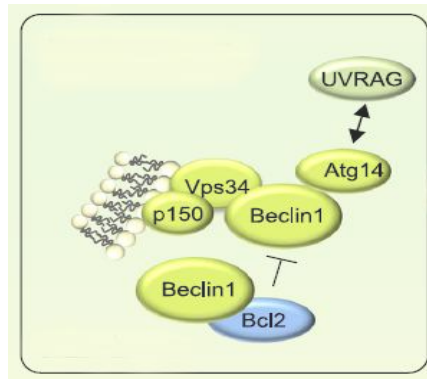


Figura 12. Moléculas claves en la nucleación del fagoforo.

3.1.3 Expansión de la membrana del autofagosoma

Una vez incluida la carga a degradar en las inmediaciones de la membrana, comienza su expansión, que está mediada por dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina.

Sistema de conjugación ATG12-ATG5-ATG16L: ATG12 se activa mediante la unión del residuo Cys 572 de ATG7 por enlace tioéster para, posteriormente, conjugarse con ATG5 a través de un enlace isopeptídico. ATG10 media la formación de este complejo. Más tarde, la unión de ATG16L formará el complejo completo de 350kDa, que es esencial en la formación del pre-autofagosoma. Una vez que éste esté formado, las proteínas ATG se envían de nuevo al citoplasma por un mecanismo desconocido ^{75,94}.

Sistema de conjugación de ATG8: el segundo sistema consiste en la lipidación de LC3, el homólogo mamífero de atg8. LC3 se sintetiza inicialmente como pro-LC3, que se procesa por la cisteín proteasa ATG4 para obtener su forma citosólica LC3-I. Gracias a las proteínas ATG7 y ATG3, LC3-I se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) para obtener LC3-II, que se ancla a las membranas interna y externa del autofagosoma para dirigir específicamente la elongación de las mismas (Figura 13) ^{76,85}. LC3-II permanece ahí hasta la fusión con el lisosoma ⁹⁵. La conversión de LC3-I a LC3-II se considera un marcador de la inducción de la autofagia.

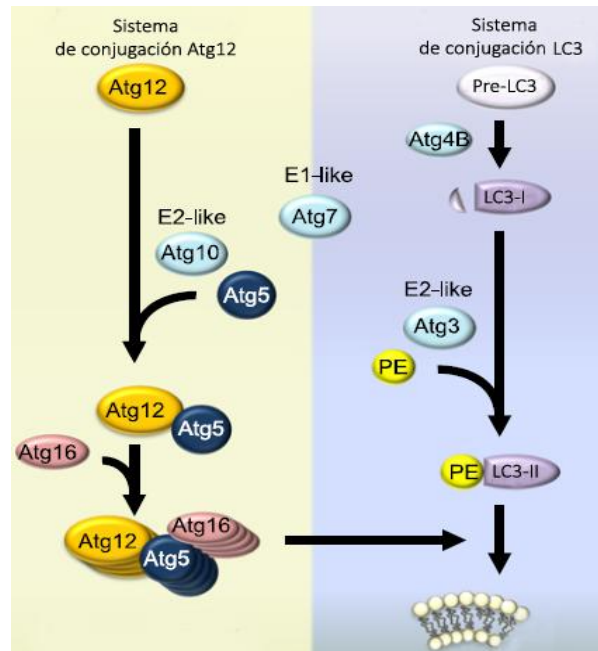


Figura 13. Sistemas de conjugación responsables de la expansión de la membrana.

Además, la proteína ATG9 se ha descrito recientemente como esencial en la expansión de la membrana del autofagosoma al funcionar como transportador para abastecer la membrana emergente. En este proceso están implicados la proteína ATG16L1 y el complejo ATG2-WIPI4 ⁹⁶.

3.1.4 Cierre del autofagosoma, formación del autofagolisosoma y degradación de su contenido

Los mecanismos que conducen al cierre del autofagosoma son poco conocidos, aunque se piensa que podrían estar regulados por las proteínas ATG2A y ATG2B ⁹⁷. Se ha descrito también que otras proteínas, tales como las GTPasas Rab22, Rab24 y Rab7, el análogo mamífero de SNARE (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), VAMP-3 (vesicle-associated membrane protein 3), la proteína NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) ^{75,98} o la maquinaria ESCRT, podrían ser importantes en este proceso ⁹⁹.

Una vez completada la elongación y el cierre de la membrana del autofagosoma alrededor del material celular a degradar, éste se fusiona con un lisosoma para formar el autofagolisosoma. De nuevo, los mecanismos moleculares que llevan a ello aún están por esclarecer. No obstante, se sabe que se requiere de las proteínas de la membrana lisosomal LAMP2, CLN3 y Rab7 ^{74,100,101}, el complejo PI3K de clase III ⁸⁵, así como el sistema ESCRT ¹⁰². Recientemente se ha descrito que la proteína ATG14 (beclin-1-associated autophagy-related key regulator (Barkor) or ATG14L) promueve la fusión mediante la proteína SNARE STX17 ^{103,104}. El citoesqueleto también juega un papel fundamental en esta etapa, ya que se asocia con el autofagosoma y lo mueve hasta alcanzar el lisosoma ^{105,106}.

Una vez formado el autolisosoma, se lleva a cabo la degradación de la carga celular por enzimas hidrolíticas, tales como cisteín proteasas, o las catepsinas B, D o L ¹⁰⁷. Las moléculas

resultantes de la degradación, mayoritariamente aminoácidos, son transportados de vuelta al citosol para la síntesis proteica y el mantenimiento de las funciones celulares ⁷⁷.

3.2 ORIGEN DE LA MEMBRANA EN LA BIOGÉNESIS DEL AUTOFAGOSOMA

A pesar del considerable progreso que se está realizando en la identificación de proteínas implicadas en el proceso de autofagia, las fuentes a partir de las cuales se forma la membrana del autofagosoma aún son desconocidas. Existen tres teorías al respecto. La primera sugiere que la membrana se formaría a partir de muchas fuentes, en lo que se denomina modelo de ensamblaje. Según esta hipótesis la membrana se formaría a partir de depósitos de ATG9 que se transportarían desde el Golgi a los endosomas tardíos ¹⁰⁸. La segunda opción sugiere que la membrana del autofagosoma se formaría fundamentalmente a partir de la de un orgánulo citoplásmico como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, la mitocondria o la propia membrana citoplasmática. A este modelo se le denomina modelo de maduración ^{108,109}. Por último, el modelo combinado afirma que la membrana se formaría originalmente a partir de una membrana preexistente y que durante su maduración recibiría pedazos de otras membranas (Figura 14) ⁸⁵. Se ha identificado una estructura en forma de cáliz, el omegasoma, como una plataforma para la formación del autofagosoma a partir del retículo. Parece que ULK1, LC3 y ATG5 son reclutados por el omegasoma en situaciones de ayuno ¹⁰⁹.

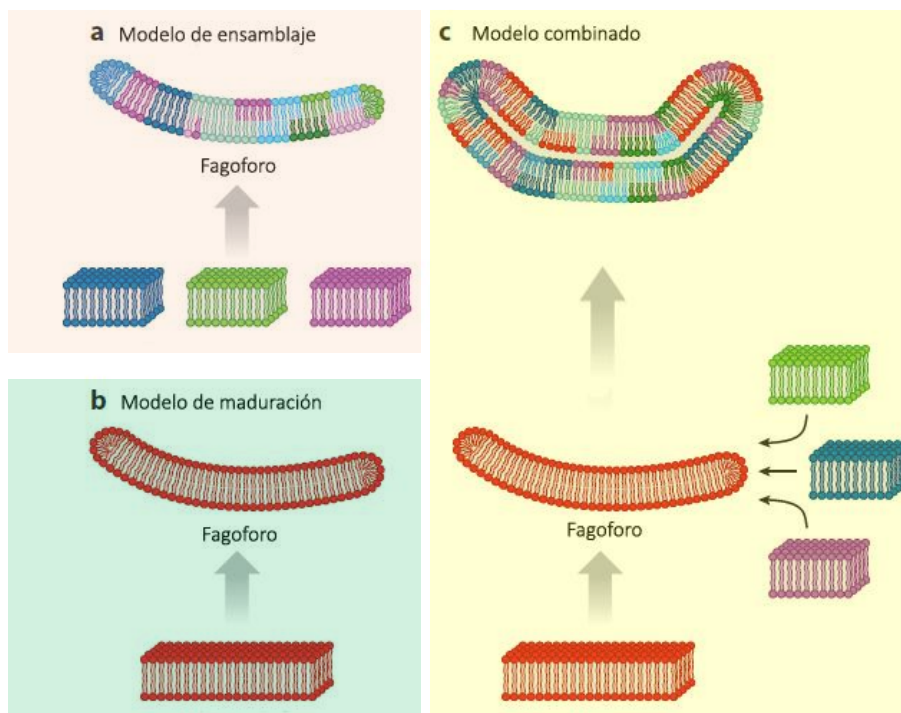


Figura 14. Modelos sobre la biogénesis de la membrana del autofagosoma.

3.3 LA AUTOFAGIA SELECTIVA

Existe evidencia creciente que afirma que la autofagia es un proceso más selectivo de lo que inicialmente se podía anticipar. En la autofagia selectiva se identifica específicamente la carga a degradar, lo que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular. Este tipo de autofagia se caracteriza por la presencia de un cargo específico a degradar, su reconocimiento por parte de un receptor autofágico selectivo y su reclutamiento por la maquinaria molecular del autofagosoma para su degradación final en el lisosoma ¹¹⁰. Los tipos de autofagia selectiva que existen se denominan habitualmente en función del cargo a degradar. Así tendríamos agregafagia para proteínas agregadas, ferritinofagia para ferritina, mitofagia para mitocondrias, REfagia, para el retículo endoplasmático, xenofagia para patógenos externos (Tabla 3) ¹¹¹...

Tabla 3. Tipos de autofagia selectiva y sus receptores.

Vía	Receptores	Sustrato	Tipo
Mitofagia	OPTN, NDP52, TAX1BP1, p62	Mitocondrias	Ubiquitina dependiente
Eliminación de RNA	NDP52, p62	RNA	Ubiquitina dependiente
Pexofagia	NBR1, p62	Peroxisomas	Ubiquitina dependiente
Agregafagia	p62, NBR1, OPTN TOLLIP, Cue5	Agregados proteicos	Ubiquitina dependiente
Xenofagia	p62, OPTN, NDP52, TAX1BP1	Patógenos	Ubiquitina dependiente
Proteafagia	RPN10	Proteasomas	Ubiquitina dependiente
Zimofagia	p62	Zimógeno	Ubiquitina dependiente
REfagia	FAM134B, Atg40	RE	Ubiquitina independiente
Ferritinofagia	NCOA4	Ferritina	Ubiquitina independiente
Pexofagia	Atg30, Atg36	Peroxisomas	Ubiquitina independiente
Mitofagia	NIX, BNIP3, FUNDC1, Atg32	Mitocondrias	Ubiquitina independiente
Agregafagia	OPTN	Agregados proteicos	Ubiquitina independiente
Virofagia	TRIM5 α , SMURF1, p62	Virus	Ubiquitina independiente
Glicofagia	Stbd1	Glucógeno	Ubiquitina independiente
Nucleofagia	Atg39	Envuelta nuclear	Ubiquitina independiente
Lisofagia	Galectin-8/NDP52	Lisosomas	Ubiquitina independiente
Xenofagia	Galectin-8/NDP52	Patógenos	Ubiquitina independiente
Eliminación de ácidos grasos	Atg19, Atg34	Ácidos grasos	Ubiquitina independiente

El proceso de la autofagia selectiva está mediado por proteínas receptoras selectivas que unen físicamente la carga a degradar con la membrana del autofagosoma en formación para su final traspaso al lisosoma, donde se degradarán (Figura 15).

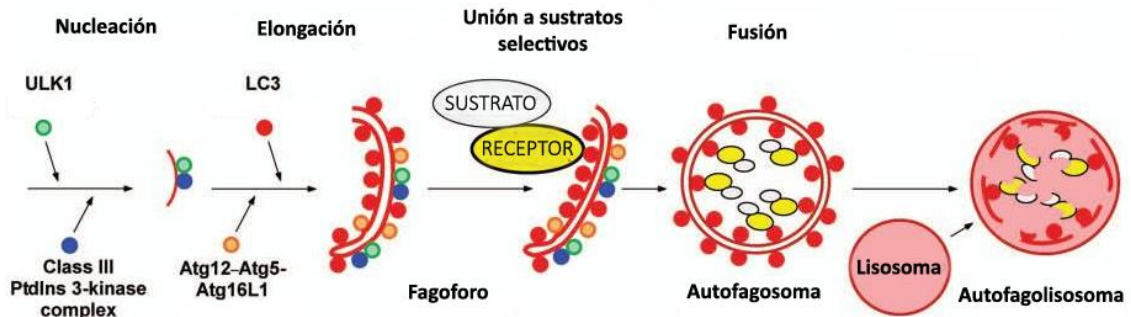


Figura 15. Mecanismo general de autofagia selectiva.

La maquinaria del autofagosoma que reconoce estas proteínas receptoras son las proteínas ATG8. En mamíferos existen seis: LC3A, LC3B, LC3B GABARAP, GABARAP-L1 and GABARAP-L2/GATE-16¹¹², que se encuentran ancladas a la membrana del autofagosoma e interactúan con los receptores a través de la Región de Interacción con LC3 (LIR), también conocida como el Motivo de Interacción con Atg8 (AIM)^{113,114}.

Existen múltiples tipos de receptores selectivos de autofagia, pero se clasifican fundamentalmente en dos grupos: dependientes e independientes de ubiquitina¹¹⁵.

Receptores dependientes de ubiquitina: Son aquellos que, en vez de reconocer directamente al sustrato, reconocen cadenas de poliubiquitina unidas a éste a través de su dominio UBD¹¹⁴. El receptor más estudiado de este tipo es p62/SQSTM1. p62 es una proteína que, además de tener importancia en la autofagia selectiva, es fundamental en la vía de transducción de señales de NFκB¹¹⁶. En su estructura presenta varios dominios, entre los que se incluye un dominio de asociación a ubiquitina (UBA), con el que atrapa a las moléculas de sustrato poliubiquitinadas; un dominio de oligomerización PB1, importante para la agregación de agregados proteicos, y un motivo LIR para la interacción con las proteínas ATG8 (Figura 16)^{113,117}. Mediante esta interacción, p62/SQSTM1 es capaz de unir físicamente el sustrato a degradar con el autofagosoma. Además, p62/SQSTM1 presenta otros dominios como el ZZ, TB y KIR (Figura 16), a través de los cuales es capaz de interactuar con otras proteínas, lo que pone de manifiesto su papel como regulador central en muchos procesos fisiológicos y patológicos¹¹⁶.

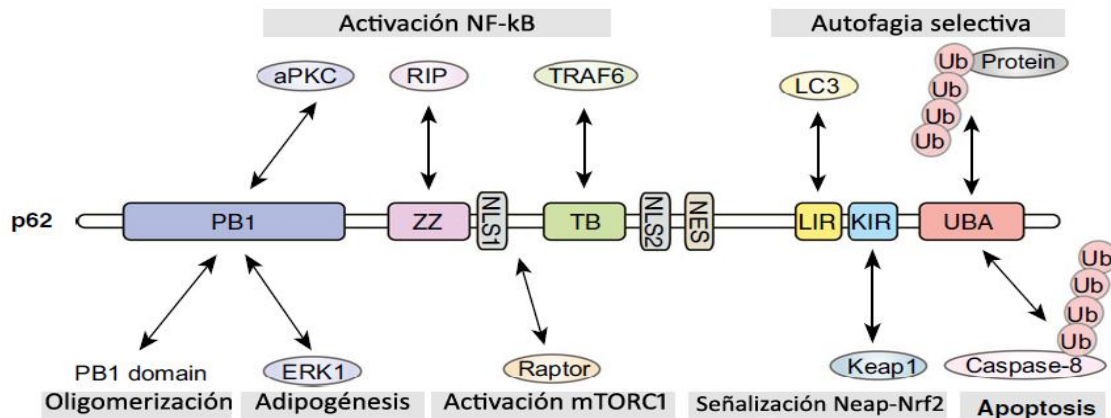


Figura 16. Estructura de p62/SQSTM1.

Parece que p62/SQSTM1 se une preferencialmente a las cadenas de ubiquitina K63, mientras que las K48 son reconocidas por los proteasomas y, por tanto, se degradan allí. Este fenómeno podría suponer un nuevo nivel de regulación de la autofagia selectiva¹¹⁸ y demuestra la función cooperativa del sistema autofagia-lisosoma y el sistema ubiquitina-proteasoma¹¹⁹.

Actualmente se conocen muchos más receptores dependientes de ubiquitina como NBR1, OPTN, TAX1BP1, NDP52/CALCOCO2, TOLLIP y RPN10 (Tabla 3)¹¹¹.

Receptores independientes de ubiquitina: Son aquellos que reconocen directamente el sustrato, sin necesitar que éste esté unido a cadenas de poliubiquitina. En los últimos años se han identificado muchos receptores de este tipo, como NCOA4, que actúa en la ferritinofagia, o la familia FAM134 que participan en la REfagia (Tabla 3)¹¹¹.

3.4 AUTOFAGIA Y CÁNCER

Dependiendo del contexto, la autofagia puede tener un papel citoprotector o citotóxico. No es de extrañar, por tanto, que su desregulación contribuya a la patogénesis de múltiples enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades cardíacas, infecciosas, inflamatorias, neurodegenerativas, envejecimiento, obesidad, diabetes o cáncer⁷⁴.

La relación que existe entre la autofagia y el cáncer es extremadamente compleja debido a que este proceso puede tanto promover como inhibir la tumorigénesis. La explicación más aceptada al respecto sugiere que la autofagia tiene un rol dinámico, pudiendo actuar como supresor tumoral o como pro-tumorigénico, dependiendo de múltiples factores, entre los que se incluyen el estadio tumoral, el contexto celular y el tejido de origen (Figura 17)⁹⁸.

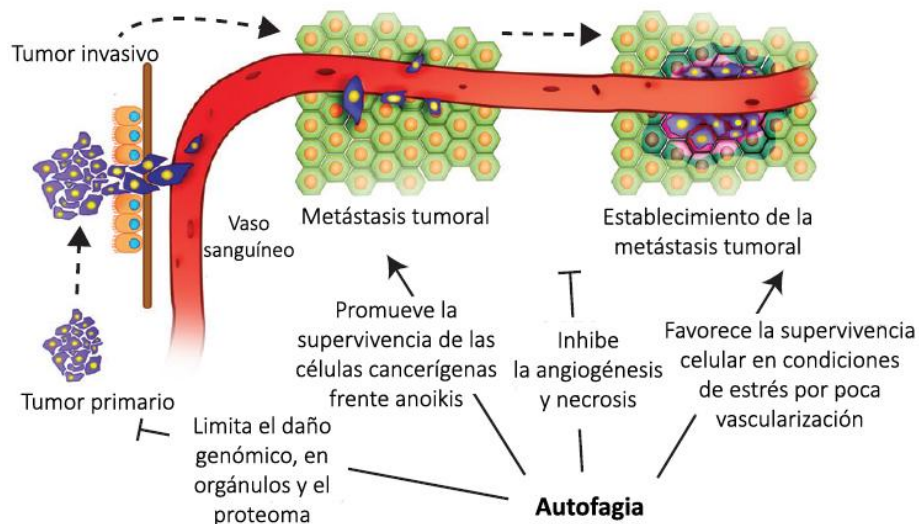


Figura 17. Roles de la autofagia durante la tumorigénesis.

3.4.1 La autofagia como supresor tumoral

Actualmente se piensa que la autofagia tiene un rol supresor en los primeros estadios del desarrollo tumoral y que defectos en el proceso contribuyen a su progresión. De hecho, se ha demostrado que células pre-malignas muestran niveles basales de autofagia más bajos que en células normales ¹²⁰. Además, alteraciones habituales en cáncer, como la amplificación de AKT, mutaciones en PI3K o la pérdida de PTEN, se asocian a una disminución de la autofagia, sugiriendo indirectamente que este proceso previene la transformación oncogénica de las células ¹²¹. Estudios en ratones demuestran que defectos en proteínas de la maquinaria autofágica como ATG5, ATG7 o Beclin1, facilitan la iniciación tumoral ^{120,122}. Asimismo, se han encontrado mutaciones de cambio de fase de lectura en los genes *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9* y *ATG12*, mutaciones puntuales o deleciones en varios reguladores autofágicos y la deleción hemicigota de *BECN1* en un alto número de tumores humanos ¹²³. Además, se ha visto que la supresión de la autofagia resulta en una acumulación de la proteína p62 que contribuye a la oncogénesis ¹²⁴. Los mecanismos por los cuales la autofagia puede proteger frente a la iniciación tumoral son muchos, entre los que se incluye limitar la acumulación de proteínas u orgánulos dañados ¹²⁵, prevenir la inestabilidad genómica ⁸⁰, limitar la inflamación causada por necrosis ¹²⁶, eliminar las especies reactivas de oxígeno que incrementan el daño en el DNA y defectos mitocondriales ¹²⁷, degradar de proteínas necesarias para la proliferación celular o promover la muerte autofágica de la célula ¹²⁰.

3.4.2 La autofagia como promotor de la progresión tumoral

A medida que el tumor aumenta de tamaño, las células cancerígenas suelen sufrir diferentes estreses celulares como hipoxia o falta de nutrientes y factores de transcripción debido a la ausencia de vascularización. Además, tratamientos contra el cáncer como la radioterapia o la quimioterapia crean nuevos estreses celulares al interrumpir vías de señalización o inhibir la angiogénesis. En estas

circunstancias, la autofagia favorece la supervivencia de las células tumorales al proveer a las mismas de energía y nutrientes mediante la degradación de componentes citoplasmáticos y su reciclado. Se ha demostrado que tumores Ras positivos muestran niveles autofágicos más elevados que son cruciales para su desarrollo^{98,128}.

3.5 MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA COMO TRATAMIENTO ANTITUMORAL

De la misma manera que la autofagia tiene una función dual en el desarrollo y la progresión de procesos tumorales, se ha demostrado que tanto su activación como represión pueden ser aproximaciones terapéuticas válidas contra el cáncer. Por una parte, la hiperactivación de la autofagia conduciría a la muerte celular programada de tipo II o muerte autofágica. Este tipo de muerte se diferencia de la apoptosis en que está asociada a un aumento en el número de autofagosomas y es caspasa independiente. Por tanto, tratamientos que activen la autofagia podrían ser particularmente útiles en el caso de tumores resistentes a apoptosis en los que fármacos proapoptóticos no tienen efecto¹²⁹. Por otra parte, una inhibición de la autofagia evitaría su función de mecanismo de supervivencia en células tumorales en situaciones de estrés. Esto podría conducir a las células tumorales a la muerte apoptótica, por lo que se trataría de una aproximación terapéutica válida en tumores sin alteraciones en la ruta de apoptosis¹³⁰.

3.5.1 Activadores autofágicos

Entre los fármacos activadores de la autofagia destacan los inhibidores de mTOR. mTOR es un represor clave de la ruta, por lo que su inhibición activaría el proceso. El más habitual de estos inhibidores es la rapamicina o sus derivados¹³¹. No obstante, la represión de mTOR activaría AKT, por lo que se podrían contrarrestar los efectos antitumorales. Una terapia combinada de inhibidores de mTOR y AKT podría mejorar el resultado¹³². mTOR también se inhibe al inducir AMPK. Es el caso de fármacos como la metformina, un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, que provoca una disminución de la cantidad de ATP e incrementa AMPK, inhibiendo, por tanto, mTOR y activando la autofagia¹³¹. Existen, además, fármacos citotóxicos que inducen la autofagia en células tumorales. Un ejemplo es la temozolamida, utilizada en el tratamiento de glioblastoma. Otros activadores autofágicos son los inductores de estrés de retículo endoplasmático o inductores de inanición, inhibidores PI3K clase I, inhibidores tirosina quinasa, inhibidores de proteasoma, inhibidores de la inositol monofosfatasa y inhibidores de histona desacetilasas como Panobinostat® (Figura 18)^{120,133}.

3.5.2 Inhibidores autofágicos

La inhibición de la autofagia ha sido estudiada en más profundidad que su modulación positiva. Los inhibidores de los primeros estadios del proceso actúan fundamentalmente sobre PI3K de clase III. El primer inhibidor identificado de este tipo fue 3-MA, aunque actualmente se conocen más, como LY294002 y wortmannin¹³³. Sin embargo, la homología entre PI3K de clases I y III hace

que muchas veces estos compuestos induzcan también la autofagia. Recientemente se ha descrito el compuesto Spautin-1, que causa la degradación del complejo PI3K de clase III actuando directamente sobre Beclin1 al evitar que las proteasas UPS10 y UPS13 desubiquiten esta proteína¹³¹. La mayoría de inhibidores de autofagia actúan en etapas más tardías del proceso. Un ejemplo son los inhibidores ATPasa de tipo vacuolar, que evitan la autofagia en la etapa de maduración al inhibir la acidificación de lisosomas y endosomas. Es el caso de la bafilomicina A1. Los inhibidores de microtúbulos como vinblastina, nocodazol o paclitaxel también actúan sobre etapas tardías de la autofagia al evitar la fusión del autofagosoma y el lisosoma¹³⁴. Los agentes alcalinizantes del lumen lisosomal como la cloroquina también bloquean la autofagia¹²⁹. En este caso aumentan el pH del lisosoma, inhibiendo la actividad de las hidrolasas y del autofagolisosoma en última instancia. No obstante, recientemente se ha descrito que la cloroquina también puede inducir autofagia al inhibir mTORC1¹³⁵. Hasta el momento la cloroquina ha sido usada como fármaco antimalaria y para el tratamiento de la artritis reumatoide, aunque estudios preclínicos y clínicos demuestran que es un fármaco antitumoral prometedor¹³¹. Inhibidores de la proteólisis lisosomal como las leupeptina y la pepstatina también alteran la etapa autofágica de digestión lisosomal (Figura 18)^{120,136}.

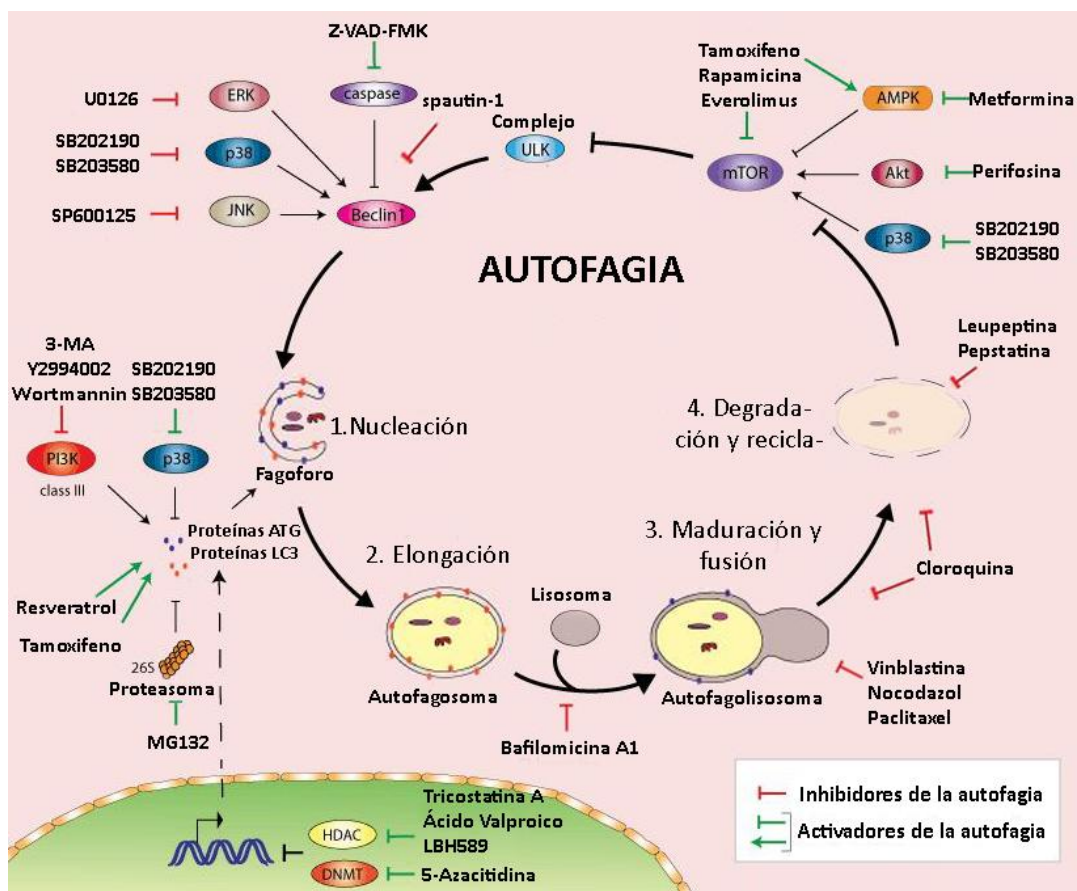
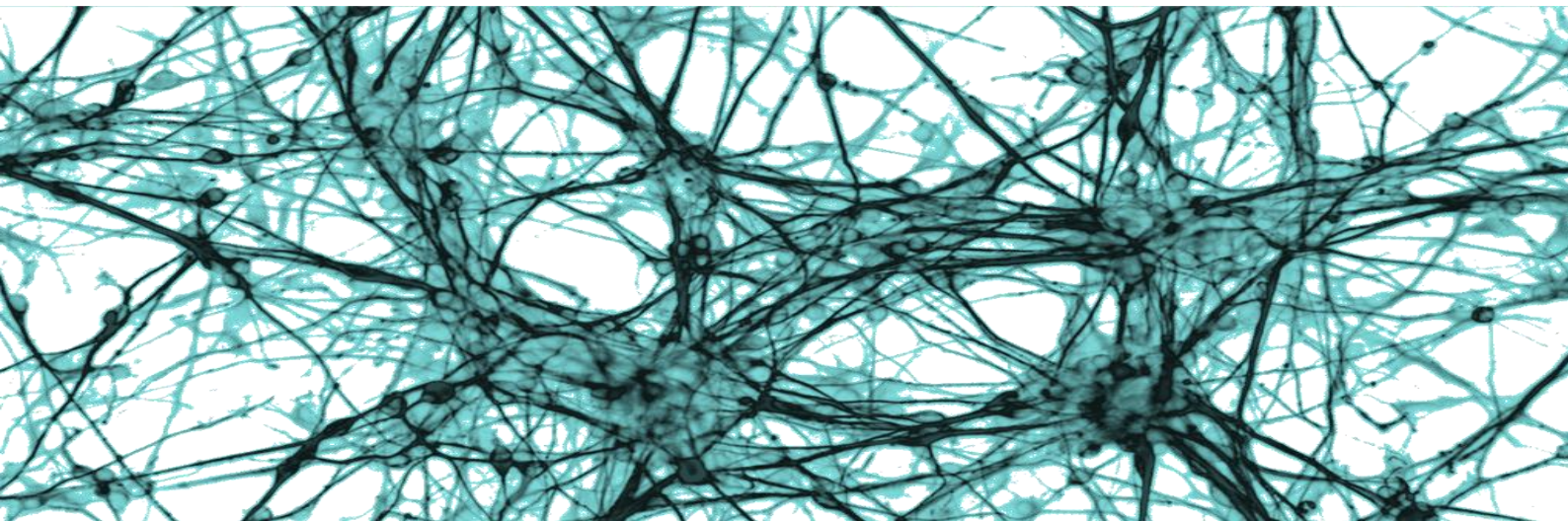


Figura 18. Esquema de algunos moduladores de autofagia y la etapa en la que actúan.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



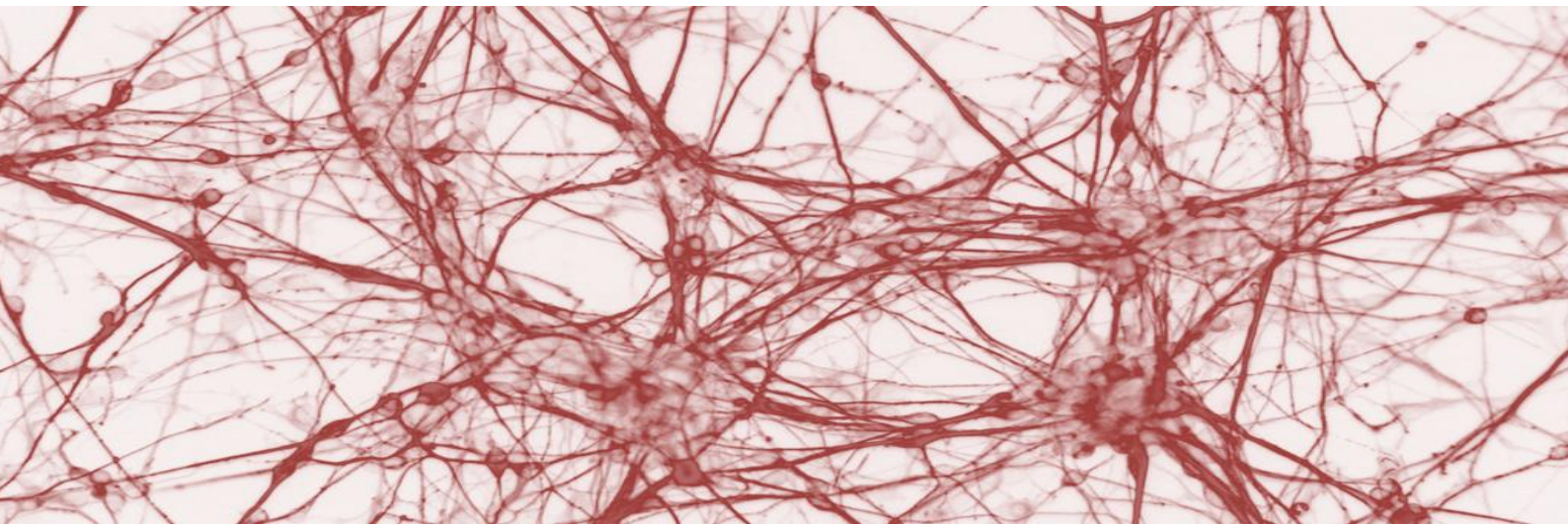
El glioblastoma multiforme (GBM) es uno de los tumores humanos más letales, con una media de supervivencia de 12-14 meses en tratamiento estándar de cirugía, radioterapia y quimioterapia con temozolamida ^{36,37}. Se trata de un astrocitoma de grado IV heterogéneo caracterizado por una proliferación celular incontrolada, elevada capacidad de infiltración, angiogénesis robusta, resistencia a la apoptosis, propensión al desarrollo de focos necróticos y alta inestabilidad genómica ³⁹.

La autofagia es un sistema de degradación intracelular altamente regulado por el cual proteínas de larga vida y orgánulos son absorbidos por vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas y transportados hasta el lisosoma, donde serán degradados. Tras esto, las macromoléculas resultantes son trasladadas al citosol para su reciclaje ^{77,78}.

Se sabe que la autofagia desempeña un papel importante en el desarrollo de enfermedades, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias, diabetes y cáncer ⁷⁴. Por todo ello, nuestra hipótesis inicial fue que la autofagia podría estar relacionada específicamente con el desarrollo y la evolución del glioblastoma multiforme y podría ser considerada una nueva diana terapéutica para esta enfermedad. Para probarlo, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Determinar si variantes alélicas de algunos genes implicados en la ruta de autofagia podrían estar relacionados con el riesgo a padecer glioblastoma multiforme.
- 2- Analizar la expresión de proteínas de la maquinaria autofágica en pacientes con glioblastomas y astrocitomas de bajo grado para, de esta manera, profundizar en el conocimiento del proceso de autofagia y determinar posibles biomarcadores pronósticos y diagnósticos de dichos tumores.
- 3- Analizar el efecto de los fármacos Panobinostat[®], cloroquina, metformina, paclitaxel, y las sinergias Panobinostat[®] + cloroquina, 5-aza-2'-desoxicitidina + cloroquina y 5-aza-2'-desoxicitidina + metformina en líneas tumorales de glioblastoma multiforme para determinar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de este tumor.

***MATERIAL Y
MÉTODOS***



1. PACIENTES

Para la realización de este trabajo se han analizado muestras de tejido tumoral de 91 pacientes diagnosticados de tumores primarios de SNC procedentes del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca y del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Son Espases de Mallorca. Las muestras se obtuvieron por extirpación quirúrgica y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. La población de estudio estaba compuesta por 2 astrocitomas pilocíticos, 24 astrocitomas difusos de bajo grado y 68 glioblastomas multiformes, todos ellos diagnosticados de acuerdo a la clasificación propuesta por la OMS para los tumores de SNC ²⁸. La recogida de las muestras tuvo lugar entre los años 2001 y 2014, y se ha seguido el tratamiento y evolución de los pacientes desde el momento del diagnóstico hasta la actualidad.

Para la realización de los estudios de asociación de polimorfismos de genes relacionados con la autofagia se han analizado muestras de DNA extraído de sangre periférica de 174 pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme. Dichas muestras procedían del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca, del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Son Espases de Mallorca y del Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Valladolid. Como grupo control se analizaron muestras de DNA de sangre periférica de 264 individuos mayores de 60 años que no tenían historia personal ni familiar de cáncer. En todos los casos las muestras se obtuvieron mediante venopunción antecubital, se recogieron en tubos de 10mL con EDTA y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Todas las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca, del Hospital Universitario Son Espases y del Hospital Universitario de Valladolid.

2. LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Las cuatro líneas celulares usadas en este trabajo se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Líneas celulares utilizadas y resumen de sus mutaciones.

Línea celular	ATCC® No	Tipo tumoral	Tumorigénica	Genes mutados	Mutaciones
T98G	CRL-1690™	GBM	No	PTEN	c.125T>G; p.L42R
A172	CRL-1620™	GBM	No	CDKN2A	c.1_471del471
				PTEN	c.165_1212del1048; p.R55fs*1
LN18	CRL-2610™	GBM	Sí	p53	c.713G>C; p.C238S
				CDKN2A	c.1_471del471
LN229	CRL-2611™	GBM	Sí	p53	c.293C>T; p.P98L
				CDKN2A	(c.1_471del471)

3. FÁRMACOS

En este trabajo se han utilizado cinco fármacos diferentes: Panobinostat[®], cloroquina, metformina, paclitaxel y 5-aza-2'-desoxicitidina.

Panobinostat[®] (LBH589) (Novartis Pharmaceuticals): este compuesto fue proporcionado por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Se preparó a partir de un stock de 1mM usando como vehículo DMSO. Fue utilizado a las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM.

Cloroquina (Sigma-Aldrich): se preparó una solución de 50mM del fármaco disolviendo la droga en polvo en d_4H_2O al 0,5% de DMSO. Se usaron las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125 μ M.

Metformina (Sigma-Aldrich): se preparó disolviendo la pastilla comercial de la casa en 50ml de d_4H_2O . A partir de ese stock se prepararon las concentraciones del estudio: 0.5, 1, 2.5, 5, 6.5 y 8mM.

Taxol[®] (Paclitaxel) (Teva Genéricos Española S.L.): a partir de un stock se prepararon para el trabajo las concentraciones de 5, 10, 20, 35, 50 y 75nM.

Decitabina[®] (5-aza-2'-desoxicitidina) (Sigma-Aldrich): a partir de un stock de 50 μ M en ácido acético se prepararon las concentraciones del estudio: 0.5, 1, 2, 3 y 6 μ M.

El experimento de sinergia Panobinostat[®] y cloroquina se realizó manteniendo fija la concentración de cloroquina a 25 μ M y combinándola con 10, 25, 50, 75, 100nM de Panobinostat[®].

El experimento de sinergia de 5-aza-2'-desoxicitidina y cloroquina se realizó manteniendo fija la concentración de cloroquina a 25 μ M y combinándola con 0.5, 1, 2, 3 y 6 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina.

El experimento de sinergia 5-aza-2'-desoxicitidina y metformina se realizó manteniendo fija la concentración de metformina a 8mM y combinándola con 0.5, 1, 2, 3 y 6 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina.

4. ANTICUERPOS

En este trabajo se han utilizados nueve anticuerpos primarios diferentes, dos anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) y dos anticuerpos secundarios unidos a una molécula fluorescente. Todos ellos se detallan a continuación (Tabla 5).

Tabla 5. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot e inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Concentración WB	Concentración IF	Casa comercial	Tamaño proteína (KDa)
Anti-LC3B	Primario	Conejo	1:1000	1:200	Novus Biologicals (NB600-1384)	17 (LC3-II) y 19 (LC3-I)
Anti-p62	Primario	Conejo	1:2000	1:200	Abcam® (ab109012)	62
Anti-mTOR	Primario	Conejo	1:2000	1:300	Cell signaling (#2972)	289
Anti- α Tubulina	Primario	Ratón	-	1:200	Sigma-Aldrich (T6199)	
Anti-Beclin1	Primario	Ratón	1:2000	-	Abcam® (ab114071)	70
Anti-PI3KCA	Primario	Conejo	1:1000	-	Abcam® (ab40776)	110
Anti-TRAF6	Primario	Conejo	1:8000	-	Abcam® (ab3915)	58
Anti- PKC ζ	Primario	Conejo	1:2000	-	Abcam® (ab59364)	68
Anti- β -actina	Primario	Ratón	1:10000	-	Sigma-Aldrich	42
Anti-Rabbit (HRP)	Secundario	Cabra	1:10000	-	Millipore (AP307P)	
Anti-Mouse (HRP)	Secundario	Cabra	1:10000	-	GE Healthcare (NXA931)	
Anti-Rabbit (Alexa Fluor® 594)	Secundario	Cabra	-	1:400	Molecular Probes® Invitrogen™ (A11037)	
Anti-Mouse (Alexa Fluor® 488)	Secundario	Burro	-	1:400	Molecular Probes® Invitrogen™ (A21202)	

5. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo en las muestras de sangre periférica, en las muestras de tejido tumoral y en líneas celulares sin tratar.

5.1 Extracción de DNA a partir de sangre periférica

Para la extracción de DNA a partir de sangre periférica, se aisló la interfase de células nucleadas mediante centrifugación repetida y lisis osmótica de los eritrocitos con d_4H_2O estéril. El botón celular, que contiene únicamente las células nucleadas, se resuspendió en tampón Fornace (0.25M Sacarosa, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM KCl, 5mM $MgCl_2$) y se centrifugó a 15000r.p.m. 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió nuevamente en tampón Fornace, al que se le añadió EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10mM pH 8.0 para posibilitar la inactivación de las nucleasas, 50 μ g/ml de proteinasa K (ApliChem) para degradar las proteínas y SDS (dodecilsulfato sódico) a una concentración final del 1% para romper las membranas celulares. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas. Tras ello se procedió a la extracción y purificación del DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8.0 y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y se sometió a centrifugación para separar las fases. El DNA atrapado en la fase acuosa se limpió de otros

residuos celulares mezclándolo con CIAA y centrifugándolo nuevamente para separar las fases. Tras esto, se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa para precipitar el DNA. Tras un lavado con etanol al 70%, finalmente se resuspendió en 200 μ l d_4 H₂O estéril.

5.2 Extracción de DNA a partir de tejido tumoral

En el caso del tejido tumoral, se tomaron muestras de 100-200mg y se homogeneizaron en tampón Fornace con el homogeneizador *Polytron*[®] *System* PT 1200 E, (Thermo Fisher Scientific). Una vez homogeneizado el tejido se añadió EDTA, proteinasa K y SDS siguiendo el mismo procedimiento que para la extracción de DNA a partir de sangre periférica.

5.3 Extracción de DNA a partir de líneas celulares

En el caso de las líneas celulares, las células se recogieron de las placas de cultivo usando 1.5ml del agente de disociación TrypLE 1X (Gibco), se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500r.p.m. tres minutos. El precipitado celular se resuspendió en tampón Fornace, EDTA, proteinasa K y SDS, siguiendo el mismo procedimiento que para la extracción de DNA a partir de sangre periférica.

La concentración de DNA de las muestras en todos los casos se determinó en un espectrofotómetro *NanoDrop*[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific) midiendo la absorbancia de la muestra a 260nm. Además, el cociente entre las absorbancias A260/A280 permitió determinar el grado de pureza de las muestras, estando los valores adecuados comprendidos entre 1.8-2.0. Si en algún caso la relación se salía de ese margen se procedió a realizar una nueva purificación del DNA, ya que esto indicaría la presencia de proteínas o solventes orgánicos si los valores son inferiores, mientras que valores superiores indicarían un exceso de RNA.

Todas las muestras de DNA se almacenaron en tubos Eppendorf[®] a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como una posible contaminación.

6. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR

Las muestras de DNA obtenidas a partir de tejido tumoral fueron amplificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las reacciones de amplificación se llevaron a un volumen final de 25 μ l utilizando 12.5 μ l del sistema PCR Master Mix 2X (Promega) (22mM tris-HCL a pH 8.4, 55mM KCl, 1.65mM de MgCl₂, 220 μ M de dNTP, y 22U de Taq DNA polimerasa), 9.5 μ l de agua libre de nucleasas, 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) a una concentración final de 0.5 μ M cada uno y 1 μ l de DNA molde a concentración de 100ng/ml. Como control negativo se preparó en paralelo un tubo de reacción con todos los componentes excepto DNA.

Los oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de la región promotora del gen TERT se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de la región promotora del gen TERT, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Oligonucleótido Forward (5'-3')	Oligonucleótido Reverse (5'-3')	Tamaño PCR (bp)	Tª anillamiento
GGCCGATTTCGACCTCTCT	AGCACCTCGCGGTAGTGG	489	66°C

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (Life Technologies-Invitrogen) utilizando un programa de PCR convencional adaptado a la temperatura de anillamiento de la pareja de oligonucleótidos (Figura 19).

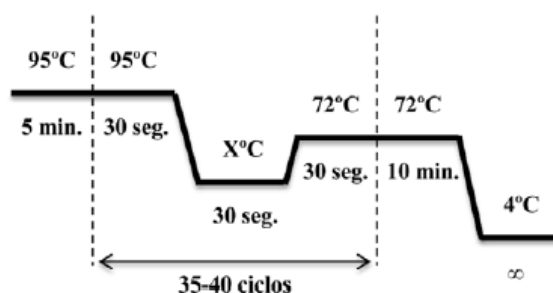


Figura 19. Programa de amplificación estándar utilizado donde X es la temperatura de anillamiento específica de cada pareja de oligonucleótidos.

7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño molecular mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5X (Tris 0.045M, ácido bórico 0.045M, EDTA 1.0mM pH 8.0). Las muestras migraron en paralelo con un marcador de tamaño molecular derivado del DNA del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII que genera fragmentos de los siguientes tamaños: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb. La migración del DNA en el gel se monitorizó utilizando dos colorantes incluidos en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5Kb. Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron utilizando SYBR® Safe DNA Gel Stain (1/10000) (Invitrogen, Life Technologies), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emite fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254nm). Los resultados obtenidos fueron capturados gracias a un sistema de fotografía digital acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (KODAK iD software v3.5.4, Kodak).

8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

La purificación de los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación fue realizada usando PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Para la secuenciación automática, las muestras se prepararon a una concentración de 40-60ng de DNA purificado con 3pmol del oligonucleótido sentido o antisentido correspondiente, llevado a un volumen final de 8 μ L. La reacción de secuenciación por Sanger se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI PRISM 377 *DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Inc.) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, usando el kit *BigDye Terminator*[®] v.3.1.

La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó con ayuda del programa *Chromas lite 2.01* (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) (Figura 20). La homología con las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) se realizó con el programa *BLAST* de los servidores: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start> y <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

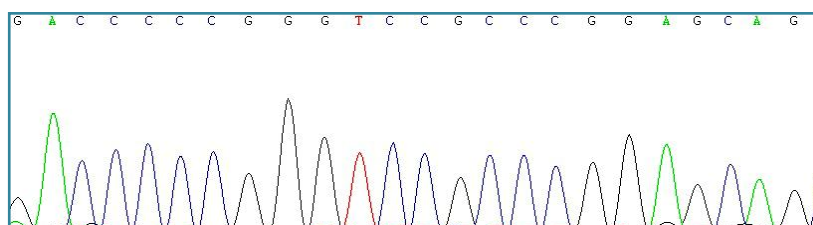


Figura 20. Secuencia correspondiente al promotor de TERC

10. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN[™]

La identificación de polimorfismos de genes relacionados con la autofagia se llevó a cabo mediante discriminación alélica con sondas TaqMan[™].

Esta técnica de amplificación en cadena se basa en la fluorescencia emitida por sondas específicas marcadas con fluorocromos. Dichas sondas son oligonucleótidos que hibridan específicamente con cada alelo y están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor ("*quencher*") en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando la sonda está intacta y ambos se encuentran próximos. Las sondas empleadas en nuestro trabajo estaban marcadas con los fluorocromos VIC y FAM para cada alelo (Tabla 7).

Tabla 7. Moléculas fluorescentes utilizadas en la amplificación con sondas Taqman[™].

Fluorocromo	Máx. λ_{abs} (nm)	Máx. λ_{em} (nm)
VIC	538	55
FAM	495	435

Durante la amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la DNA polimerasa, que tiene actividad 5'-3' exonucleasa, al desplazarse a lo largo de la cadena, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Al quedar separados los fluorocromos donador y el aceptor, se emite fluorescencia.

La reacción de PCR requiere además los mismos componentes que una reacción de PCR convencional (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y oligonucleótidos *forward* y *reverse*) y se lleva a cabo en termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia. En nuestro caso la reacción de genotipado se llevó a cabo con el sistema *TaqMan Genotyping Master Mix 2x* (Applied Biosystems), en un volumen final de 10µL, y se realizó en el equipo *Step One Plus Real Time PCR™* (Applied Biosystems) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Los polimorfismos analizados mediante esta técnica de detallan en la tabla 8.

Tabla 8. SNPs estudiados en este trabajo de genes relacionados con la autofagia.

GEN	SNP ID	REFERENCIA COMERCIAL	CAMBIO EN EL DNA	CAMBIO EN LA PROTEÍNA	SONDA VIC	SONDA FAM
ATG2B	rs3759601	C_9690160_20	4512C>G	p.Q1383E	C	G
ATG5	rs2245214	C_3001905_20	C>G (Intrón)	-	C	G
ATG10	rs1864183	C_11953871_10	929C>T	p.T212M	C	T
ATG16L1	rs2241880	C_9095577_20	1153A>G	p.T300A	A	G
NOD2	rs2066844	C_11717468_20	2209C>T	p.R702W	C	T
NOD2	rs2066845	C_11717466_20	2829C>G	p.R908G	C	G

Los resultados de este análisis muestran generalmente tres nubes de puntos diferenciados correspondientes al genotipo de cada una de las muestras analizadas (Figura 21).

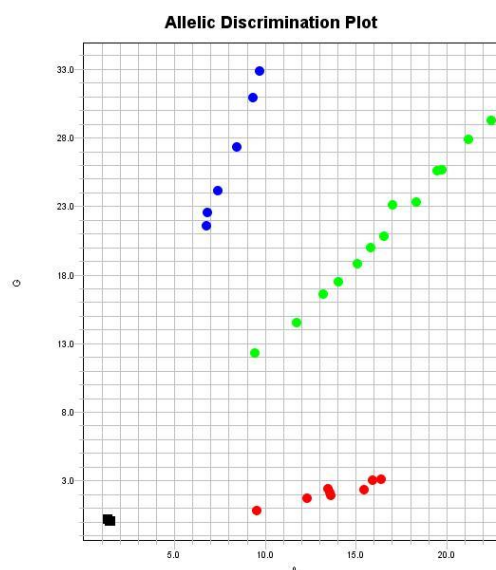


Figura 21. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas Taqman™ del polimorfismo del gen *ATG16L1* rs2241880. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son los homocigotos GG, los verdes los heterocigotos AG y los rojos los homocigotos AA.

11. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Todas las líneas celulares usadas en este trabajo fueron cultivadas en un incubador (Cultek S.L.U.) a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Para su cultivo se utilizó medio completo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich) con glucosa (4.5g/l), L-glutamina y L-piruvato. Además, dicho medio se suplementó con los antibióticos penicilina y estreptomina al 1% y suero fetal bovino (FBS) al 10% (Invitrogen, Life Technologies).

12. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

El crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con los compuestos por separado y en sinergia en las líneas celulares de glioblastoma usadas en este trabajo se evaluó mediante el ensayo de viabilidad MTT¹³⁷. Esta técnica consiste en el marcaje de células metabólicamente activas con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Se trata de compuesto de color amarillento que, al ser reducido por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) celular, da lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul oscuro, el formazán. El formazán se solubiliza con DMSO y, posteriormente, se mide la intensidad de color con un espectrofotómetro, lo que permite determinar la tasa de proliferación. La absorbancia se correlaciona con el color e, indirectamente, con la cantidad de células en cultivo metabólicamente activas.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron un total de 10.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se las dejó crecer toda la noche. Tras esto, se sustituyó el medio por uno nuevo con diferentes concentraciones de fármaco, dejando siempre células sin tratamiento como control. A continuación se incubaron las placas multipocillo durante 24, 48, o 72 horas, utilizando también una placa previa (tiempo 0) sin ningún tipo de fármaco como control. Una vez transcurridos los tiempos se añadió a cada pocillo 1mg/ml de MTT y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras esto, se eliminó el medio y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán depositados en cada pocillo. La absorbancia de los mismo se determinó en el lector de microplacas *UltraEvolution* (Tecan®) a 570nm.

13. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

El estudio del ciclo celular en las distintas líneas celulares de glioblastoma se realizó cuantificando el contenido de DNA de éstas por citometría de flujo. Para ello, las células fueron tratadas con las distintas concentraciones de los compuestos suministrados en medio completo DMEM durante 24, 48 y 72h respectivamente, tomando un tiempo 0 como control. Tras la exposición a los compuestos, las células tratadas se recogieron y se fijaron en etanol 70% helado. Una vez fijadas, se lavaron repetidamente con PBS para eliminar los residuos de etanol, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 3 minutos. Después, se añadió a cada muestra 0.05% de RNAasa A y 7.5µl de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y los tubos se incubaron a temperatura

ambiente toda la noche. Tras esto, las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), cuantificando el DNA de un total de 30000 células por muestra.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa asociado al citómetro CellQuest Pro® (BD Bioscience). Este programa proporciona un gráfico para cada muestra en el que se representa la cantidad de DNA, que es proporcional a la cantidad de yoduro de propidio, en abscisas y el número de células en ordenadas (Figura 22). Tras esto, los archivos fueron analizados con el programa WINMDI 2.9., el cual permite hacer una discriminación y cuantificación del número de células en cada estado del ciclo celular.

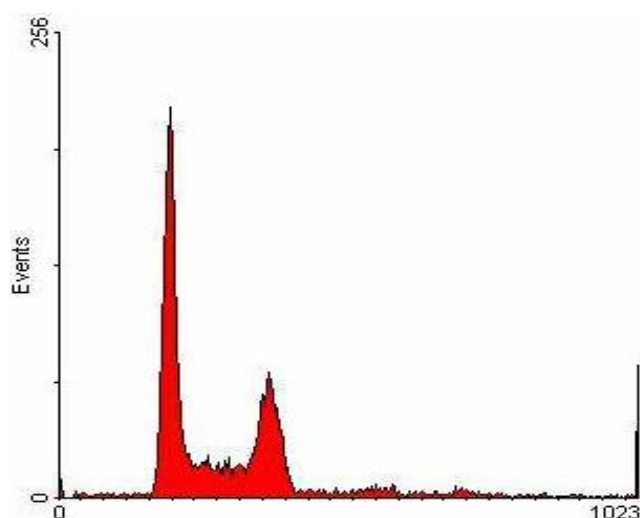


Figura 22. Gráfico de citometría de flujo que representa las diferentes etapas del ciclo celular y la cantidad de células que se encuentra en cada una de ellas.

En todos los casos se realizaron dos réplicas de cada experimento para verificar los resultados.

14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas se llevó a cabo en las muestras de tejido tumoral y en líneas celulares tratadas y sin tratar.

14.1 Extracción de proteínas a partir de tejido tumoral

En el caso del tejido tumoral, se tomaron muestras de 100-200mg y se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA (1% Igepal, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS en PBS 1X) suplementado con inhibidor de proteasas Api (pepstatina A, aprotinina y leucopeptina) con ayuda del homogeneizador *Polytron® System PT 1200 E*, (Thermo Fisher Scientific). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C en agitación y se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C, trasladando el sobrenadante,

que es el que contiene el extracto proteico total, a un nuevo tubo Eppendorf® y almacenándolo a -80°C.

14.2 Extracción de proteínas a partir de líneas celulares

En el caso de las líneas celulares, las células se recogieron de las placas de cultivo usando 1.5ml del agente de disociación TrypLE 1X (Gibco), se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500r.p.m. tres minutos. Los precipitados se incubaron durante 30 minutos con buffer de lisis en frio y en agitación (NaCl 140mM, EDTA 10mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris 20mM pH 8.0), al que se le añadieron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1mM, pepstatina 1µM, aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1µg/ml y ortovanadato sodico 1mM. Tras centrifugar los tubos durante 10 minutos a 4°C y 12000 r.p.m. se transfirieron los sobrenadantes resultantes a un nuevo tubo Eppendorf® y se almacenaron a -80°C.

15. WESTERN BLOT

Mediante esta técnica analizamos la expresión de las proteínas LC3B, p62/SQSTM1, TRAF6, PKCz, mTOR, Beclin1 y PI3KCA. Para ello, las muestras de proteína total se prepararon mezclando 200µg de cada extracto proteico con tampón de carga (Tris 100mM pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 2% β- mercaptoetanol) y se desnaturalizaron durante 5-10 minutos a 100°C en un baño seco. Tras esto, se procedió a la carga de las muestras en geles SDS-PAGE para su separación en función del tamaño mediante electroforesis vertical con minigeles discontinuos (*Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) siguiendo el protocolo de Laemmli¹³⁸. El gel separador se preparó a un porcentaje de acrilamida adecuado al tamaño de las proteínas a separar (8-12% acrilamida/bis-acrilamida 30%) (BioRad) en tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y SDS al 10%. Encima del gel separador, se preparó un gel concentrador al 4% acrilamida/bis acrilamida 30% en tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y SDS al 10%. Para la polimerización de los geles se utilizó AMPS (persulfato de amonio) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina).

La electroforesis se realizó a 150 voltios en condiciones desnaturalizantes en tampón de electroforesis (Tris 20mM, Glicina 192mM y SDS al 1%) y como marcador de peso molecular se utilizó el marcador *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (Thermo Fisher Scientific).

Una vez separadas por tamaño, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF *Immobilon-P* (Millipore Corporation) utilizando el sistema de transferencia semiseca TRANS BLOT® SD (BioRad) durante 45 minutos a 15 voltios en tampón 25mM Tris-HCl pH 8.5, 192mM Glicina y 20% metanol. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (0.1 % Tween-20 en TBS) para saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés a la dilución adecuada (Tabla 5) en TBS-T con BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) al 3% toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con TBS-T en

agitación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados de la membrana con TBS-T, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), según las especificaciones del fabricante y se expuso la membrana a películas fotosensibles de autorradiografía (FUJIFILM) para la detección de proteínas (Figura 23).

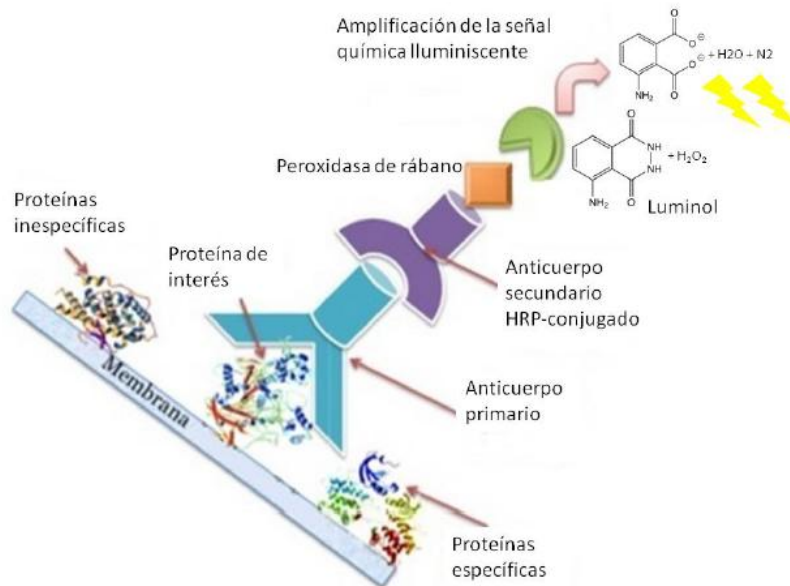


Figura 23. Fundamento teórico del Western blot.

Los fragmentos correspondientes a las proteínas de interés se cuantificaron usando el programa de análisis de imagen ImageJ.

16. INMUNOFLUORESCENCIA

Para poder observar la distribución celular y la expresión de proteínas en células tumorales tratadas con paclitaxel, se realizó un experimento de inmunofluorescencia.

Para llevar a cabo esta técnica se sembraron 175000 células de las líneas celulares A172 y LN229 en placas de 6 pocillos y se las dejó crecer toda la noche. Cada pocillo contenía 3 cristales cubreobjetos. Tras haber crecido, se reemplazó el medio por medio nuevo con paclitaxel 5nM, a excepción de un pocillo por línea celular y proteína de estudio que se utilizó como control sin tratamiento. Las placas se incubaron 72 horas. Tras este tiempo, se lavaron las células con PBS para eliminar el medio de cultivo y se fijaron con 1ml/pocillo de formaldehído al 37% diluido en PBS durante 10 minutos en hielo. Se eliminó el formaldehído y se precedió a lavar los pocillos tres veces con PBS, tras lo cual las células se permeabilizaron añadiendo 1ml/pocillo de Tritón-X-100 (IBI Scientific) al 0.5% durante 10 minutos en hielo. Tras lavar con PBS se añadió a cada pocillo 2ml de

solución de bloqueo preparada con BSA al 10% en PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, los cristales cubreobjetos se trasladaron a cámaras húmedas y se rociaron con 30 μ l de anticuerpo primario preparado con BSA al 3% en PBS usando las concentraciones especificadas en la tabla 5. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente y atmósfera húmeda durante hora y media. Transcurrido ese tiempo, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con 30 μ l de anticuerpo secundario preparado en BSA al 1% de PBS en las cámaras húmedas durante una hora y media y semioscuridad. Tras eso, se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron 5 minutos con DAPI (Roche) 1:2000 en d_0 H₂O para la tinción de los núcleos celulares. Por último, se lavaron las células y se colocó cada cubreobjetos sobre un portaobjetos usando la solución Moviol (Sigma-Aldrich) que actúa como pegamento. Las células se visualizaron en un microscopio confocal LEICA SP5 modelo DMI 6000B con el software asociado LEICA LAS AF y se capturaron las imágenes necesarias con una cámara conectada a dicho microscopio (Figura 24).

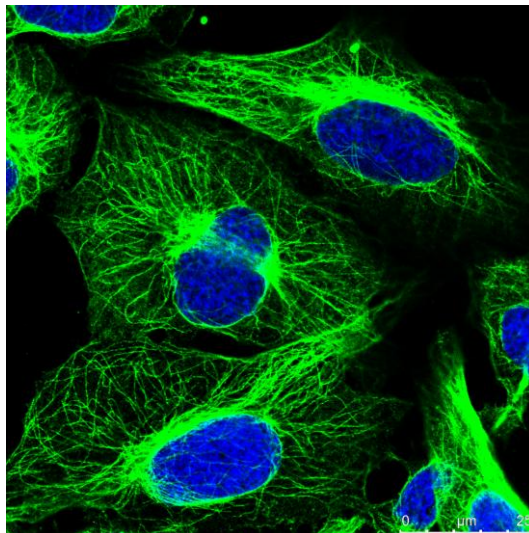


Figura 24. Imagen de la línea celular LN229 marcada con un anticuerpo secundario fluorescente frente al anticuerpo anti- α Tubulina. El núcleo está marcado con DAPI.

17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los distintos experimentos se analizaron usando el software *IBM SPSS Statistics 23.0.0.0*.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas. En el caso de las variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría, y en las variables cuantitativas se calculó la mediana y el rango intercuartílico.

La relación entre las distintas variables clínicas y moleculares se analizó mediante la elaboración de tablas de contingencia y el test χ^2 de Pearson. En los casos en los que la frecuencia de alguno de los grupos fue menor del 5%, se empleó el test exacto de Fisher. La correlación entre proteínas se determinó mediante el test de Spearman.

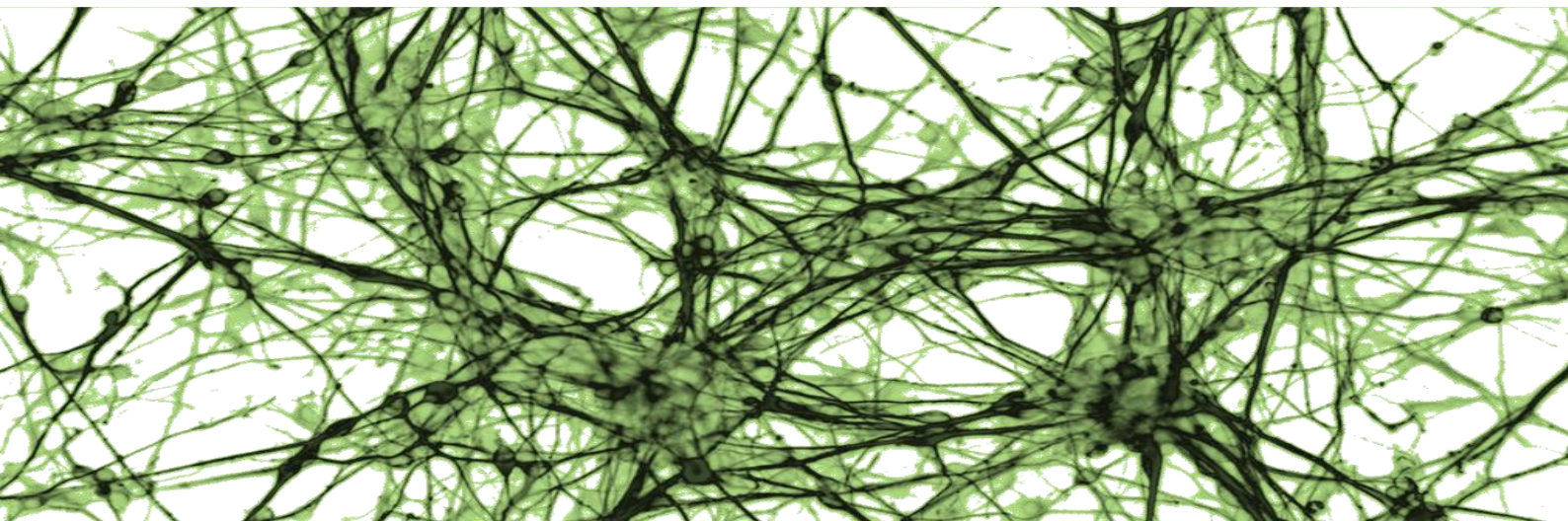
En los análisis de supervivencia, el tiempo de supervivencia global se estimó como el tiempo desde el diagnóstico hasta el fallecimiento del paciente o el último seguimiento. Aquellos pacientes perdidos a lo largo del seguimiento fueron censurados. Además, los pacientes con una supervivencia inferior a 14 días se excluyeron de los estudios de supervivencia, ya que estos pacientes podrían haber fallecido por causas diferentes a la propia enfermedad. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se estimaron por el método Kaplan-Meier y la comparación entre grupos se realizó usando el test log-rank. El modelo de los riesgos proporcionales de Cox se utilizó para evaluar la independencia de los factores pronóstico identificados.

En los estudios de asociación de polimorfismos, se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test χ^2 de Pearson o el test de Fisher. En aquellos polimorfismos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, se estimaron los Odd ratios (ORs) e intervalos de confianza del 95% para cada variante usando modelos de regresión logística.

Los datos obtenidos en el estudio del ciclo celular se analizaron mediante el análisis de la varianza de un factor (*one-way ANOVA*) para cada una de las fases.

En todos los casos se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de P-valor < 0.05.

RESULTADOS



1. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Las variantes polimórficas de un gen pueden afectar a la actividad de la proteína que codifica al modificar su expresión o estructura, la transcripción del gen o el procesamiento del RNA. De hecho, se sabe que polimorfismos en diversos genes están relacionados con el riesgo de padecer glioblastomas.

Para determinar si cambios polimórficos en genes relacionados con la autofagia se asocian a cambios en la susceptibilidad al desarrollo de glioblastomas, hemos analizado una población de 174 individuos con este tumor. Como población control seleccionamos 264 individuos (58.7% hombres y 41.3% mujeres) mayores de 60 años que no tuvieran ningún antecedente personal o familiar de cáncer. El porcentaje de hombres y mujeres fue similar tanto en pacientes como en controles para evitar un sesgo en los resultados debido al sexo. Los datos clínicos de los pacientes se pueden observar en la tabla 9 y, de manera detallada, en el anexo 1.

Tabla 9. Principales características de los pacientes del estudio poblacional, localización del tumor y tratamiento recibido.

Tumor	Glioblastomas (n=174)
Sexo	
Hombres	89 (53.6%)
Mujeres	77 (46.4%)
Mediana de edad, años [IQR]	62.22 [27-79]
Localización del tumor	
• Por hemisferios	
Derecho	83 (50.3%)
Izquierdo	66 (40%)
Otra	16 (9.7%)
• Por lóbulos	
Frontal	45 (27.1%)
Temporal	47 (28.3%)
Parietal	30 (18.1%)
Occipital	8 (4.8%)
Otra	36 (21.7%)
Cirugía	
Exéresis total	97 (71.9%)
Exéresis subtotal	38 (28.1%)
Tratamiento post-quirúrgico	
Sin tratamiento	10 (6.1%)
Radioterapia	58 (35.4%)
Radioterapia + Quimioterapia	96 (58.5%)
Mediana de supervivencia, días [IC 95%]	413.15 [7-4119]

En este trabajo hemos estudiado 6 polimorfismos de genes relacionados con la autofagia mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan™ (Tabla 8). Se analizó la distribución de las frecuencias genotípicas en el grupo de pacientes y el grupo control y, en aquellos polimorfismos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, realizamos los modelos logísticos correspondientes (Tabla 10). De la misma manera se analizaron las frecuencias alélicas (Tabla 11).

La distribución de los genotipos en cada uno de los polimorfismos analizados en el grupo control cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.1$).

Tabla 10. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de pacientes y controles y su asociación con el riesgo a padecer GBM.

SNP	Modelo herencia	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601	Codominante	CC	55 (31.6%)	39 (14.8%)		1
		CG	73 (42%)	115 (43.6%)	0.000	0.433 (0.259-0.721)
		GG	46 (26.4%)	110 (41.7%)		0.284 (0.165-0.488)
	Recesiva	CC+CG	18 (7.6%)	154 (78.3%)	0.001	1
		GG	46 (26.4%)	110 (41.7%)		0.645 (0.409-1.018)
	Dominante	CC	55 (31.6%)	39 (14.8%)	0.000	1
		CG+GG	119 (68.4%)	225 (85.2%)		0.442 (0.266-0.735)
ATG5 rs2245214	Codominante	CC	67 (38.5%)	106 (40.2%)		
		CG	85 (38.9%)	127 (48.1%)	0.926	
		GG	22 (12.6%)	31 (11.7%)		
	Recesiva	CC+CG	152 (87.4%)	223 (88.3%)	0.777	
		GG	22 (12.6%)	31 (11.7%)		
	Dominante	CC	67 (38.5%)	106 (40.2%)	0.730	
		CG+GG	107 (61.5%)	158 (59.8%)		
ATG10 rs1864183	Codominante	CC	32 (18.4%)	68 (25.8%)		1
		CT	96 (55.2%)	151 (57.2%)	0.030	1,379 (0.831-2.290)
		TT	46 (26.4%)	45 (17%)		2,350 (1.282-4.307)
	Recesiva	CC+CT	128 (73.6%)	219 (83%)	0.018	1
		TT	46 (26.4%)	45 (17%)		1,863 (1.154-3.006)
	Dominante	CC	32 (18.4%)	68 (25.8%)	0.072	
		CT+TT	142 (81.6%)	196 (74.2%)		
ATG16L1 rs2241880	Codominante	GG	45 (25.9%)	63 (23.9%)		
		GA	92 (52.9%)	138 (52.3%)	0.784	
		AA	37 (21.3%)	63 (23.9%)		
	Recesiva	GG+GA	137 (78.7%)	201 (76.1%)	0.526	
		AA	37 (21.3%)	63 (23.9%)		
	Dominante	GG	45 (25.9%)	63 (23.9%)	0.635	
		GA+AA	129 (74.1%)	201 (76.1%)		
NOD2 rs2066844	Codominante	CC	135 (77.6%)	167 (88.4%)		1
		CT	35 (20.1%)	21 (11.1%)	0.018	2,062 (1.147-3.707)
		TT	4 (2.3%)	1 (0.5%)		4,948 (0.547-44,79)
	Recesiva	CC+CT	170 (97.7%)	188 (99.5%)	0.148	
		TT	4 (2.3%)	1 (0.5%)		
	Dominante	CC	135 (77.6%)	167 (88.4%)	0.006	1
		CT+TT	39 (22.4%)	22 (11.6%)		2,193 (1.241-3.877)
NOD2 rs2066845	Codominante	GG	168 (96.6%)	100 (99%)		
		GC	6 (3.4%)	1 (1%)	0.212	
		CC	-	-		
	Recesiva	GG+GC	174 (100%)	101 (100%)	-	
		CC	-	-		
	Dominante	GG	168 (96.6%)	100 (99%)	0.212	
		GC+CC	6 (3.4%)	1 (1%)		

Tabla 11. Frecuencias alélicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de pacientes y controles y su asociación con el riesgo a padecer GBM.

SNP	Alelo	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC 95%)
ATG2B	C	183 (52.6%)	193 (36.6%)	0.000	1
rs3759601	G	165 (47.4%)	335 (63.4%)		0.519 (0.395-0.684)
ATG5	C	219 (62.9%)	339 (64.2%)	0.720	
rs2245214	G	129 (37.1%)	189 (35.8%)		
ATG10	C	160 (46%)	287 (54.4%)	0.016	1
rs1864183	T	188 (54%)	241 (45.6%)		0.399 (1.066-1.836)
ATG16L1	G	128 (52.3%)	264(50%)	0.505	
rs2241880	A	166 (47.7%)	264 (50%)		
NOD2	C	305 (87.6%)	355 (93.9%)	0.003	1
rs2066844	T	43 (12.4%)	23 (6.1%)		2.173 (1.282-3.693)
NOD2	G	342 (98.3%)	201 (99.5%)	0.21	
rs2066845	C	6 (1.7%)	1 (0.5%)		

El análisis de la distribución de los genotipos del polimorfismo ATG2B rs3759601 mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La frecuencia de homocigotos GG fue significativamente menor en el grupo de glioblastomas que en el grupo control ($p=0.000$; $OR=0.284$ (0.165-0.488)) (Tabla 10). Estos resultados indican que el ser portador de dos copias del alelo GG podría conferir un menor riesgo de desarrollar glioblastoma multiforme. Se observa, también, que los portadores de este genotipo presentan mayor proporción de resecciones totales del tumor y tratamientos postquirúrgicos completos con quimioterapia y radioterapia ($\chi^2=18.122$; $P=0.001$ y $\chi^2=6.069$; $P=0.048$ respectivamente). Además, el genotipo heterocigoto GC también parece proteger frente al desarrollo de este tumor ($P=0.001$; $OR=0.433$ (0.259-0.721)) (Tabla 10). Analizando las frecuencias alélicas se observa que el alelo G confiere protección frente al desarrollo de glioblastoma ($P=0.000$; $OR=0.519$ (0.395-0.684)) (Tabla 11).

En el caso del polimorfismo ATG10 rs1864183, los resultados muestran que los pacientes con glioblastoma presentan el genotipo TT con mayor frecuencia que los controles sanos ($p=0.030$; $OR=2,350$ (1.282-4.307)) (Tabla 10). Esto indica que la presencia de este genotipo aumentaría el riesgo a desarrollar el tumor. El análisis de los datos clínicos de los pacientes muestra que pacientes con el genotipo TT presentan, además, supervivencias más cortas ($\chi^2=8.592$; $p=0.014$) (Figura 25). El análisis de las frecuencias alélicas confirma que el alelo T confiere un mayor riesgo de desarrollar glioblastoma ($P=0.016$; $OR=0.399$ (1.066-1.836)) (Tabla 11).

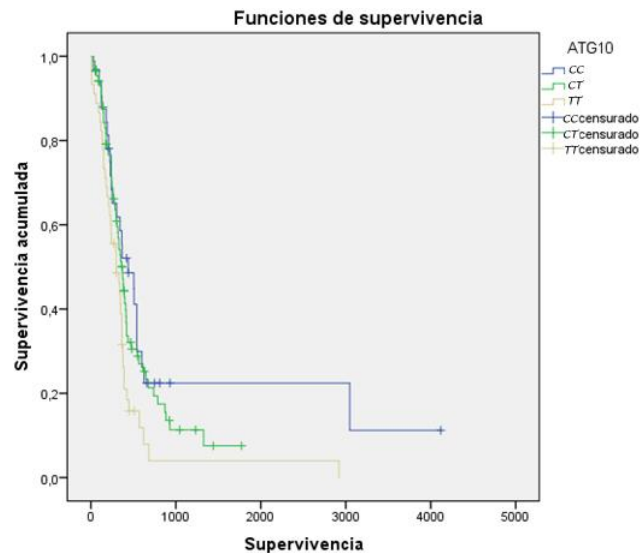


Figura 25. Curvas de supervivencia en función del genotipo del polimorfismo *ATG10* rs1864183 en los pacientes con glioblastoma multiforme.

El análisis de la distribución de los genotipos del polimorfismo *NOD2* rs2066844 mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos. La frecuencia de heterocigotos *CT* fue significativamente mayor en el grupo de glioblastomas que en el grupo control ($p=0.018$; $OR=2,062$ (1.147-3.707)) (Tabla 10). Estos resultados indican que el ser portador de este genotipo podría conferir un mayor riesgo de desarrollar glioblastomas. Además, este genotipo se observa más en mujeres que en hombres ($\chi^2=8.796$; $P=0.012$) y en pacientes mayores de 63 años ($\chi^2=6.818$; $P=0.033$). Analizando las frecuencias alélicas se observa que es el alelo *T* el que confiere este riesgo ($P=0.003$; $OR=2.173$ (1.282-3.693)) (Tabla 11).

El estudio de los polimorfismos *ATG5* rs2245214, *ATG16L1* rs2241880 y *NOD2* rs2066845 no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos entre el grupo de pacientes y el grupo control (Tablas 10 y 11).

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Con el fin de analizar el proceso de la autofagia en glioblastomas multiformes y determinar si proteínas relacionadas con ella podrían ser factores diagnósticos o pronósticos de dicho tumor, hemos analizado mediante western blot las proteínas *LC3B*, *p62/SQSTM1*, *TRAF6*, *PKCz*, *mTOR*, *Beclin1* y *PI3KCA* en 68 glioblastomas multiformes. Para poder determinar si la expresión de alguna de estas proteínas está relacionada con el estadio tumoral, se analizaron también 26 astrocitomas de bajo grado (grados I y II). En todos los casos, los resultados fueron normalizados usando una muestra control presente en todas las réplicas y membranas de estudio. Debido a que no disponíamos de tejido glial sano que pudiera actuar como control, seleccionamos la línea celular

T98G como muestra de normalización, ya que cumple las características requeridas para ello según las estrategias de normalización más extendidas¹³⁹. Los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio se pueden ver en la tabla 12 y el anexo 1.

Tabla 12. Principales características de los pacientes del estudio, localización del tumor y tratamiento recibido.

Tumor	Astrocitomas bajo grado (I y II)	Glioblastomas
Sexo		
Hombres	14 (58.3%)	30 (46.9%)
Mujeres	10 (41.7%)	34 (53.1%)
Mediana de edad, años [IQR]	38 [29-47.7]	64 [55-70]
Localización del tumor		
• Por hemisferios		
Derecho	8 (33.3%)	30 (46.9%)
Izquierdo	8 (33.3%)	29 (45.3%)
Otra	8 (33.3%)	5 (7.8%)
• Por lóbulos		
Frontal	6 (26.1%)	21 (32.8%)
Temporal	6 (26.1%)	17 (26.6%)
Parietal	3 (13%)	9 (1.1%)
Occipital	-	2 (3.1%)
Otra	8 (30.8%)	15 (23.4%)
Cirugía		
Exéresis total	12 (46.2%)	47 (73.4%)
Exéresis subtotal	12 (46.2%)	17 (26.6%)
Tratamiento post-quirúrgico		
No tratamiento	10 (41.7%)	3 (4.8%)
Radioterapia	7 (29.2%)	21 (33.9%)
R + Q	7 (29.2%)	38 (61.3%)
Mediana de supervivencia, días [IQR]	1443.5 [601.25-1896.25]	365 [172.5-501.5]

2.1 Análisis de la expresión de la proteína LC3B

El estudio de LC3B se llevó a cabo mediante western blot y permitió detectar tanto la forma LC3B-I como la forma conjugada con fosfatidiletanolamida (PE), LC3B-II. A pesar de que esta última tiene mayor peso molecular, migra más rápido en SDS-PAGE debido a su hidrofobicidad, por lo que muestra un peso molecular aparentemente más bajo y se detecta a 17KDa. LC3B-I se detecta a 19KDa (Figura 26).

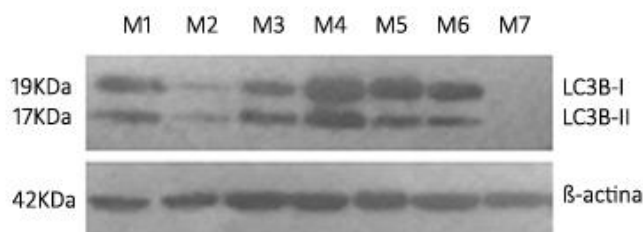


Figura 26. Western blot de la expresión de LC3B en algunos de los tumores de GBM estudiados. β -actina fue el control de carga.

El análisis de la expresión de las proteínas LC3B-I y II en glioblastoma multiforme mostró resultados bastante heterogéneos en el caso de LC3B-I. El 43% de las muestras tenía una expresión similar a la del control, mientras que aproximadamente la mitad tenía sobreexpresión de la proteína

y tan sólo un 6% mostraba disminución de la expresión. La expresión de LC3B-II fue en general más homogénea puesto que casi el 70% de las muestras presentaban expresión normal y el resto fueron muestras con baja expresión o sin ella (Figura 27).

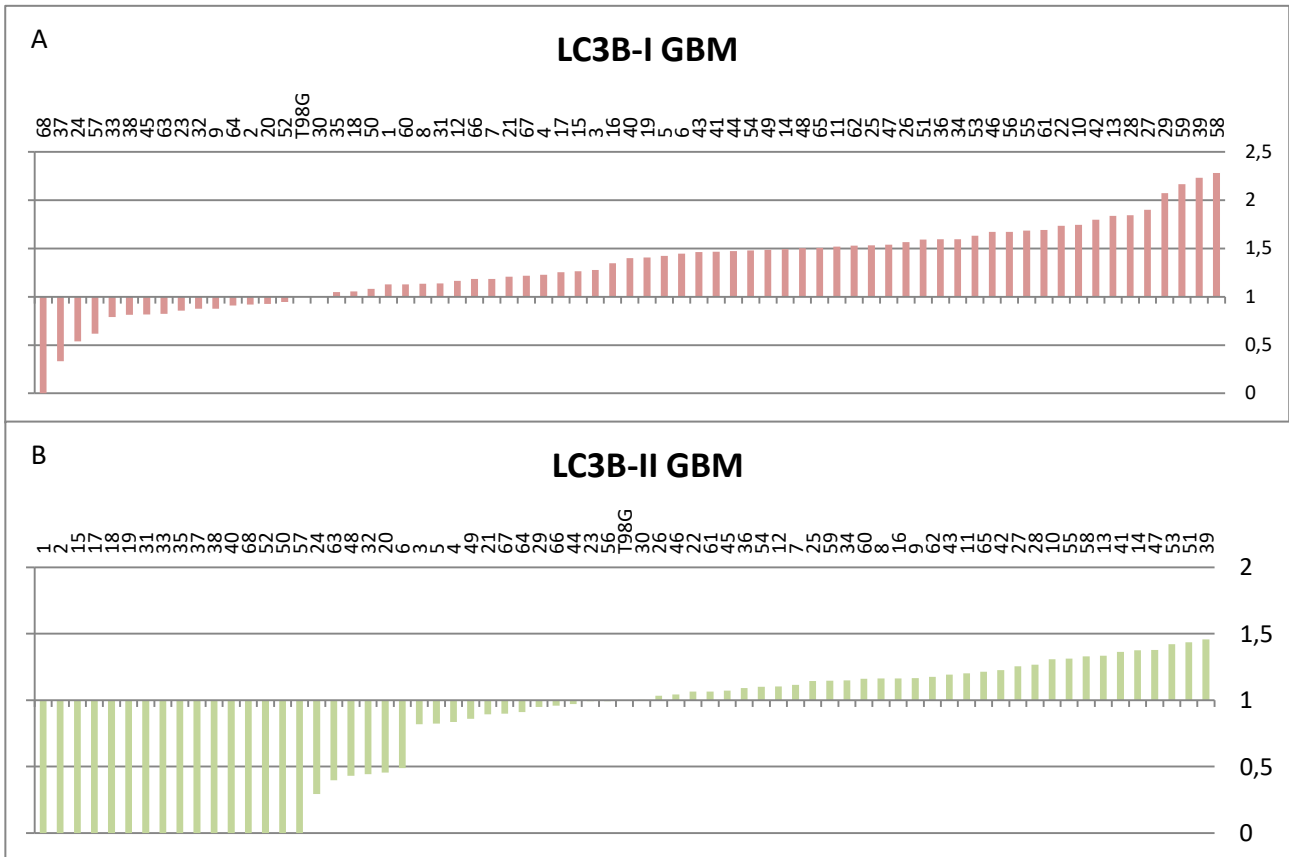


Figura 27. Representación gráfica de la expresión de las proteínas LC3B-I (A) y LC3B-II (B) en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/β-actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

Al analizar estos resultados de expresión y las variables clínicas de los pacientes, vimos que no existía una asociación significativa entre los resultados moleculares y el sexo del paciente, la edad de aparición del tumor, la localización del mismo y el tratamiento postquirúrgico. No obstante, al analizar las curvas de supervivencia, observamos en el caso de la proteína LC3B-I que una expresión normal de la misma se asocia a un mejor pronóstico de la enfermedad ($\chi^2=6.468$; $p=0.039$). En el caso de LC3B-II, la supervivencia aumenta cuando no hay expresión de la proteína ($\chi^2=8.218$; $p=0.016$), indicando, por tanto, que la expresión de LC3B-II es un marcador de peor pronóstico del tumor (Figura 28).

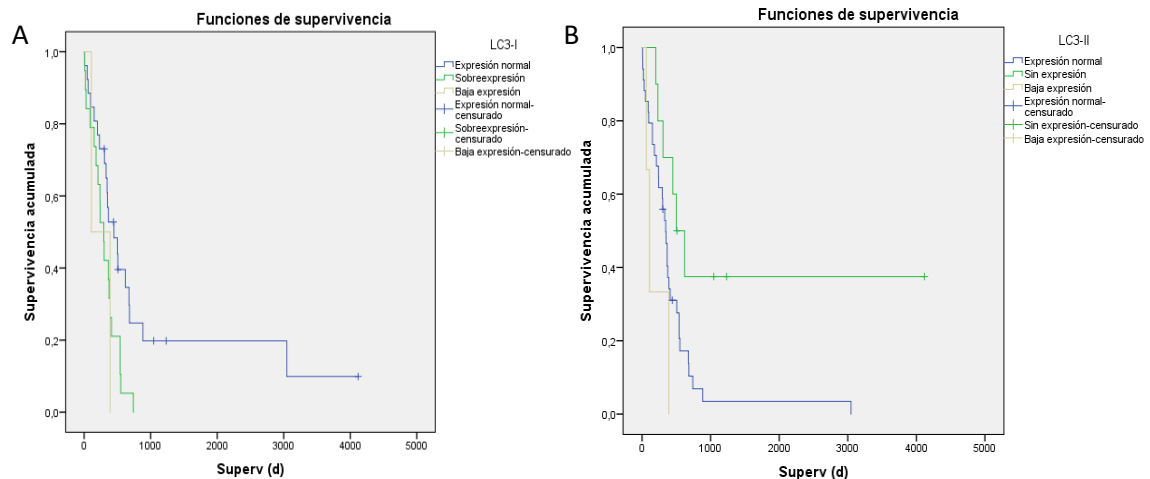


Figura 28. Curvas de supervivencia en función de la expresión de LC3B-I (A) y LC3B-II (B) en los pacientes con glioblastoma multiforme.

El estudio de la expresión de la proteína LC3B-I en astrocitomas de bajo grado mostró resultados muy homogéneos puesto que el 100% de las muestras se detectaba una expresión normal similar a la del control. LC3B-II mostraba expresión normal en el 88.5% de los casos, mientras que los restantes mostraban expresión baja (Figura 29).

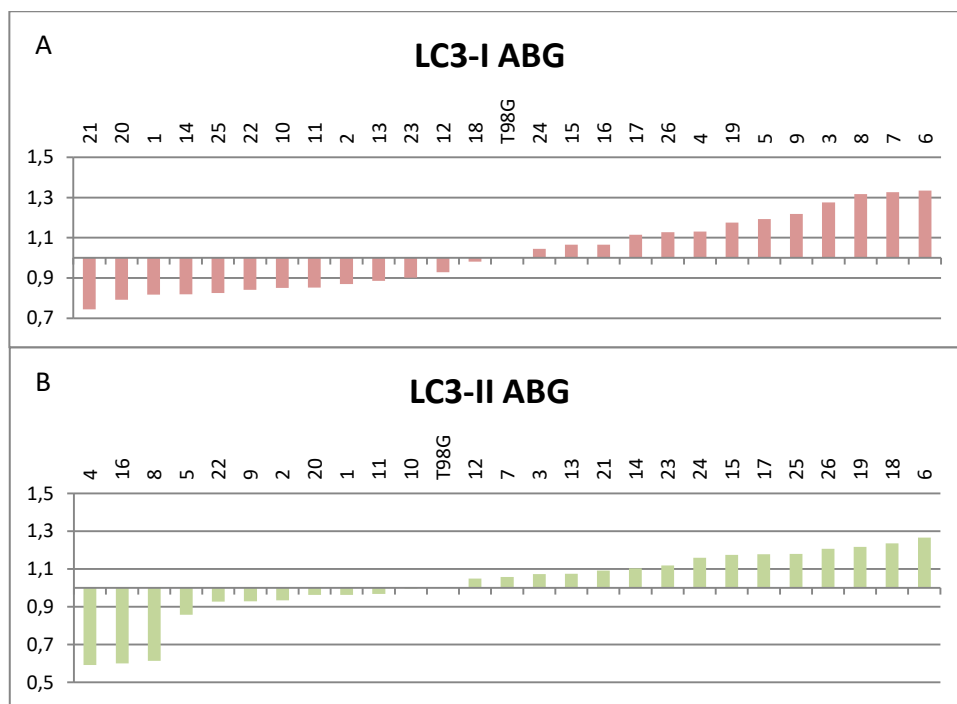


Figura 29. Representación gráfica de la expresión de las proteínas LC3B-I (A) y LC3B-II (B) en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

El análisis de los valores de expresión de LC3B-I y II en astrocitomas de bajo grado no mostró ninguna correlación significativa con los datos clínicos recogidos de los pacientes. El análisis de la supervivencia tampoco reveló ninguna relación con los niveles de expresión de estas proteínas.

La comparación entre los pacientes de alto y bajo grado, mostró que la sobreexpresión de LC3B-I y la no expresión de LC3B-II están asociadas con glioblastoma (F=29.405; p=0.000 y F=8,843; p=0.01 respectivamente) (Tabla 13), sugiriendo que esta proteína podría estar relacionada con la agresividad y el grado tumoral.

Tabla 13. Porcentajes de pacientes según la expresión de LC3B-I.

LC3-I y LC3-II				
Expresión LC3B-I	Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión
ABG	26	0	0	0
	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
GBM	29	34	4	1
	42,6%	50,0%	5,9%	1,5%
Total	55	34	4	1
	58,5%	36,2%	4,3%	1,1%
Expresión LC3B-II	Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión
ABG	23	0	3	0
	88,5%	0,0%	11,5%	0,0%
GBM	46	0	6	16
	67,6%	0,0%	8,8%	23,5%
Total	69	0	9	16
	73,4%	0,0%	9,6%	17,0%

2.2 Análisis de la expresión de la proteína p62

El estudio de la expresión de la proteína p62 se llevó a cabo mediante western blot, observándose fragmentos de 62KDa que se corresponden con la proteína (Figura 30).

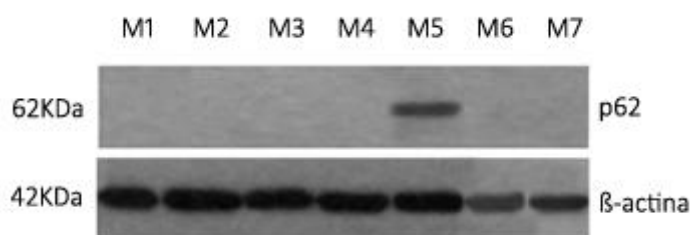


Figura 30. Western blot de la expresión de p62 en algunos de los tumores de GBM estudiados. β-actina fue el control de carga.

El análisis de la expresión de la proteína p62 en glioblastoma multiforme mostró que aproximadamente el 80% de las muestras carecían de expresión, el 16,4% la tenía disminuida y tan solo un 3% mostraba una expresión normal comparada con la del control (Figura 31).

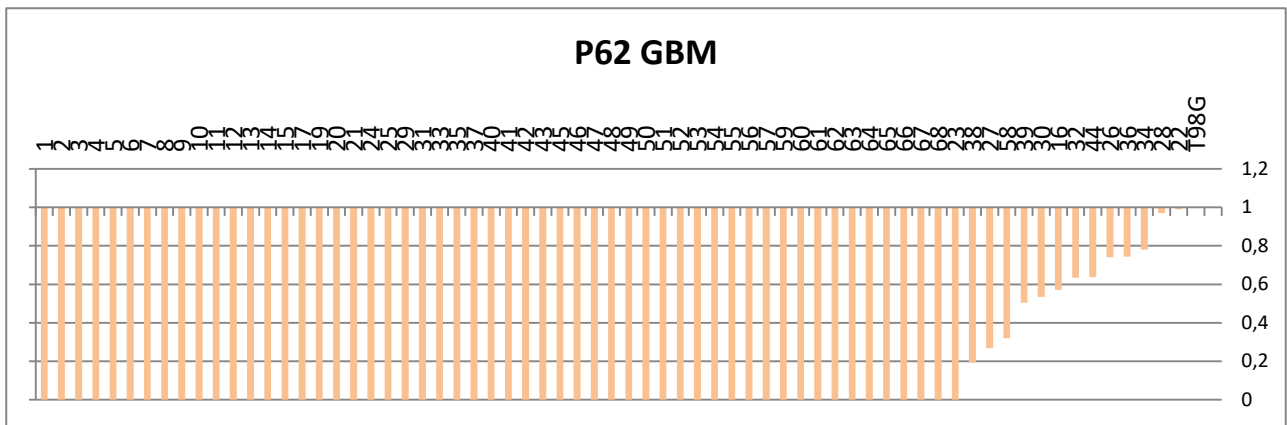


Figura 31. Representación gráfica de la expresión de la proteínas p62 en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

Al comparar los resultados de expresión de p62 con las características clínicas de los pacientes de sexo, edad de aparición del tumor, localización del mismo y tratamiento postquirúrgico, vimos que no existía correlación entre ellas. No obstante, el estudio de supervivencia mostró que la ausencia de expresión de la proteína se asocia a un mejor pronóstico de la enfermedad ($\chi^2=4.949$; $p=0.026$) (Figura 32), sugiriendo que p62 podría tener valor como marcador pronóstico del tumor debido a que su expresión se asocia a supervivencias más cortas.

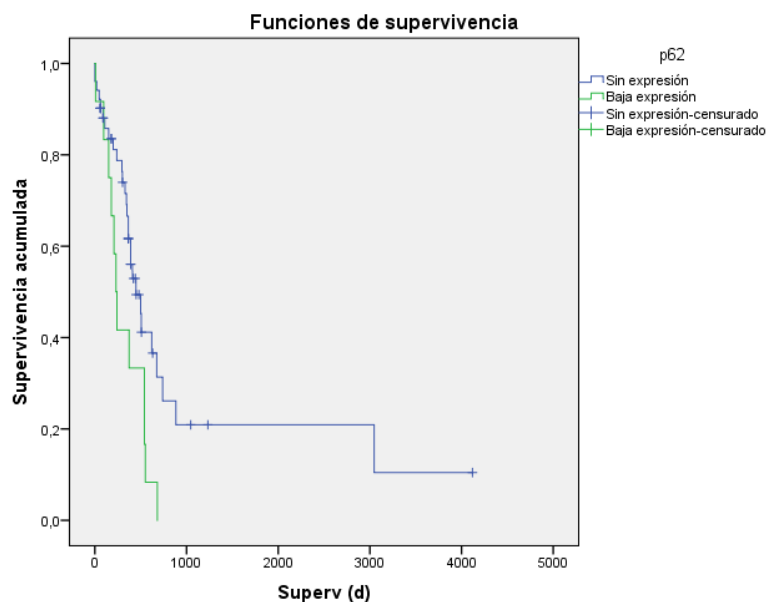


Figura 32. Curvas de supervivencia en función de la expresión de p62 en los pacientes con glioblastoma multiforme.

El estudio de la expresión de la proteína p62 en astrocitomas de bajo grado presentó resultados heterogéneos. Aproximadamente el 36% de las muestras carecía de expresión mientras que el 46% la presentaba normal y un 20% aproximadamente la tenía disminuida (Figura 33).

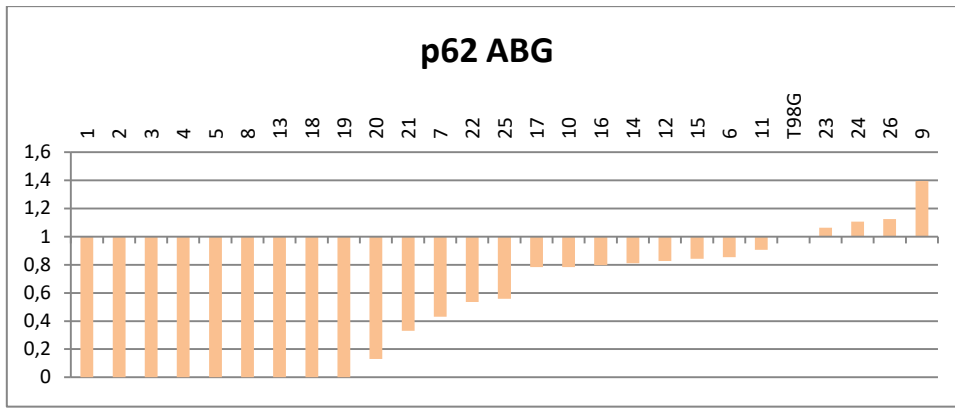


Figura 33. Representación gráfica de la expresión de la proteína p62 en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

La correlación entre los valores de expresión de la proteína p62 en astrocitomas de bajo grado y los datos clínicos recogidos de los pacientes no mostró significación. El estudio de supervivencia tampoco demostró ninguna relación significativa con los niveles de expresión de esta proteína.

La comparación entre el grupo de glioblastomas y el de tumores de bajo grado puso de manifiesto que la ausencia de p62 está relacionada con glioblastoma, mientras que su expresión normal está asociada a los tumores de bajo grado ($F=26.385$; $p=0.000$) (Tabla 14), sugiriendo que dicha expresión podría estar relacionada con estadios tumorales bajos.

Tabla 14. Porcentajes de pacientes según la expresión de p62.

	p62		
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
ABG	9	5	12
	34,6%	19,2%	46,2%
GBM	54	11	2
	80,6%	16,4%	3,0%
Total	63	16	14
	67,7%	17,2%	15,1%

2.3 Análisis de la expresión de la proteína TRAF6

El análisis de la expresión de la proteína TRAF6 se llevó a cabo mediante western blot, observándose un fragmento a 58KDa que se corresponde con el tamaño de la proteína (Figura 34).

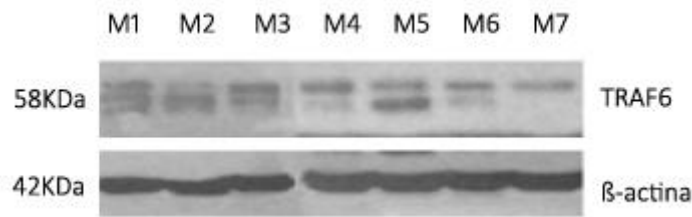


Figura 34. Western blot de la expresión de TRAF6 en algunos de los tumores de GBM estudiados. β -actina fue el control de carga.

El análisis de la expresión de la proteína TRAF6 en glioblastoma multiforme mostró expresiones normales de la proteína en el 44% de los casos, mientras que el 31% carecía de expresión, el 16% la tenía disminuida y el 9% restante mostraba sobreexpresión respecto al control (Figura 35).

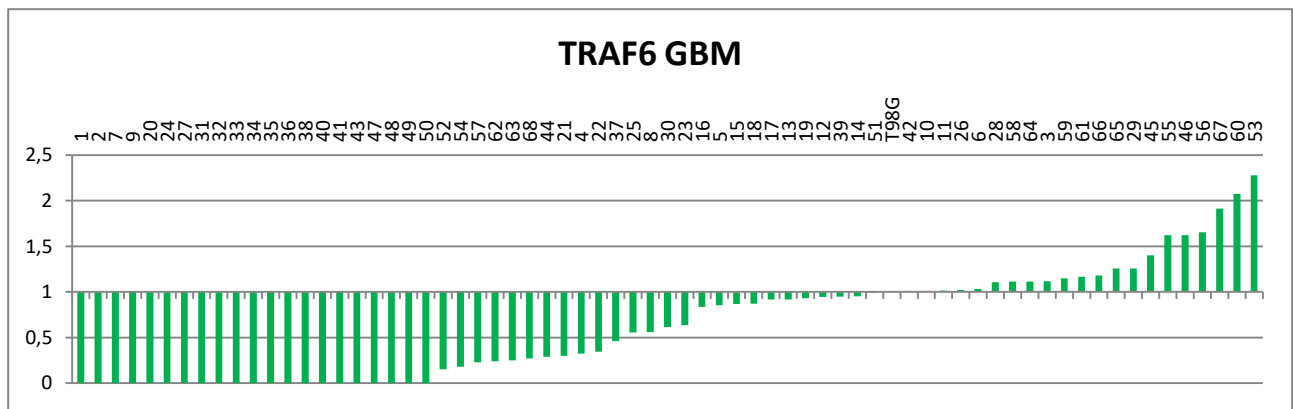


Figura 35. Representación gráfica de la expresión de la proteínas TRAF6 en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

El estudio de asociación entre los resultados de expresión de TRAF6 y las variables clínicas de los pacientes (sexo, edad de aparición del tumor, localización del mismo y tratamiento postquirúrgico) no mostró correlaciones significativas entre ellos. El estudio de las curvas de supervivencia tampoco tuvo significación estadística.

El estudio de la expresión de la proteína TRAF6 en astrocitomas de bajo grado reveló resultados muy homogéneos, ya que aproximadamente en el 96% de los tumores se detectaba expresión normal (Figura 36).

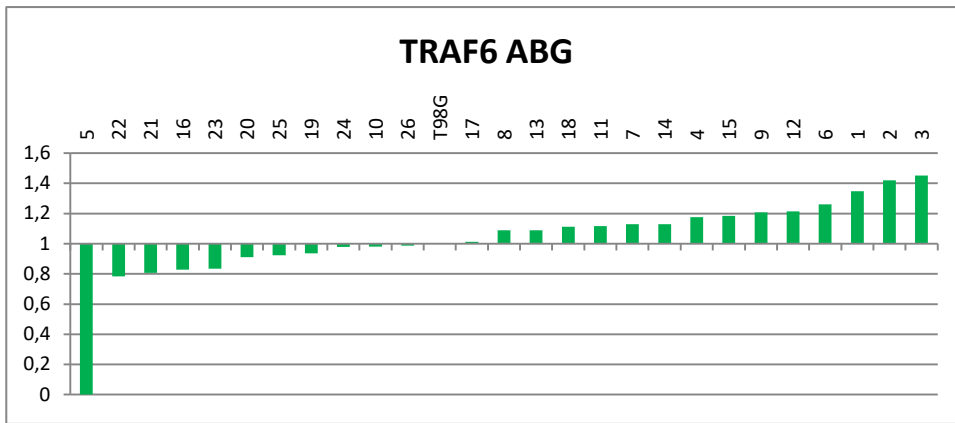


Figura 36. Representación gráfica de la expresión de la proteína TRAF6 en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

El análisis de los valores de expresión de TRAF6 en astrocitomas de bajo grado no mostró ninguna correlación significativa con los datos clínicos recogidos de los pacientes. La supervivencia de los pacientes tampoco mostró ninguna relación significativa con los niveles de expresión de esta proteína.

Al comparar la expresión de TRAF6 en astrocitomas de bajo grado y glioblastomas observamos que la ausencia de expresión de TRAF6 está asociada a los tumores de alto grado ($F=21.141$; $p=0.000$) (Tabla 15), sugiriendo que la expresión normal de la misma podría estar relacionada con menor agresividad tumoral.

Tabla 15. Porcentajes de pacientes según la expresión de TRAF6.

	TRAF6			
	Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión
ABG	25	0	0	1
	96,2%	0,0%	0,0%	3,8%
GBM	30	6	11	21
	44,1%	8,8%	16,2%	30,9%
Total	55	6	11	22
	58,5%	6,4%	11,7%	23,4%

2.4 Análisis de la expresión de la proteína PKCz

El análisis de la expresión de la proteína PKCz se realizó mediante Western blot, observándose un fragmento a 68KDa que se corresponde con el tamaño de la proteína (Figura 37).

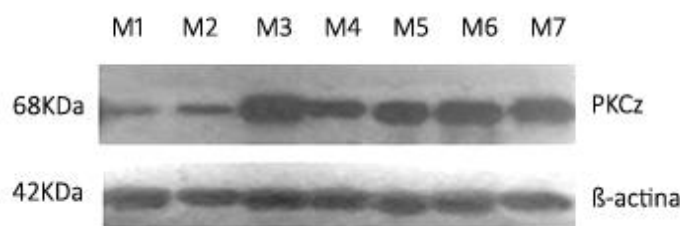


Figura 37. WB de la expresión de PKCz en algunos de los tumores de GBM estudiados. β -actina fue el control de carga.

El estudio de la expresión de la proteína PKCz en glioblastomas multiformes mostró que aproximadamente el 60% de los tumores tenía una expresión normal, mientras que cerca del 30% la mostraba baja comparada con la del control y prácticamente todas las muestras restantes sobreexpresaban la proteína (Figura 38).

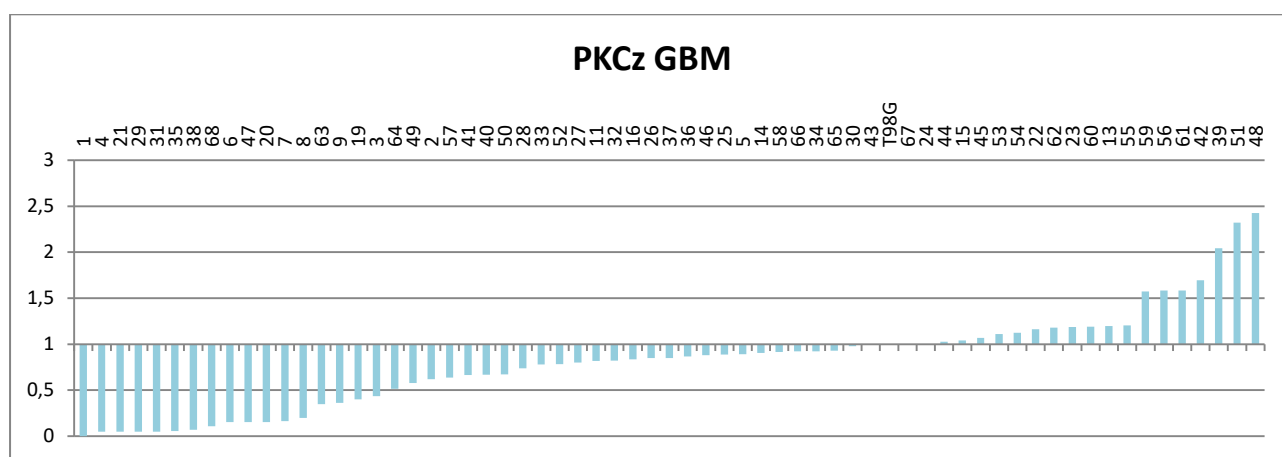


Figura 38. Representación gráfica de la expresión de la proteínas PKCz en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

Al comparar los resultados de expresión de PKCz con las características clínicas de los pacientes respecto a la edad de aparición del tumor, localización del mismo y tratamiento postquirúrgico, vimos que no existía una correlación significativa entre ellas. No obstante, analizando el sexo, se observó que, en mujeres, la expresión normal de PKCz es mucho más habitual que en hombres ($F=13.583$; $p=0.001$) (Tabla 16).

Tabla 16. Porcentajes de pacientes según la expresión de PKCz y el sexo del paciente.

Sexo	PKCz			
	Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión
Mujeres	26	6	0	1
	78,8%	18,2%	0,0%	3,0%
Hombres	9	11	1	6
	33,3%	40,7%	3,7%	22,2%
Total	35	17	1	7
	58,3%	28,3%	1,7%	11,7%

Además, el estudio de supervivencia reveló que la ausencia de expresión de la proteína se asocia a un mejor pronóstico de la enfermedad ($\chi^2=13.258$; $p=0.004$) (Figura 39), sugiriendo que la expresión de PKCz podría tener un fuerte valor como marcador pronóstico del tumor.

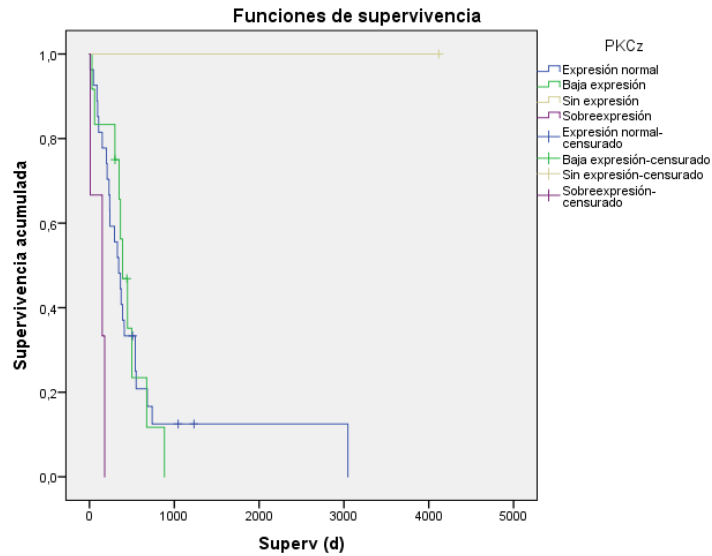


Figura 39. Curvas de supervivencia en función de la expresión de PKCz en los pacientes con glioblastoma multiforme.

Al analizar la expresión de la proteína PKCz en astrocitomas de bajo grado observamos que en la mayoría de las muestras (76,7%) la expresión era muy similar a la del control (Figura 40).

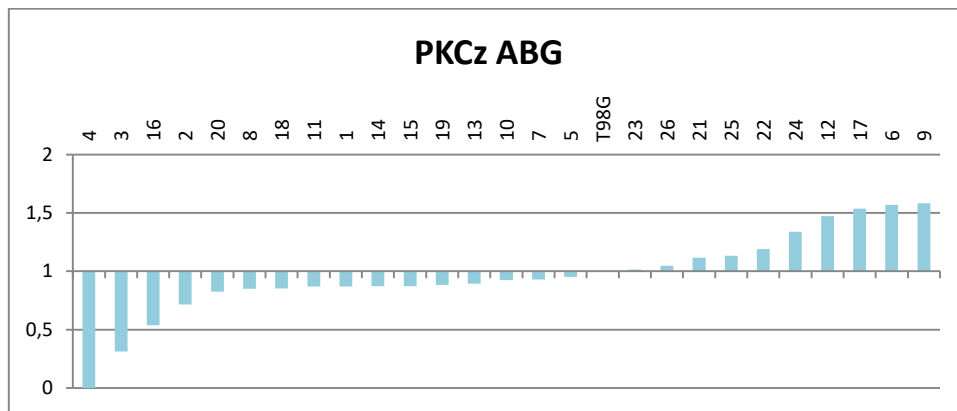


Figura 40. Representación gráfica de la expresión de la proteína PKCz en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

El análisis de los valores de expresión de PKCz en astrocitomas de bajo grado no mostró ninguna asociación significativa con las variables clínicas recogidas de los pacientes. En el análisis de la supervivencia tampoco se observó ninguna relación con los niveles de expresión de estas proteínas.

La comparación entre grupos de pacientes de alto y bajo grado no mostró diferencias significativas (Tabla 17).

Tabla 17. Porcentajes de pacientes según la expresión de PKC ζ .

	PKC ζ			
	Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión
ABG	20	1	1	4
	76,9%	3,8%	3,8%	15,4%
GBM	38	18	1	7
	59,4%	28,1%	1,6%	10,9%
Total	58	19	2	11
	64,4%	21,1%	2,2%	12,2%

2.5 Análisis de la expresión de la proteína mTOR

La expresión de la proteína mTOR se estudió mediante western blot, viéndose fragmentos de 289KDa que se corresponden con esta proteína (Figura 41).

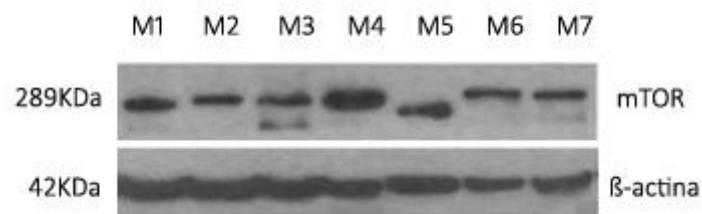


Figura 41. Western blot de la expresión de mTOR en algunos de los tumores de GBM estudiados. β -actina fue el control de carga.

Al estudiar de la expresión de la proteína mTOR en glioblastomas multiformes se observó que aproximadamente el 48% de ellos mostraban expresión normal similar a la del control, mientras que cerca del 35% no expresaban mTOR. En el 17% restante de tumores detectábamos baja expresión o sobreexpresión (Figura 42).

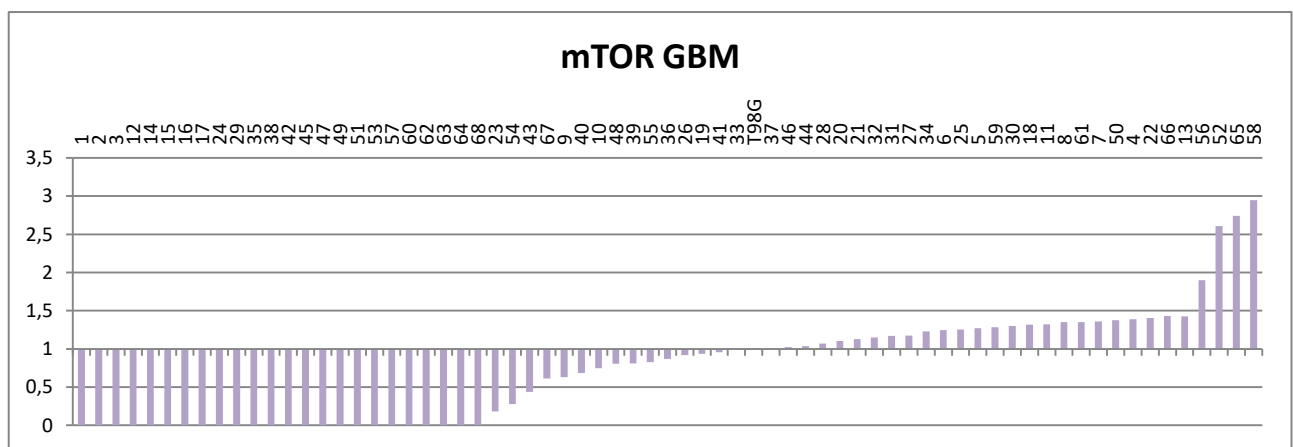


Figura 42. Representación gráfica de la expresión de la proteínas mTOR en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

Al comparar los resultados de expresión de mTOR con las características clínicas de los pacientes de sexo, localización del tumor y tratamiento postquirúrgico, vimos que no existía una correlación significativa entre ellas. No obstante, al analizar la edad de aparición del tumor, observamos que la expresión normal de mTOR se correlacionaba con una aparición más tardía del tumor ($\chi^2=12.080$; $p=0.007$) (Tabla 18) El estudio de supervivencia no mostró diferencias significativas entre la expresión de la proteína y el tiempo de supervivencia.

Tabla 18. Porcentajes de pacientes según la expresión de mTOR y la edad de aparición del tumor.

Edad (años)	mTOR			
	Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión
<63	6 23,1%	5 19,2%	12 46,2%	3 11,5%
>63	23 62,2%	1 2,7%	12 32,4%	1 2,7%
Total	29 46,0%	6 9,5%	24 38,1%	4 6,3%

El análisis de la expresión de mTOR en astrocitomas de bajo grado mostró que en la mayoría de las muestras (69,2%) la expresión era muy similar a la del control mientras que aproximadamente el 20% no presentaban expresión en absoluto (Figura 43).

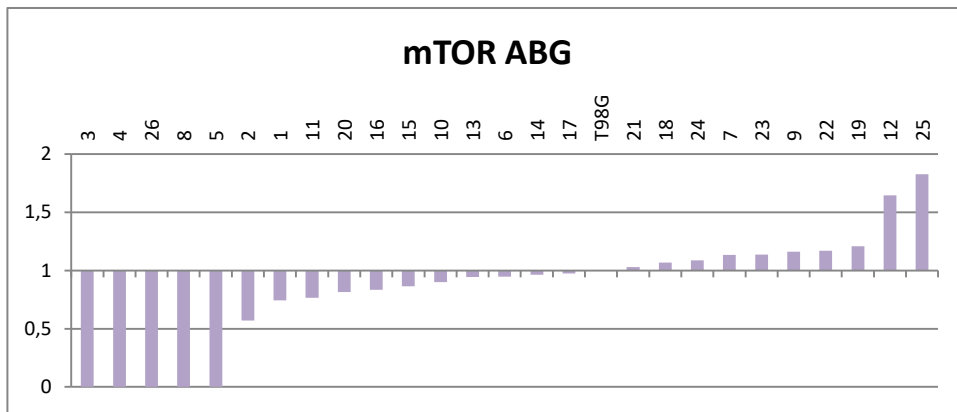


Figura 43. Representación gráfica de la expresión de la proteína mTOR en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/β-actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

El análisis de los valores de expresión de mTOR en astrocitomas de bajo grado no mostró ninguna correlación con los datos clínicos de los pacientes. Con el análisis de la supervivencia tampoco se observó ninguna asociación con los niveles de expresión de mTOR.

La comparación entre grupos de pacientes de alto y bajo grado no presentó diferencias significativas (Tabla 19).

Tabla 19. Porcentajes de pacientes según la expresión de mTOR.

	mTOR			
	Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión
ABG	18	1	5	2
	69,2%	3,8%	19,2%	7,7%
GBM	33	7	24	4
	48,5%	10,3%	35,3%	5,9%
Total	51	8	29	6
	54,3%	8,5%	30,9%	6,4%

2.6 Análisis de la expresión de la proteína Beclin1

El estudio de la expresión de la proteína Beclin1 se llevó a cabo mediante western blot. El tamaño esperado de aparición del fragmento correspondiente a esta proteína es 70KDa (Figura 44).

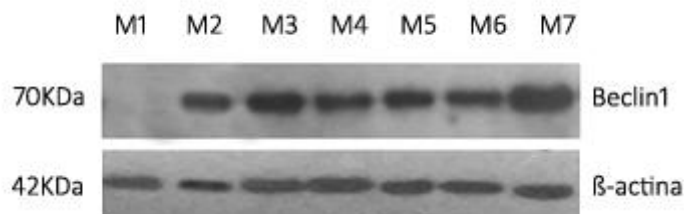


Figura 44. Western blot de la expresión de Beclin1 en algunos de los tumores de GBM estudiados. β -actina fue el control de carga.

El estudio de expresión de la proteína Beclin1 en glioblastoma multiforme mostró resultados bastante heterogéneos. Aproximadamente en la mitad de las muestras se detectaba expresión normal mientras que el 45% mostraba expresión baja o carencia total de la misma. Tan sólo un 3,2% de los tumores tenía sobreexpresión (Figura 45).

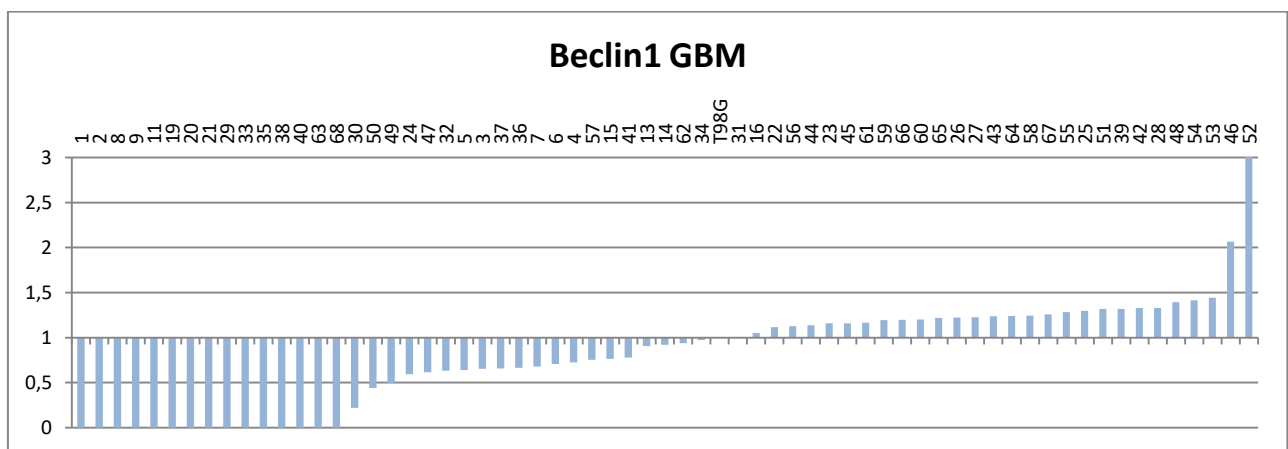


Figura 45. Representación gráfica de la expresión de la proteínas Beclin1 en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

La comparación de la expresión de Beclin1 en glioblastomas con los datos clínicos de sexo del paciente, edad de aparición del tumor, localización del mismo y tratamiento postquirúrgico no mostró asociaciones significativas entre ellos. Con el estudio de supervivencia tampoco se observó ningún valor pronóstico de esta proteína.

El estudio de la expresión de la proteína Beclin1 en astrocitomas de bajo grado mostró resultados muy homogéneos al presentar el 85% de los tumores analizados expresiones normales. El 15% restante se corresponde con muestras sin expresión o con ella baja (Figura 46).

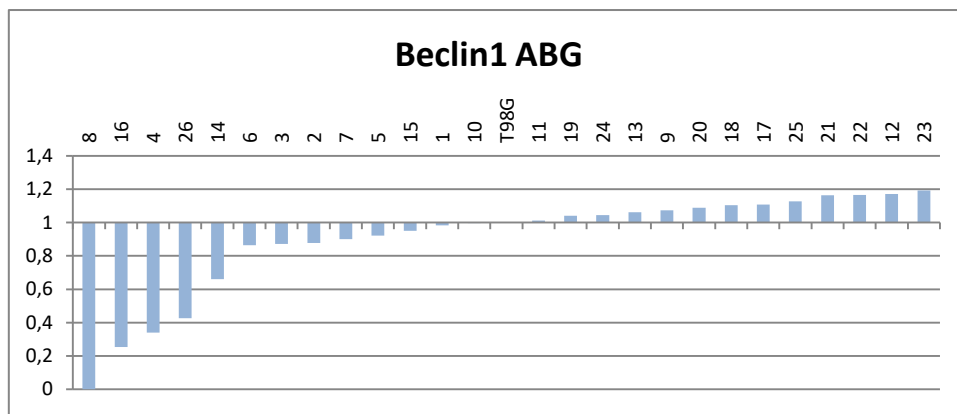


Figura 46. Representación gráfica de la expresión de la proteína Beclin1 en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

La correlación entre las características clínicas de los pacientes con astrocitomas de bajo grado y los valores de expresión de Beclin1 no mostró significación. Tampoco se observó relación significativa con la supervivencia de los pacientes.

No obstante, la comparación entre pacientes de alto y bajo grado mostró que la ausencia de Beclin1 está asociada con glioblastoma multiforme, mientras que su expresión normal está asociada a los tumores de bajo grado ($F=9.008$; $p=0.019$) (Tabla 20), sugiriendo que la ausencia de Beclin1 podría estar relacionada con una mayor agresividad tumoral.

Tabla 20. Porcentajes de pacientes según la expresión de Beclin1.

	Beclin1			
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal	Sobreexpresión
ABG	1 3,8%	3 11,5%	22 84,6%	0 0,0%
GBM	15 23,8%	14 22,2%	32 50,8%	2 3,2%
Total	16 18,0%	17 19,1%	54 60,7%	2 2,2%

2.7 Análisis de la expresión de la proteína PI3KCA

El estudio de la expresión de la proteína PI3KCA se llevó a cabo mediante western blot, obteniendo el fragmento correspondiente a esta proteína a 110KDa (Figura 47).

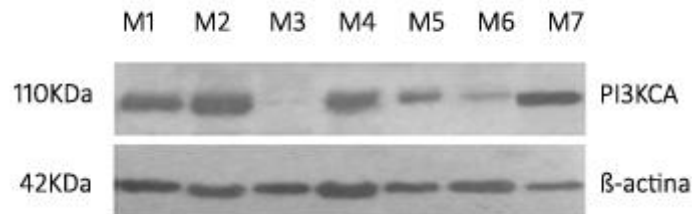


Figura 47. Western blot de la expresión de PI3KCA en algunos de los tumores de GBM estudiados. β-actina fue el control de carga.

Al analizar la expresión de PI3KCA en glioblastomas multiformes se observó que aproximadamente el 40% de los tumores analizados carecía de la expresión de la misma y otro 40% presentaba niveles normales de expresión. El aproximadamente 20% de muestras restantes mostró expresiones inferiores o superiores a la normal tomada a partir de un control (Figura 48).

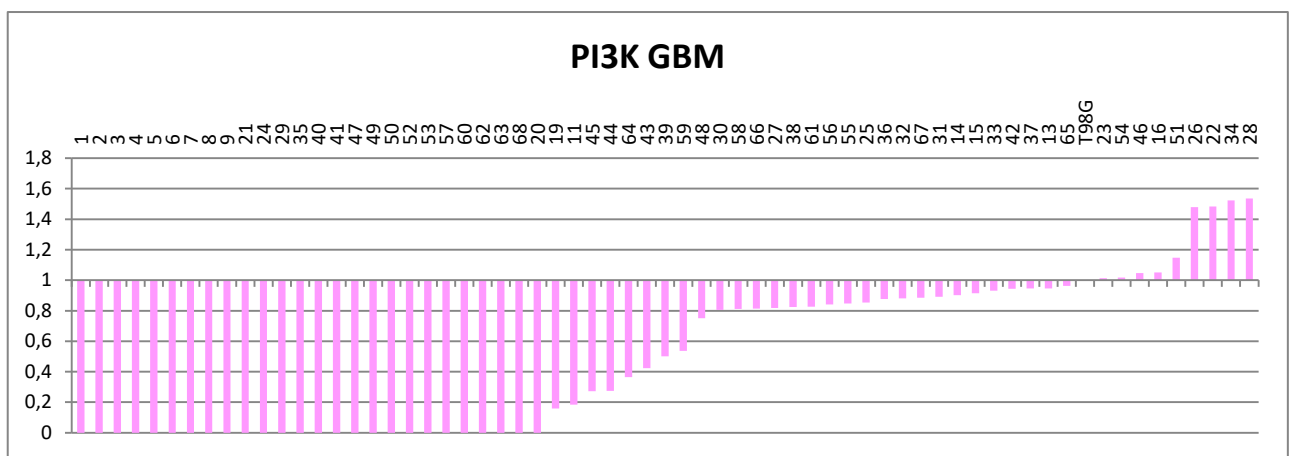


Figura 48. Representación gráfica de la expresión de la proteína PI3KCA en muestras tumorales de GBM. Se representa el ratio proteína de interés/β-actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

La comparación de la expresión de PI3KCA en glioblastoma con las características clínicas de los pacientes no presentó asociaciones significativas. Tampoco se pudo observar una correlación entre la expresión de esta proteína y la supervivencia de los pacientes.

En el caso de los astrocitomas de bajo grado estudiados, el estudio de la expresión de la proteína PI3KCA mostró resultados homogéneos al presentar el 80,8% de los tumores analizados expresiones normales. El 8% de los tumores mostraban sobreexpresión mientras que el 11% restante carecía por completo de PI3KCA (Figura 49).

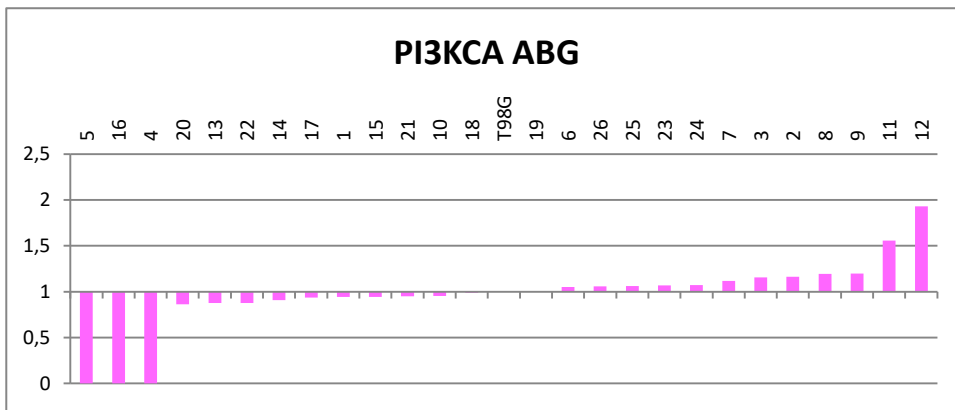


Figura 49. Representación gráfica de la expresión de la proteína PI3KCA en muestras tumorales de astrocitomas de bajo grado. Se representa el ratio proteína de interés/ β -actina de cada muestra normalizado respecto a un control (T98G).

El análisis de la expresión de PI3KCA respecto a las características clínicas de pacientes con astrocitomas de bajo grado no se pudo correlacionar de manera significativa. Tampoco se observó ninguna asociación con la supervivencia de los pacientes.

No obstante, la comparación entre pacientes de alto y bajo grado mostró que la ausencia de PI3KCA está asociada a glioblastoma multiforme, mientras que su expresión normal se asocia a tumores de grado bajo ($F=13.946$; $p=0.002$) (Tabla 21), sugiriendo que la ausencia de PI3KCA podría estar relacionada con un mayor grado tumoral.

Tabla 21. Porcentajes de pacientes según la expresión de PI3KCA.

	PI3KCA			
	Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión
ABG	21 80,8%	2 7,7%	0 0,0%	3 11,5%
GBM	26 40,6%	4 6,3%	8 12,5%	26 40,6%
Total	47 52,2%	6 6,7%	8 8,9%	29 32,2%

2.8 Análisis de la correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia

Para estudiar la posible relación entre las proteínas incluidas en este trabajo en los tumores de estudio, se llevó a cabo un test de Spearman usando los valores cuantitativos obtenidos de la normalización de la expresión de cada una de las proteínas en cada tumor. Las tablas 22 y 23 presentan la correlación en glioblastomas multiformes y astrocitomas de bajo grado respectivamente. En todos los casos en los que se observó una asociación significativa, el coeficiente de correlación fue positivo, denotando una correlación positiva entre proteínas.

Tabla 22. Correlación entre la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia en GBM usando el test de Spearman. CC: Coeficiente de correlación (Valores positivos: correlación positiva; valores negativos: correlación negativa). Significación estadística con un p-valor<0.05.

		LC3-I	LC3-II	p62	PKCz	TRAF6	mTOR	Beclin 1	PI3K
LC3-I	CC	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-valor	-	-	-	-	-	-	-	-
LC3-II	CC	,657	-	-	-	-	-	-	-
	p-valor	,000	-	-	-	-	-	-	-
p62	CC	,177	,175	-	-	-	-	-	-
	p-valor	,148	,153	-	-	-	-	-	-
PKCz	CC	,422	,465	,154	-	-	-	-	-
	p-valor	,000	,000	,221	-	-	-	-	-
TRAF6	CC	,402	,356	-,050	,416	-	-	-	-
	p-valor	,001	,003	,684	,001	-	-	-	-
mTOR	CC	,241	,097	,189	,082	,098	-	-	-
	p-valor	,046	,427	,122	,516	,425	-	-	-
Beclin1	CC	,488	,504	,152	,657	,447	,127	-	-
	p-valor	,000	,000	,228	,000	,000	,312	-	-
PI3K	CC	,318	,267	,498	,491	,280	,197	,494	-
	p-valor	,010	,032	,000	,000	,024	,116	,000	-

Tabla 23. Correlación entre la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia en ABG usando el test de Spearman. CC: Coeficiente de correlación (Valores positivos: correlación positiva; valores negativos: correlación negativa). Significación estadística con un p-valor<0.05.

		LC3-I	LC3-II	p62	PKCz	TRAF6	mTOR	Beclin 1	PI3K
LC3-I	CC	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-valor	-	-	-	-	-	-	-	-
LC3-II	CC	,035	-	-	-	-	-	-	-
	p-valor	,863	-	-	-	-	-	-	-
p62	CC	,113	,243	-	-	-	-	-	-
	p-valor	,576	,221	-	-	-	-	-	-
PKCz	CC	,063	,392	,561	-	-	-	-	-
	p-valor	,755	,043	,002	-	-	-	-	-
TRAF6	CC	,250	,051	,009	-,196	-	-	-	-
	p-valor	,208	,802	,963	,327	-	-	-	-
mTOR	CC	-,169	,382	,290	,640	-,249	-	-	-
	p-valor	,399	,049	,143	,000	,210	-	-	-
Beclin1	CC	-,480	,267	,093	,528	-,334	,727	-	-
	p-valor	,011	,178	,645	,005	,089	,000	-	-
PI3K	CC	,241	,175	,353	,216	,427	,219	,096	-
	p-valor	,227	,382	,071	,280	,026	,273	,632	-

2.9 Estado de la autofagia y su valor pronóstico

La conversión de LC3-I a LC3-II y la degradación de p62 se consideran marcadores de la inducción y el flujo autofágico respectivamente ¹⁴⁰. De acuerdo con los patrones de expresión de estas proteínas, hemos agrupado los tumores incluidos en el estudio en cuatro grupos tumorales para determinar su estado de la autofagia (Tabla 24): el grupo A poseería expresiones bajas de LC3-II y p62, indicando niveles basales de autofagia; el grupo B tendría bajos niveles de LC3-II, pero altos de p62, indicando una autofagia basal aberrante en los últimos estadios del proceso; el grupo C presentaría sobreexpresión de LC3-II y bajos niveles de p62, indicando activación de la autofagia; y el

grupo D mostraría altos niveles de LC3-II y p62, lo que significaría una activación de la autofagia que se vería interrumpida en etapas tardías del proceso ¹⁴⁰.

Tabla 24. Porcentajes de pacientes teniendo en cuenta la expresión conjunta de LC3B-II y p62.

	Estado de la autofagia			
	A	B	C	D
	Bajo LC3-II Bajo p62	Bajo LC3-II Alto p62	Alto LC3-II Bajo p62	Alto LC3-II Alto p62
ABG	3 11,5%	0 0%	23 88,5%	0 0%
GBM	22 32,4%	0 0%	46 67,6%	0 0%
Total	25 26,6%	0 0%	69 73,4%	0 0%

Según esta agrupación, se observa que todos los tumores incluidos en este trabajo se pueden incluir en los grupos A y C. Tanto en glioblastomas como en astrocitomas de bajo grado parece que predomina tener la autofagia activada, aunque el porcentaje es significativamente mayor en los tumores de bajo grado (67,7 y 88,5% respectivamente) ($\chi^2=4.174$; $p=0.041$).

El análisis de las curvas de supervivencia para determinar el posible valor pronóstico de la autofagia no mostró resultados significativos en los tumores analizados ($\chi^2=2.053$; $p=0.153$ para glioblastoma multiforme y $\chi^2=1.700$; $p=0.192$ para astrocitomas de bajo grado).

2.10 Análisis de alteraciones en el promotor de hTERT en glioblastoma multiforme: valor pronóstico y relación con la expresión de proteínas de autofagia

Recientemente se han identificado las mutaciones g.228C>T y g.250C>T en el promotor de la telomerasa transcriptasa reversa (*TERT*) como marcadores de baja supervivencia en pacientes con glioblastoma ⁴⁶. Por esta razón decidimos estudiarlo en nuestra muestra de pacientes (Tabla 25).

Tabla 25. Porcentajes de pacientes con glioblastoma con mutaciones en el promotor de *hTERT*.

	Mutaciones en hTERT		
	g.228C>T	g.250C>T	Presencia de alguna mutación
WT	50 79.4%	37 58,7%	25 39.7%
Mutado	13 20.6%	26 41.3%	38 60.3%

Como mostramos en la tabla 25, el 60% de los tumores analizados presenta al menos una de las dos mutaciones y que la mutación mayoritaria es la g.250C>T, que aparece en el 41% de los tumores.

A pesar de que estas mutaciones están relacionadas con un peor pronóstico de los pacientes, el análisis de las supervivencias en nuestra muestra no permite confirmar esta afirmación (χ^2 g.228C>T =0.620 p=0.431; χ^2 g.250C>T =0.019 p=0.890 y χ^2 mut=0.585 p=0.444).

El análisis de la relación entre la presencia de alguna de estas mutaciones con la expresión de proteínas de autofagia no aportó resultados significativos en el caso de las proteínas LC3B-I, LC3B-II, TRAF6, PKCz, mTOR, Beclin1 y PI3KCA. No obstante, se obtuvieron diferencias significativas al analizar la presencia de la mutación g.250C>T y la presencia total de mutaciones en el promotor y la expresión de p62 (Tabla 26), observándose que una baja expresión de p62 se correlaciona con ausencia de la mutación g.250C>T (F=7.512 p=0.010) y con ausencia de cualquiera de las mutaciones analizadas del promotor (F=14.414 p=0.000).

Tabla 26. Porcentajes de pacientes según la expresión de p62 y la presencia de mutaciones en *hTERT*.

		P62		
g.250C>T		Sin expresión	Baja expresión	E. normal
WT		27	10	0
		73,0%	27,0%	0,0%
Mutado		22	1	2
		88,0%	4,0%	8,0%
Total		49	11	2
		79,0%	17,7%	3,2%
General		Sin expresión	Baja expresión	E. normal
WT		15	10	0
		60,0%	40,0%	0,0%
Mutado		34	1	2
		91,9%	2,7%	5,4%
Total		49	11	2
		79,0%	17,7%	3,2%

2.11 Análisis de la correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia y la clasificación molecular tumoral

En un estudio previo de nuestro grupo se había llevado a cabo la caracterización molecular de 24 de los glioblastomas analizados en este trabajo. Dicha caracterización molecular incluía el estudio de mutaciones de los genes *TP53*, *PTEN*, *IDH1* e *IDH2*, el estudio de expresión de p53 y EGFRvIII por inmunohistoquímica y western blot respectivamente, así como el estudio de la delección de *PTEN* y de amplificación de *EGFR* por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (datos incluidos en la tabla 29, en el anexo 1). Según *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) los glioblastomas podrían clasificarse en proneurales, mutados habitualmente en *TP53* e *IDH1*, con expresión de EGFRvIII; clásicos, caracterizados por tener mutaciones o amplificaciones en *EGFR* y *PTEN*; y mesenquimales, asociados a mutaciones en *PTEN* y *TP53*⁷².

Utilizando los datos moleculares previos de estos 24 glioblastomas clasificamos los tumores en función del subtipo molecular, observando que cuatro de ellos se podían incluir en el subtipo proneural, trece en el clásico y siete en el subtipo mesenquimal. El análisis de la relación entre la

clasificación molecular de los tumores y la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia no mostró resultados significativos en ningún caso.

3. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS BASADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Con el fin de estudiar la respuesta del glioblastoma multiforme a nuevas aproximaciones terapéuticas relacionadas con la autofagia, se seleccionaron varios fármacos: paclitaxel, un inhibidor de microtúbulos que inhibe la formación del autofagolisosoma, inhibiendo por tanto el proceso de autofagia en sus etapas finales; metformina, un conocido antidiabético que, al inhibir mTOR, activa la autofagia; Decitabina®, un análogo de pirimidina que se introduce en la doble cadena del DNA durante su síntesis e inhibe su metilación, favoreciendo la autofagia; cloroquina, un agente alcalinizante usado como antimalárico, que inhibe la actividad de las hidrolasas del lisosoma y, por tanto, inhibe la autofagia, Y Panobinostat®, un inhibidor de histonas desacetilasas que activa la autofagia. Para llevar a cabo los estudios se utilizaron las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18, LN229, cuyas mutaciones están recogidas en la tabla 4.

3.1 Caracterización del efecto del Taxol® (paclitaxel) en líneas celulares de glioblastoma multiforme

3.1.1 Estudio del efecto del Taxol® (paclitaxel) en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para evaluar el crecimiento celular tras el tratamiento con paclitaxel se realizó un ensayo de viabilidad MTT usando las concentraciones de 5, 10, 20, 35, 50 y 75nM cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 50).

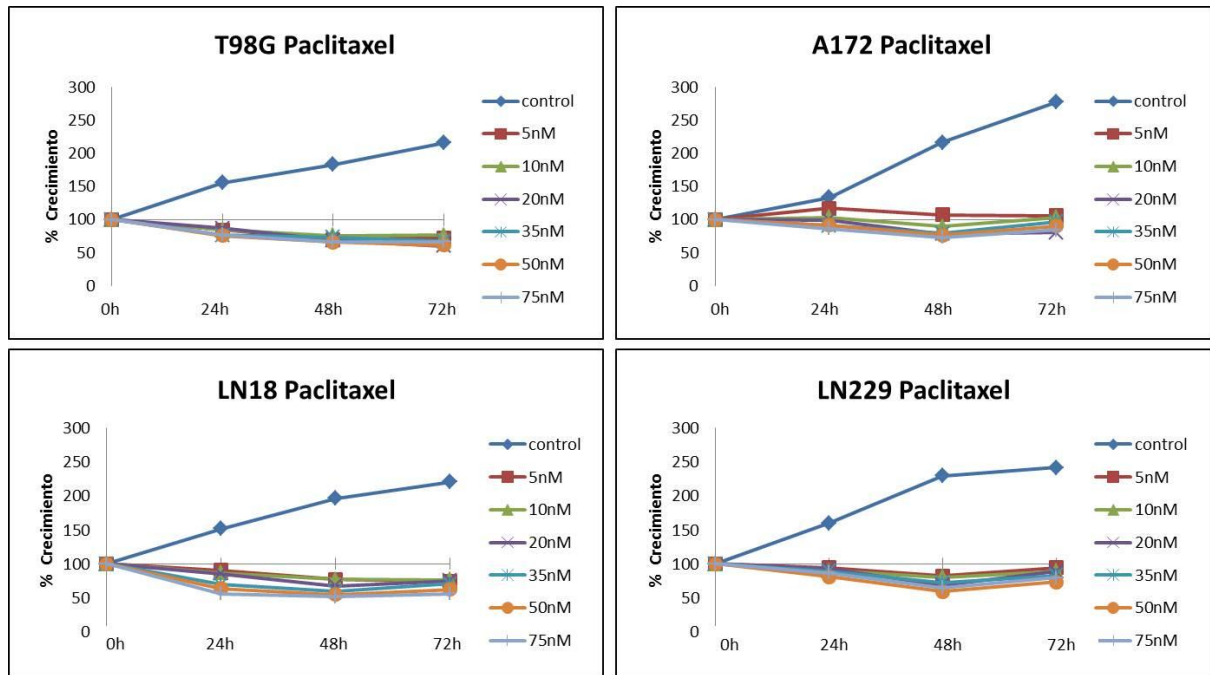


Figura 50. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 5, 10, 20, 35, 50 y 75nM de paclitaxel.

En todos los casos se vio que la mínima concentración estudiada, 5nM, era suficiente para inhibir la viabilidad celular de las líneas celulares. Por ello, ésta fue la concentración seleccionada para llevar a cabo el estudio del efecto del paclitaxel sobre el ciclo celular (Figura 51).

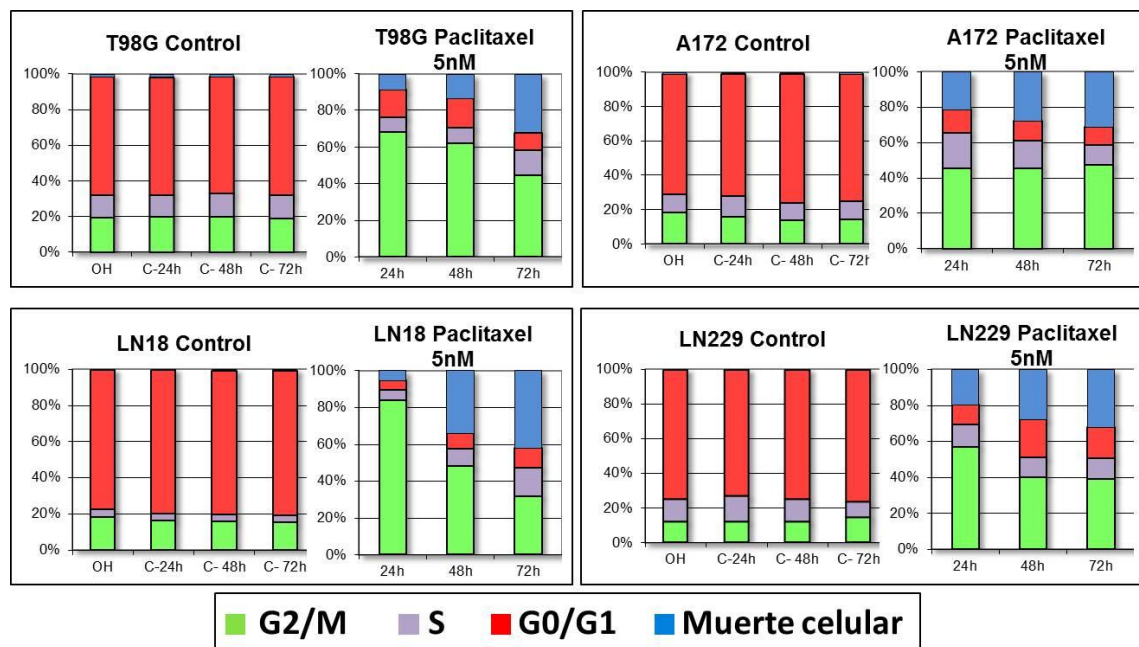


Figura 51. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 5nM de paclitaxel.

Los resultados mostraron como las líneas presentaron un bloqueo en G2/M a 24h ($p < 0.05$ en las cuatro líneas celulares). Dicho bloqueo disminuyó con el tiempo en favor de un aumento de la mortalidad celular. A las 72h de tratamiento T98G alcanzaba un 31,9% de muerte celular ($p = 0.000$), A172 un 31,43% ($p = 0.000$), LN229 un 32,49% ($p = 0.000$) y LN18 un 42,47% ($p = 0.000$), siendo la línea celular más sensible al fármaco.

3.1.2 Estudio del efecto del Taxol® (paclitaxel) en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

El análisis del efecto del paclitaxel sobre la morfología celular se realizó a las 72h de exposición al fármaco a 5nM de concentración. En todas las líneas celulares se observó un cambio brusco de morfología, perdiéndose por completo la estructura celular. La superficie celular presentaba un aspecto granuloso. El número de células se redujo respecto al control, lo que hizo que éstas aparecieran aisladas. Además, se pudo ver presencia de vesículas y material celular en el medio extracelular en todos los casos. La línea LN18 presentaba múltiples cuerpos apoptóticos (Figura 52).

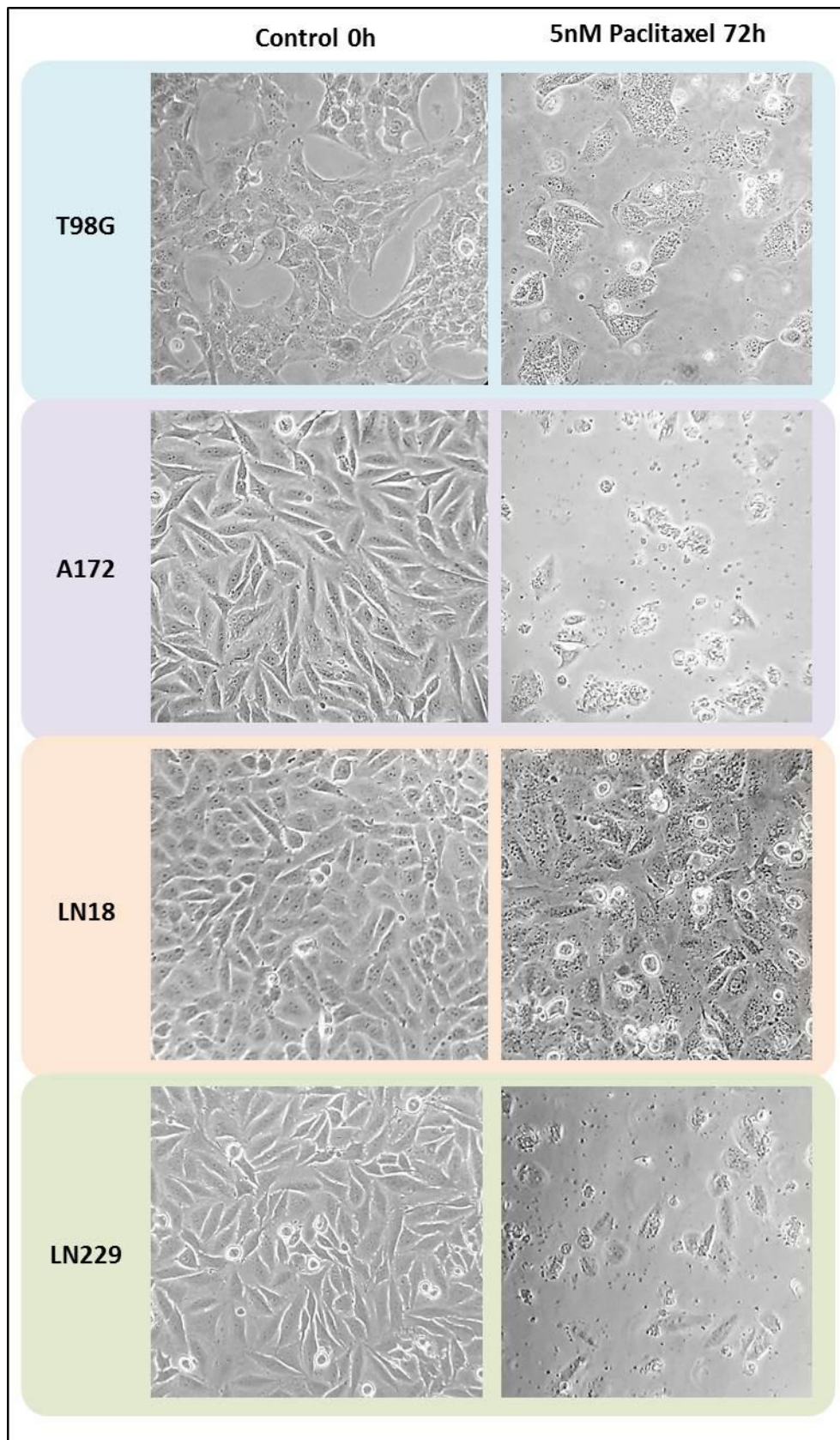


Figura 52. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM. Imágenes tomadas a 20X.

3.1.3 Análisis del efecto del Taxol® (paclitaxel) en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para analizar el efecto del paclitaxel sobre la autofagia se estudió por western blot la expresión de las proteínas LC3B, p62 y Beclin1 en las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229 tratadas con el fármaco a 5nM durante 24, 48 y 72h. Además, se estudió la expresión de mTOR en las líneas A172 y LN229, que fueron seleccionadas por tener PTEN mutado y PTEN germinal respectivamente. En todos los casos se utilizó un control a 0h sin tratamiento. En estas dos líneas celulares se estudió también por inmunofluorescencia las proteínas p62, LC3B, mTOR y α -tubulina.

El estudio de expresión de p62 mostró resultados heterogéneos. Las líneas T98G y A172 presentaban un ligero aumento de la expresión de la proteína, seguido de una disminución moderada a las 72h. La línea LN229 presentaba un aumento de la expresión a lo largo del tiempo y la línea LN18 mantenía una expresión constante de la proteína (Figura 53).

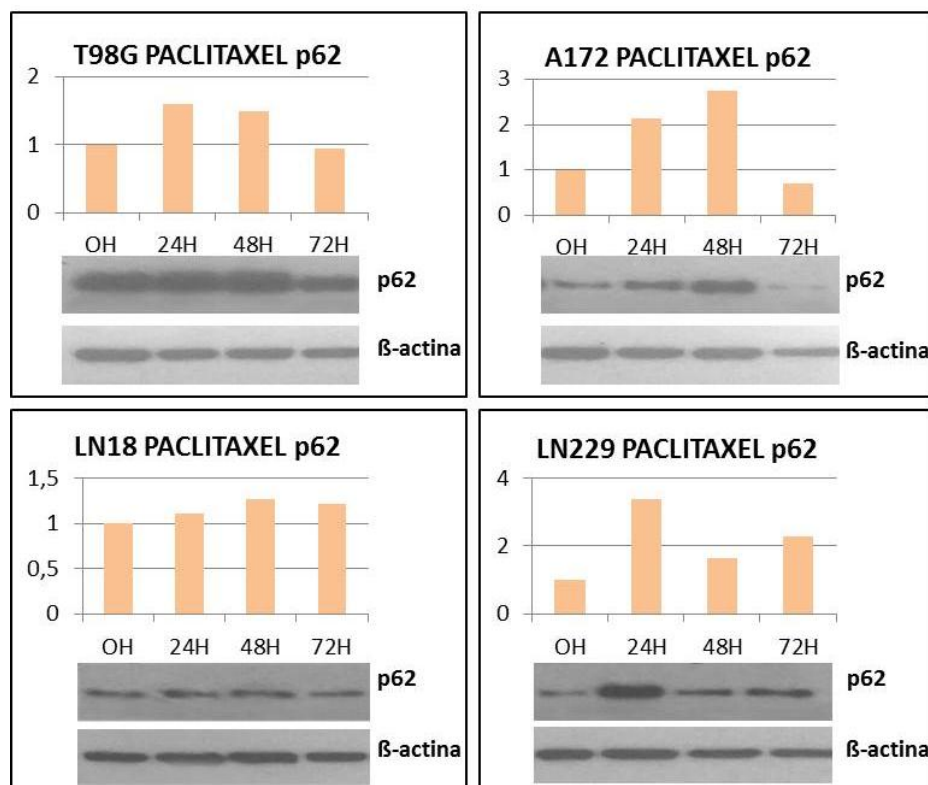


Figura 53. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

La expresión de LC3B fue variable en función de la línea celular. LC3B-II disminuía tras 72h de tratamiento con paclitaxel en las líneas A172 y LN18. No obstante, en la línea LN229 su expresión aumentaba, mientras que en T98G aumentaba sutilmente hasta las 48 horas de exposición. La proteína LC3B-I disminuía de manera notable en todas las líneas celulares (Figura 54).

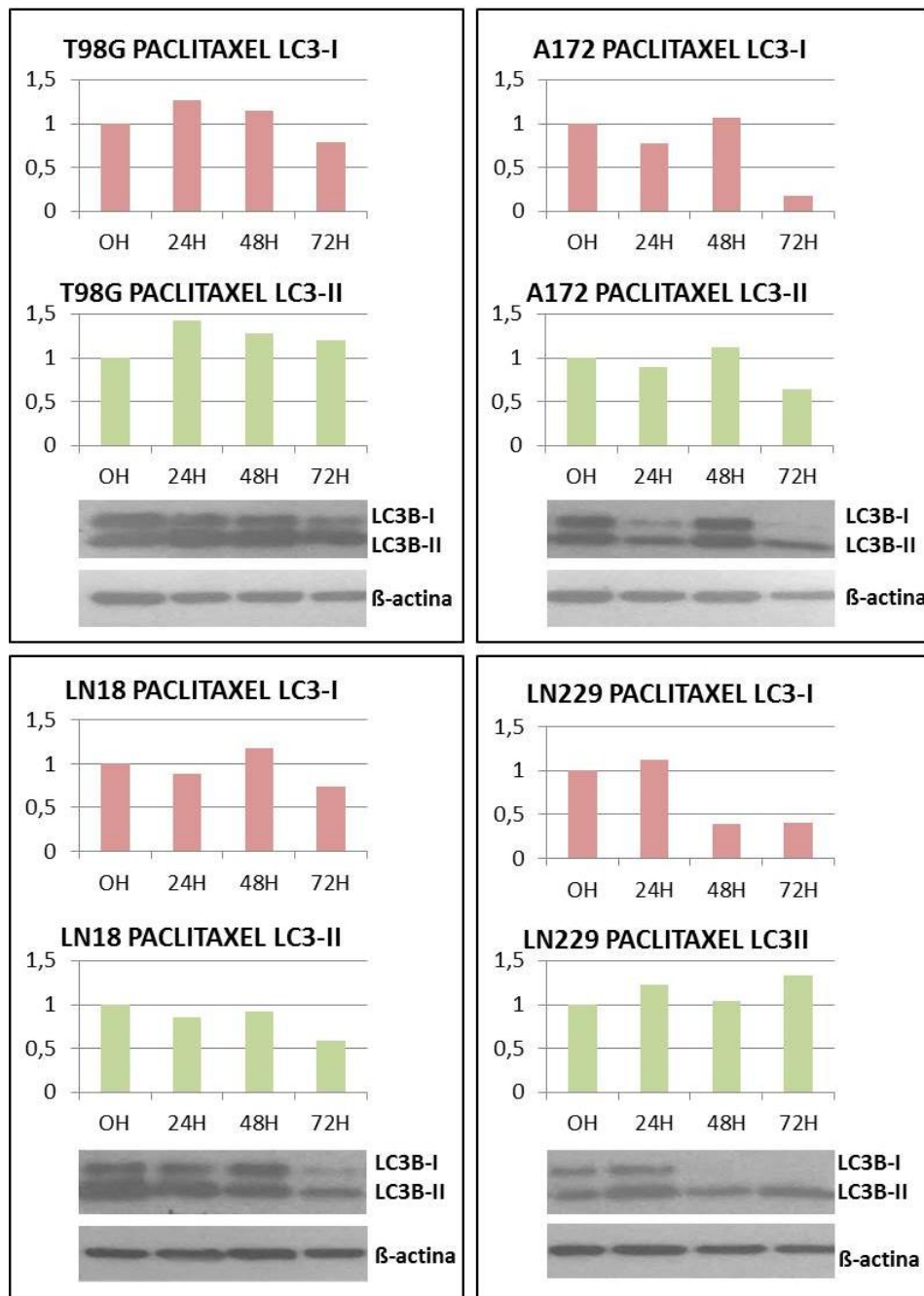


Figura 54. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/ β -actina.

La β -actina es el control de carga.

El estudio de expresión de Beclin1 mostró en todas las líneas celulares una disminución notable a 72h de tratamiento con el fármaco (Figura 55).

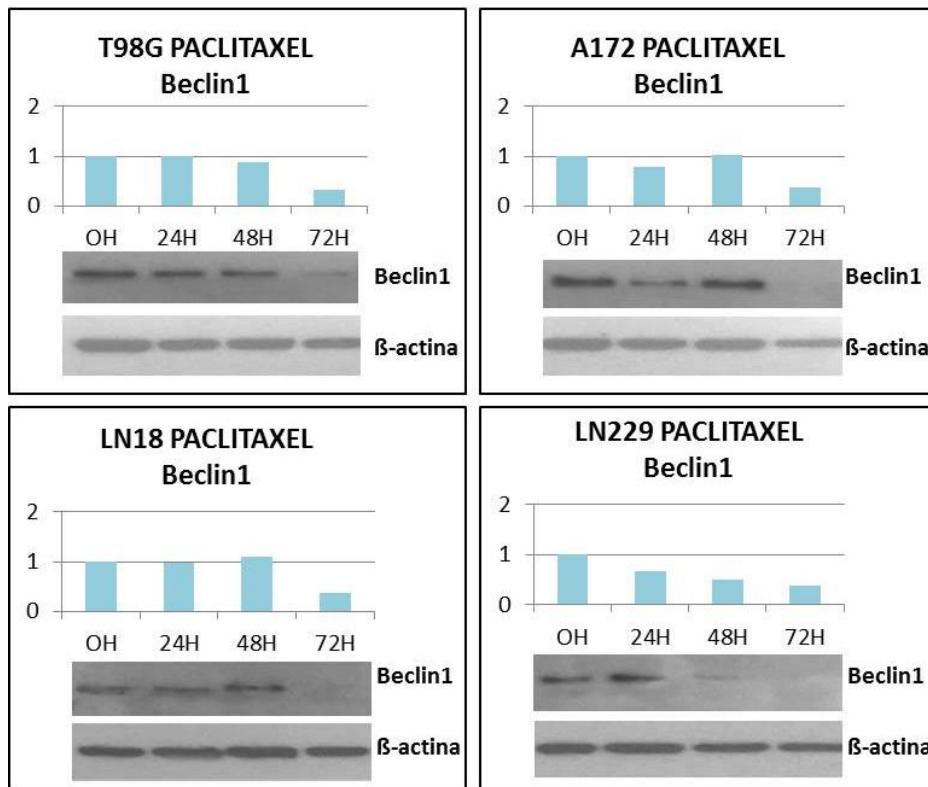


Figura 55. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/β-actina. La β-actina es el control de carga.

El estudio de expresión de mTOR mostró un aumento de la expresión de la proteína en las dos líneas celulares estudiadas, muy sutil en LN229 y más notable en A172, en la que llega a cuadruplicar su expresión (Figura 56).

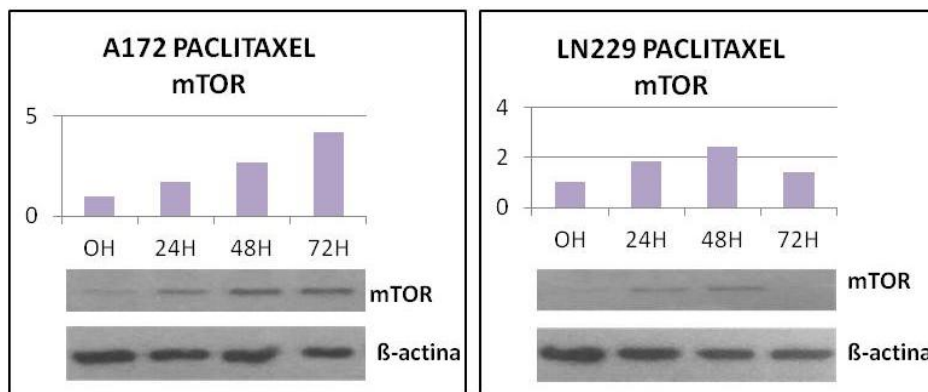


Figura 56. Expresión de la proteína mTOR en las líneas celulares tumorales A172 y LN229 en tratamiento con paclitaxel 5nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/β-actina. La β-actina es el control de carga.

Tras incubar las líneas A172 y LN229 con paclitaxel 5nM se procedió a estudiar la expresión y localización de las proteínas p62, LC3B, mTOR y α-tubulina mediante inmunofluorescencia.

Del mismo modo que en el western blot, se pudo observar como la expresión de p62 disminuía en A172 y se localizaba fundamentalmente en la zona del núcleo celular. En la línea celular

LN229 la expresión se incrementó, pudiéndose observar acúmulos de proteína por todo el citoplasma (Figura 57).

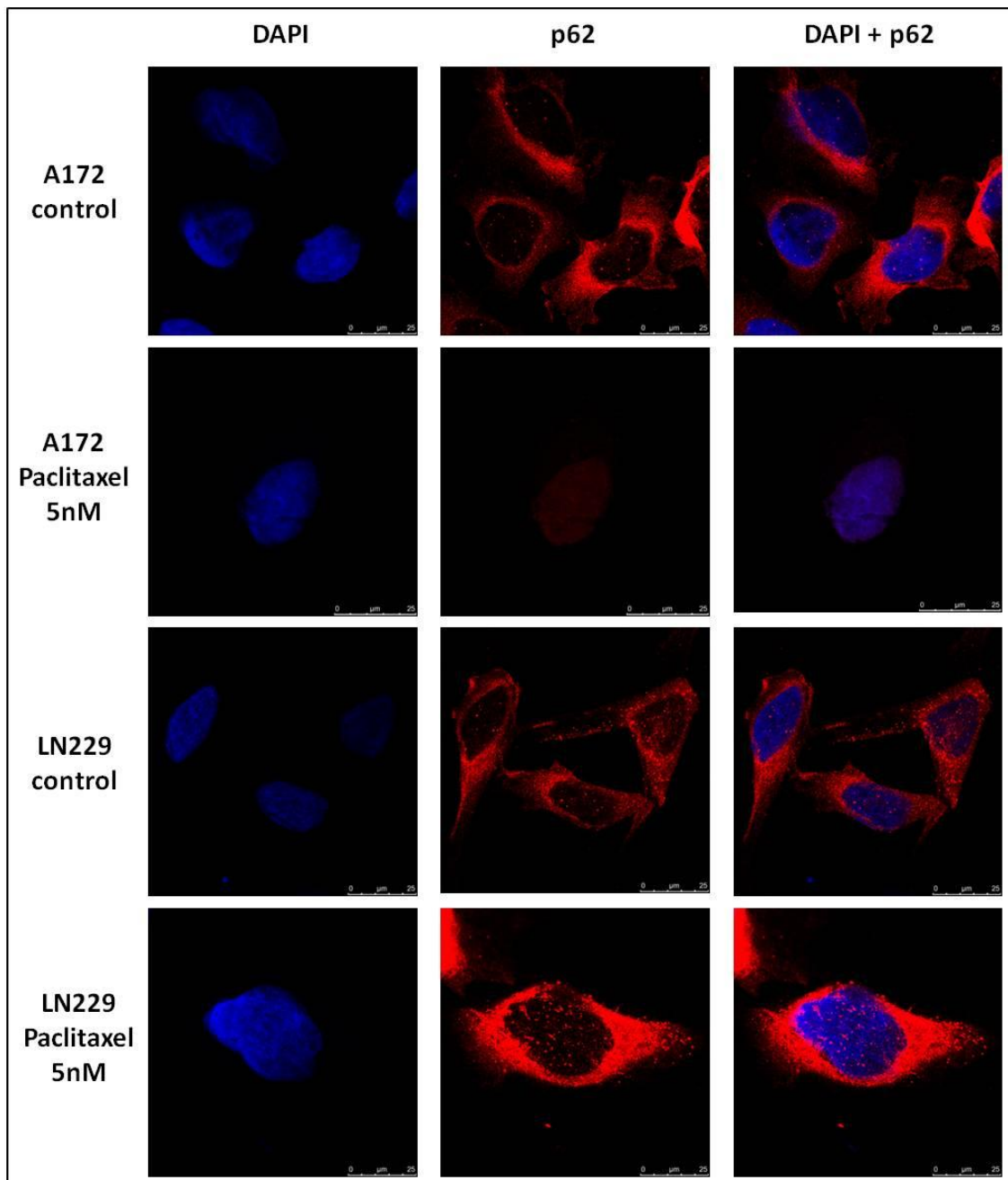


Figura 57. Inmunofluorescencia de p62 en líneas celulares de glioblastoma tras 72h en tratamiento con paclitaxel 5nM. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI en azul. p62 se muestra en rojo.

En el caso de la proteína LC3B se pudo ver como su expresión aumentaba en ambas proteínas, al igual que en el western blot, observándose acúmulos de LC3B por toda la célula (Figura 58).

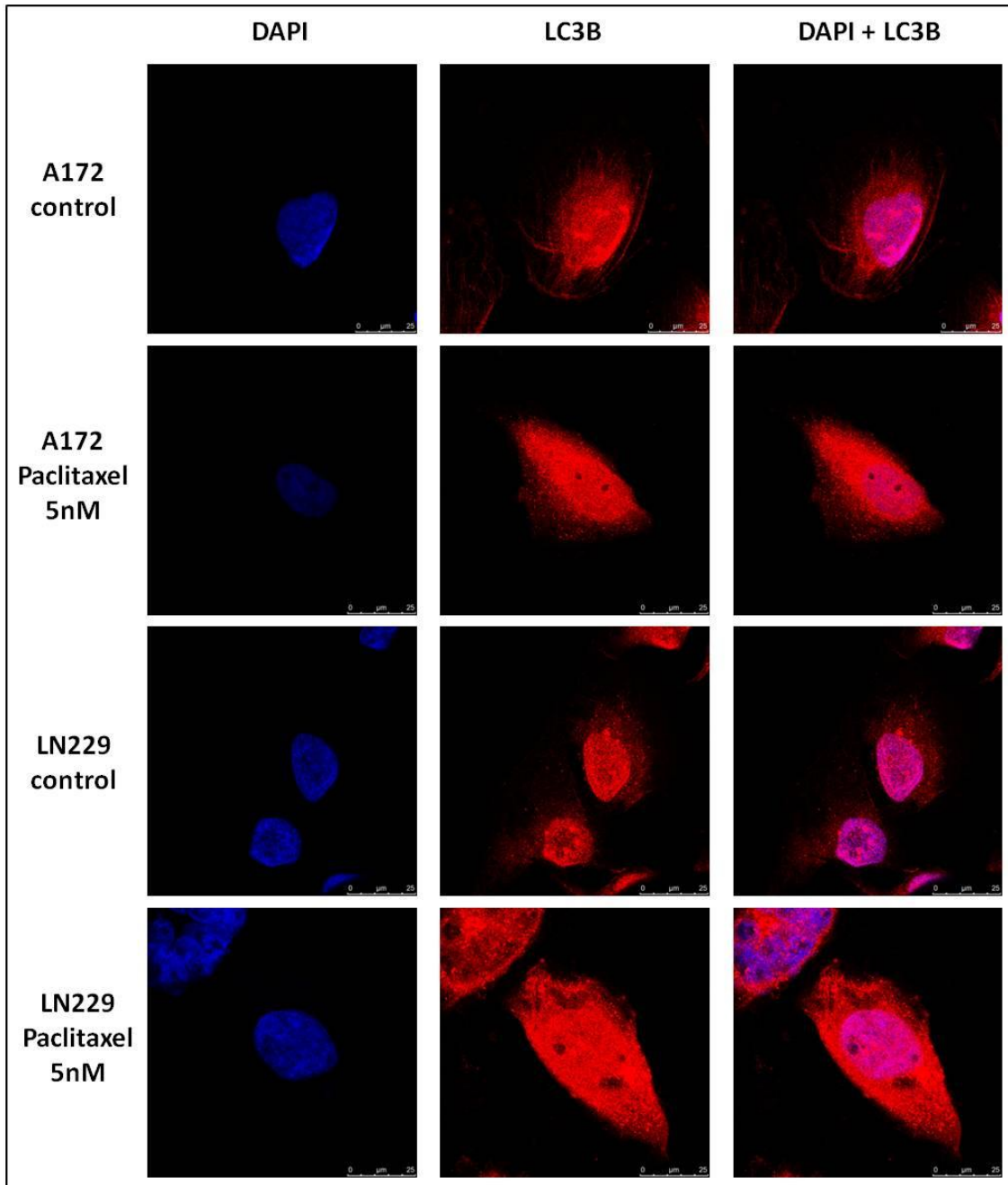


Figura 58. Inmunofluorescencia de LC3B en líneas celulares de glioblastoma tras 72h en tratamiento con paclitaxel 5nM.

Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI en azul. LC3B se muestra en rojo.

La expresión de mTOR aumentó ligeramente en las líneas A172 y LN229, mostrándose tenues acúmulos de la proteína por todo el citoplasma (Figura 59).

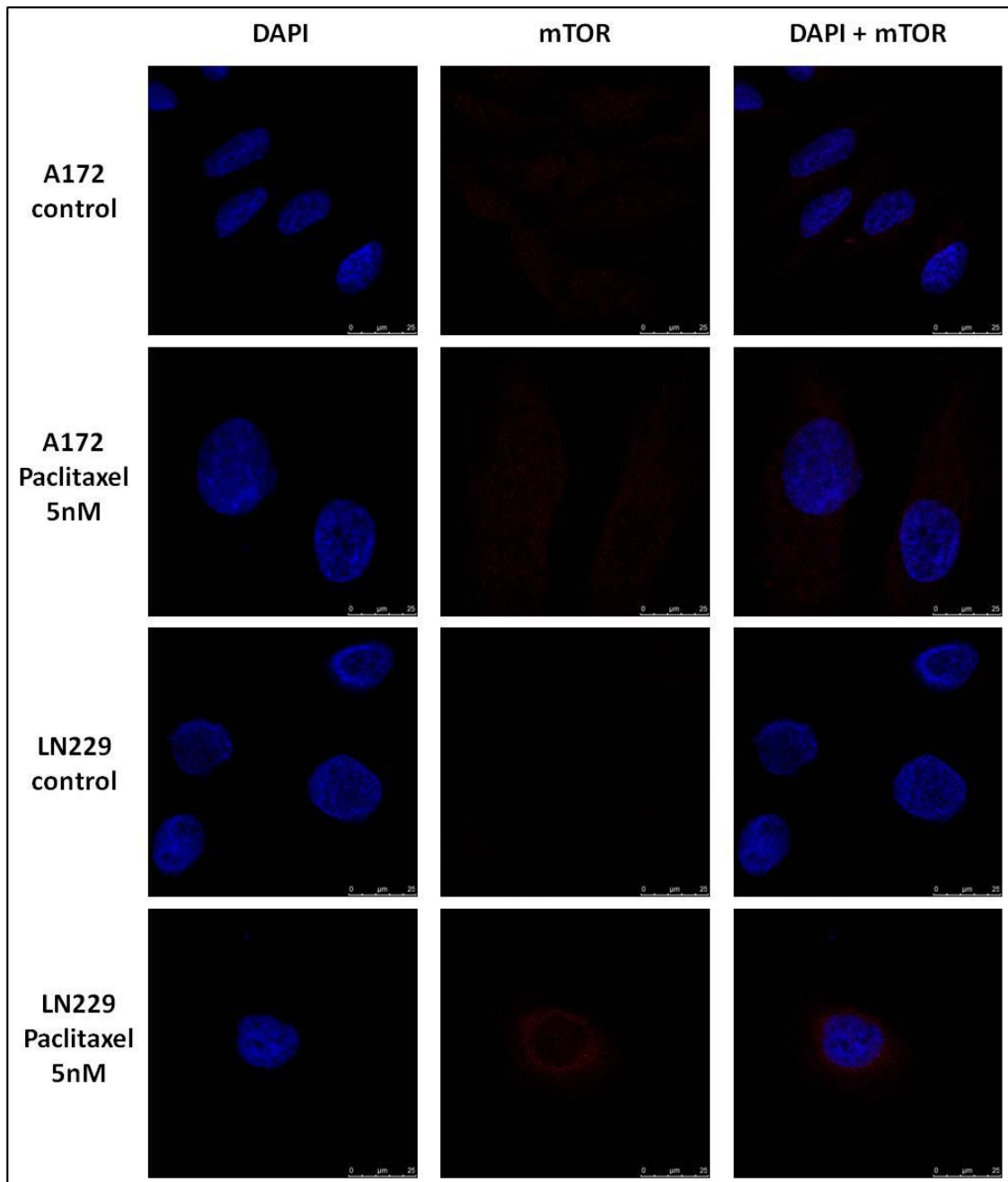


Figura 59. Inmunofluorescencia de mTOR en líneas celulares de glioblastoma tras 72h en tratamiento con paclitaxel 5nM.

Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI en azul. mTOR se muestra en rojo.

La expresión de la α -tubulina fue la más alterada por el tratamiento. En ambas líneas se observó como la proteína perdía su capacidad para formar la estructura filamentosa habitual de los microtúbulos que da forma a las células, observándose, por tanto, células más redondeadas con un citoesqueleto alterado (Figura 60).

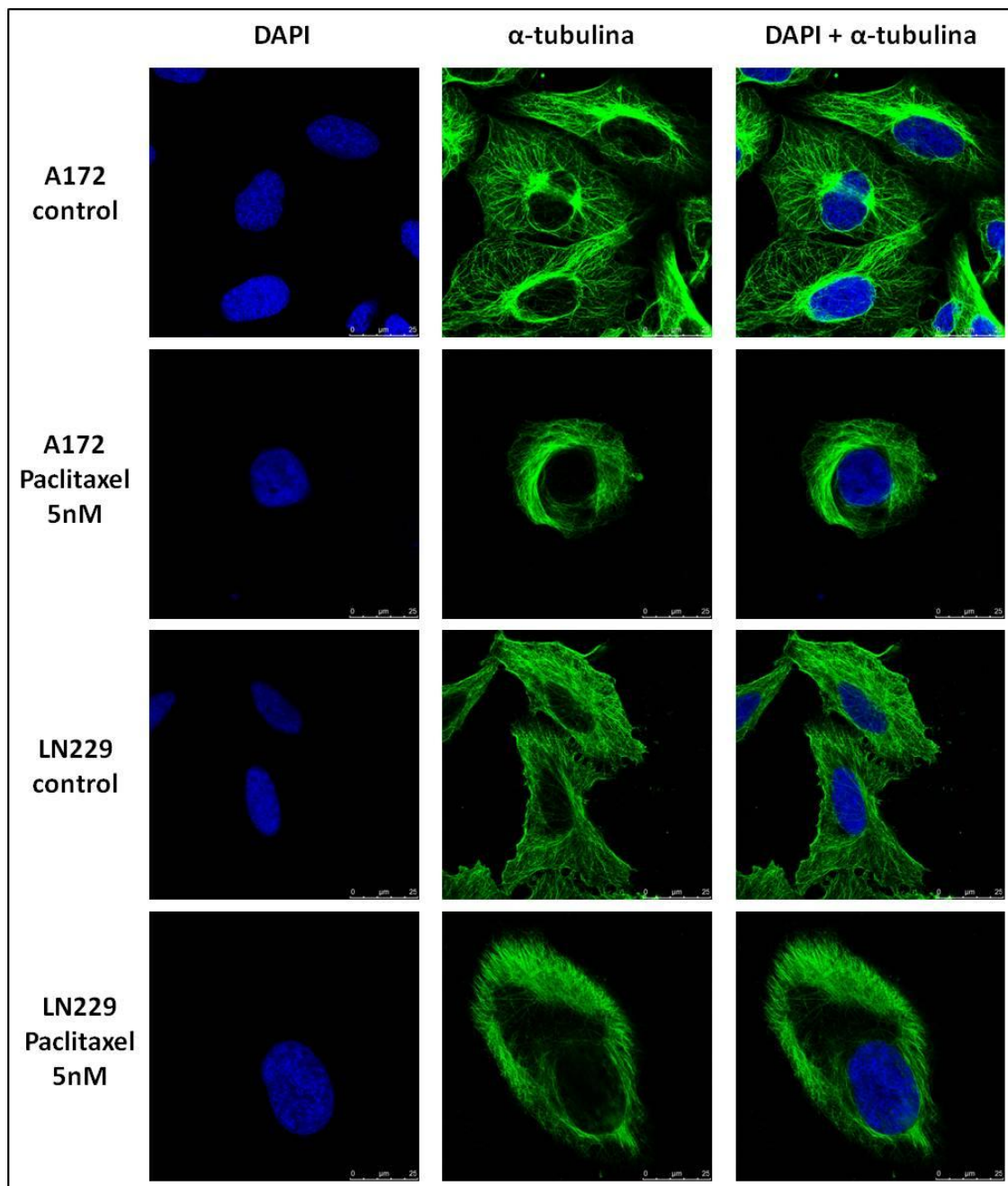


Figura 60. Inmunofluorescencia de α -tubulina en líneas celulares de glioblastoma tras 72h en tratamiento con paclitaxel 5nM. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI en azul. α -tubulina se muestra en verde.

3.2 Caracterización del efecto de la metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

3.2.1 Estudio del efecto de la metformina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para evaluar el crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con metformina se llevó a cabo un ensayo de viabilidad MTT usando las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 6.5 y 8mM cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 61).

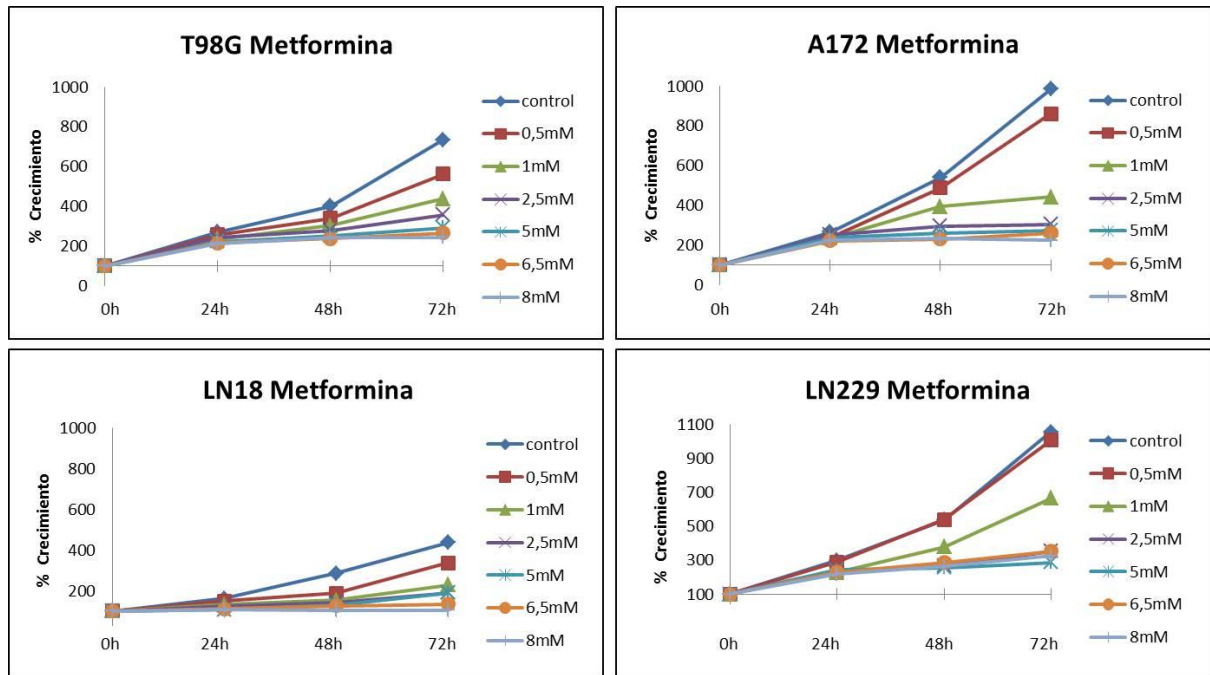


Figura 61. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 0.5, 1, 2.5, 5, 6.5 y 8mM de metformina.

En todas las líneas se vio una disminución de la viabilidad a medida que se utilizaban concentraciones crecientes del fármaco. No obstante, tan sólo la línea LN18 presentó una inhibición de la viabilidad a las concentraciones usadas. En concreto a 8mM. Es por ello que ésta fue la concentración de fármaco elegida para llevar a cabo el estudio de ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 62).

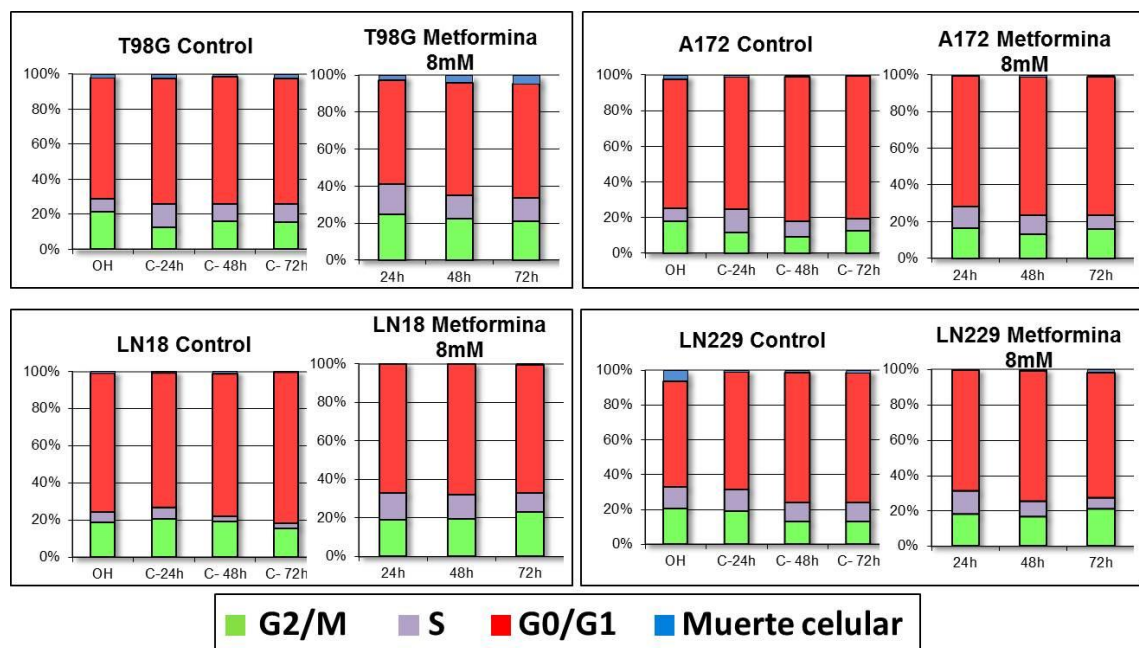


Figura 62. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM.

El análisis de los resultados no mostró cambios significativos en el ciclo celular de las líneas A172 y LN229. No obstante, la línea LN18 parecía mostrar un ligero bloqueo en la fase S ($p=0.045$). La línea T98G es la más sensible a este fármaco al alcanzar un 4,6% de muerte celular a las 72h de exposición al tratamiento ($p=0.008$).

Debido a que LN18 fue la única línea que mostraba disminución de la viabilidad celular a la concentración de estudio, fue seleccionada para llevar a cabo un estudio a largo plazo. En este caso, se estudió el efecto de la metformina sobre el ciclo celular tras una exposición al fármaco de tres semanas (Figura 63).

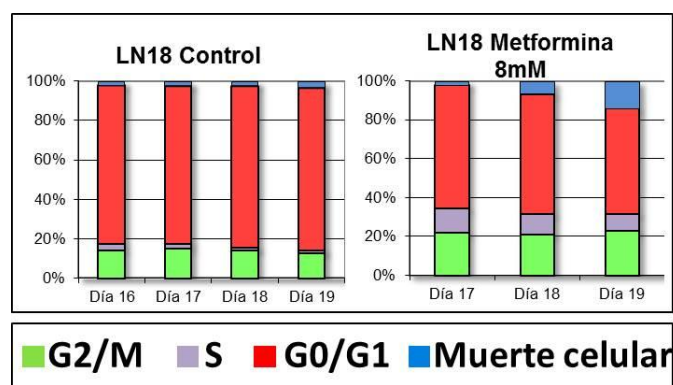


Figura 63. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de la línea celular de glioblastoma multiforme LN18 a las tres semanas de tratamiento con metformina 8mM.

Con este estudio se pudo observar como existe una tendencia de aumento de la mortalidad a lo largo del tiempo, alcanzando el 12,8% el día 19 de tratamiento ($p=0.026$).

3.2.2 Estudio del efecto de la metformina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Tras 72h en tratamiento con metformina 8mM se analizó la morfología de las líneas celulares. En todos los casos se observaron cambios en la morfología de las células y aparición de vesículas intracelulares, especialmente llamativas y grandes en la línea A172. La línea LN229 redujo su tamaño y desarrolló numerosos filopodios. En el caso de T98G, se alteró su estructura celular de manera que las células unidas formaban estructuras triangulares muy llamativas (Figura 64).

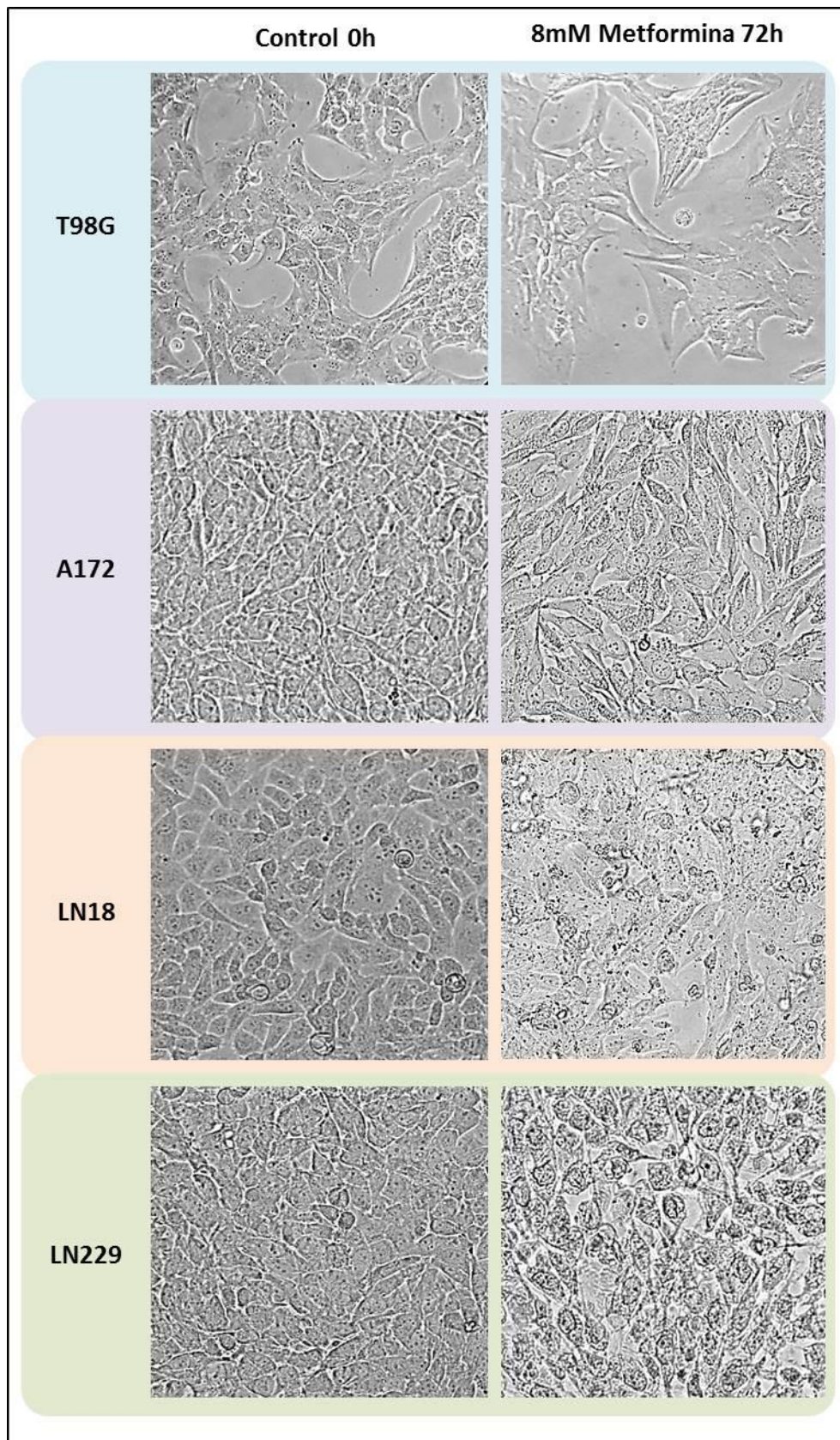


Figura 64. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM. Imágenes tomadas a 20X.

3.2.3 Análisis del efecto de la metformina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para analizar el efecto de la metformina sobre la autofagia se estudiaron por western blot las proteínas LC3B, p62, Beclin1 y mTOR en las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229. Para ello, se trataron con el fármaco a concentración 8mM durante 24, 48 y 72h. En todos los casos se utilizó un control a 0h sin tratamiento.

La expresión de p62 se redujo tras 72h de tratamiento en todas las líneas celulares. Sin embargo, las líneas T98G y LN229 desarrollaron un aumento transitorio de expresión de p62, tras 24h, tras lo cual se produjo la disminución de la expresión (Figura 65).

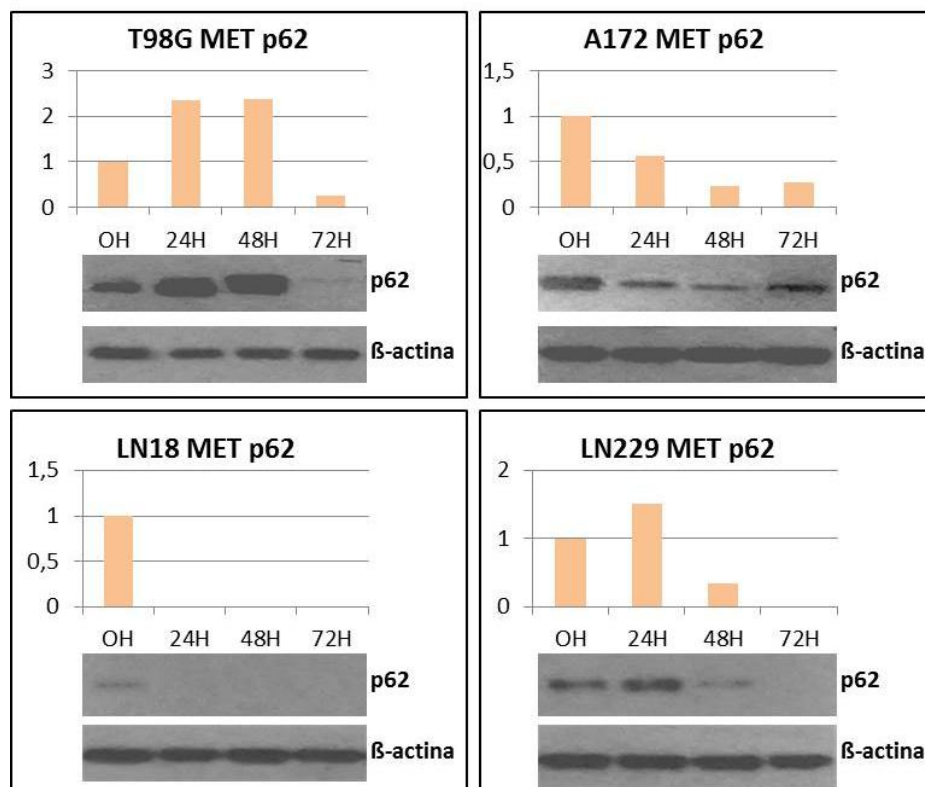


Figura 65. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/β-actina. La β-actina es el control de carga.

El estudio de la expresión de LC3B reveló un moderado aumento de LC3B-II en las líneas A172, LN18 y LN229, mientras que en T98G la expresión se mantenía constante. La forma citosólica LC3B-I disminuía en T98G y LN229, mientras que aumentaba ligeramente en LN18 y se mantenía constante en A172 (Figura 66).

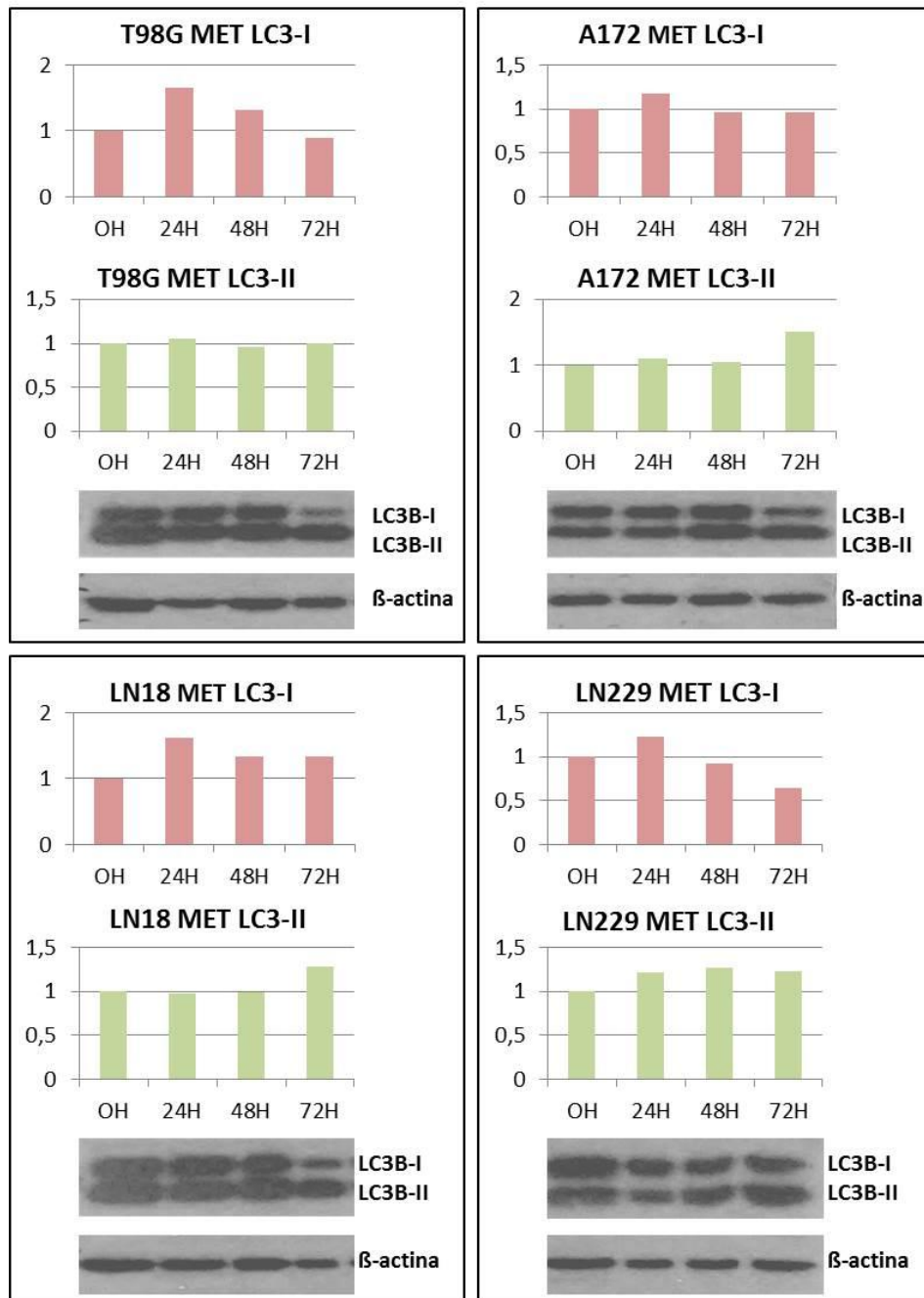


Figura 66. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

En el caso de Beclin1, todas las líneas celulares mostraron una disminución de la expresión de la proteína (Figura 67).

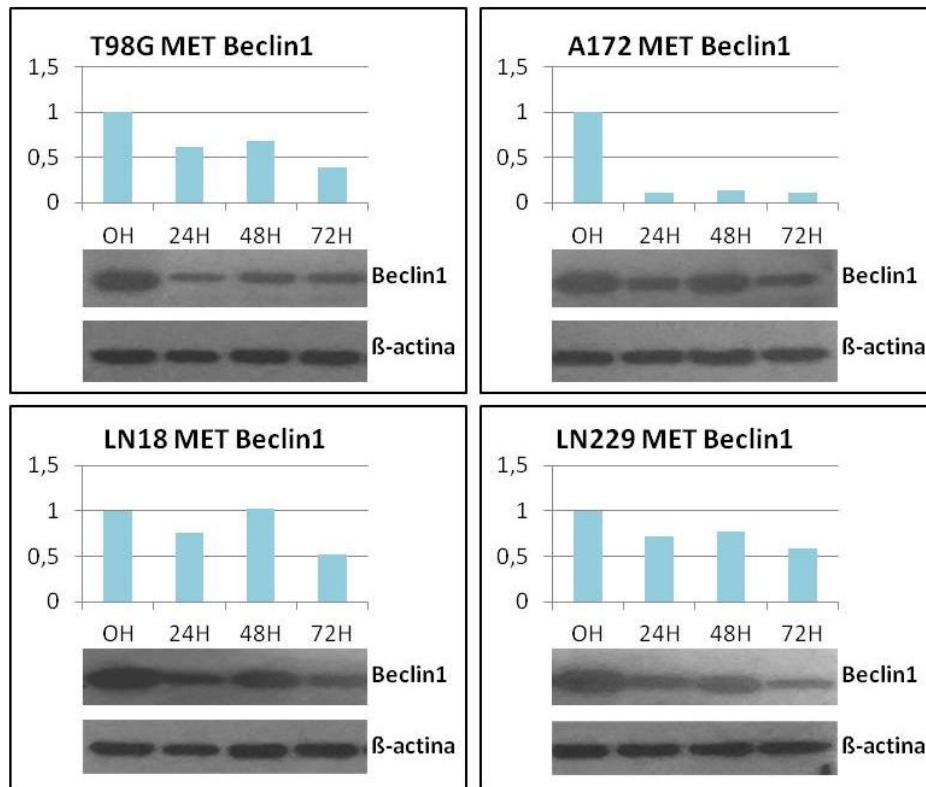


Figura 67. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/ β -actina. El β -actina es el control de carga.

Finalmente, en el caso del estudio de la proteína mTOR, se observó una desaparición de la expresión de la misma tras 24h de tratamiento, que se mantiene a las 72h de exposición al fármaco, en todas las líneas celulares (Figura 68).

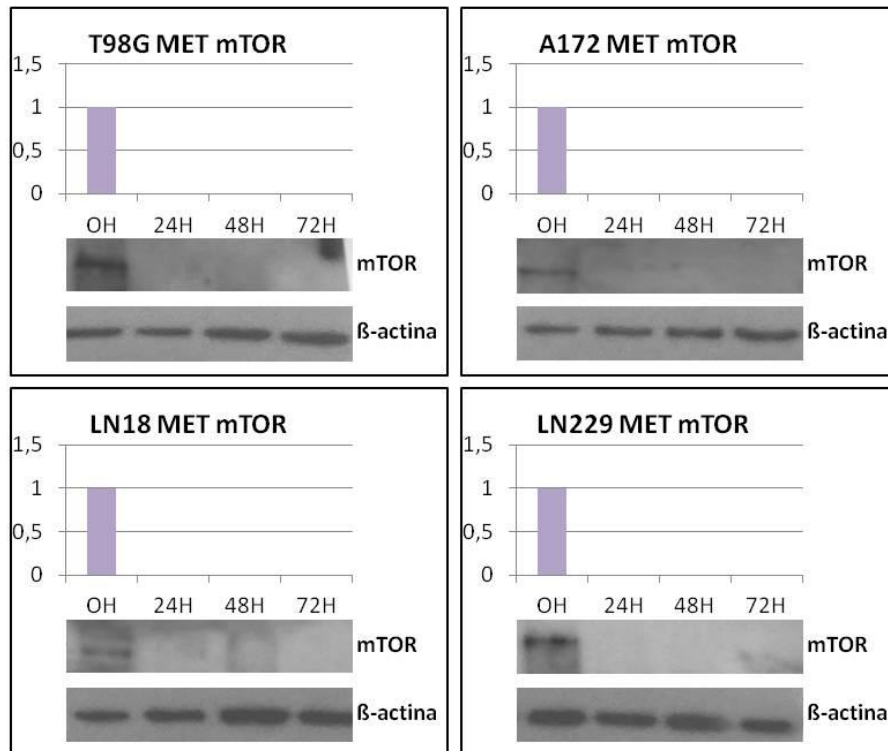


Figura 68. Expresión de la proteína mTOR en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

Para completar el análisis del efecto de la metformina 8mM sobre la autofagia se estudiaron por western blot las proteínas LC3B, p62, Beclin1 y mTOR en la línea LN18 tras tres semanas de tratamiento. Los datos se analizan a los tiempos de 17, 18 y 19 días de tratamiento con un control para cada tiempo.

La expresión de p62 con tratamiento mostró un aumento para terminar desapareciendo al día 19. Mientras, en la línea control sin tratamiento, la proteína p62 aumenta exponencialmente con el tiempo (Figura 69).

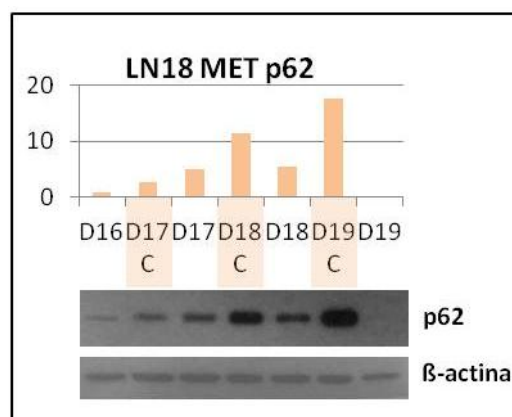


Figura 69. Expresión de la proteína p62 en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/ β -actina. La β -actina es el control de carga. C: control. D: día.

La expresión de LC3B-II se mantuvo relativamente constante con el tratamiento de metformina. Mientras, la expresión de LC3B-I fue disminuyendo con el tiempo (Figura 70).

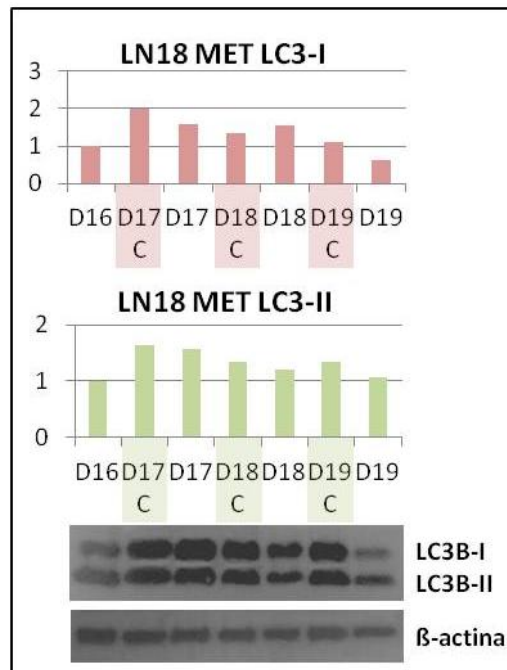


Figura 70. Expresión de la proteína LC3B en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio LC3B/β-actina. La β-actina es el control de carga. C: control. D: día.

En el caso de Beclin1, se fue observando una disminución gradual de la expresión que termina en la desaparición total de la misma. La expresión en el control se mantuvo constante a lo largo del tiempo (Figura 71).

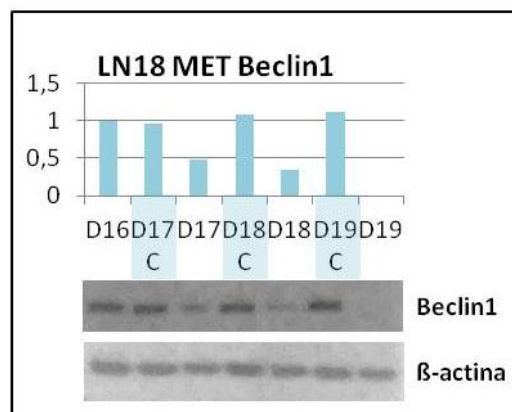


Figura 71. Expresión de la proteína Beclin1 en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/β-actina. La β-actina es el control de carga. C: control. D: día.

El estudio de expresión de mTOR mostró que los valores de expresión fueron disminuyendo a medida que transcurría la exposición al tratamiento, tal y como se esperaría al ser la metformina un inhibidor de esta proteína (Figura 72).

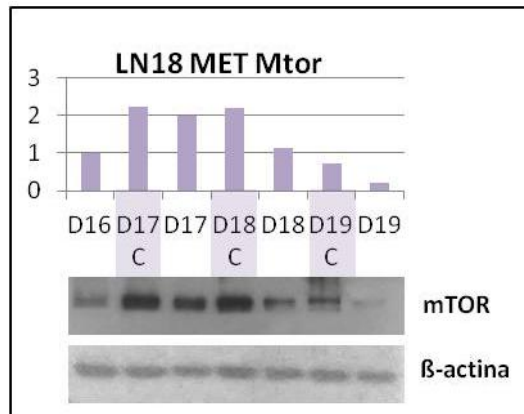


Figura 72. Expresión de la proteína mTOR en la línea celular LN18 en tratamiento con metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio mTOR / β -actina. La β -actina es el control de carga. C: control. D: día.

3.3 Caracterización del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

La evaluación *in vitro* del tratamiento con Decitabina® en diversos tipos tumorales había sido llevada a cabo en nuestro laboratorio con anterioridad, obteniéndose resultados poco prometedores (no mostrados). Es por ello que decidimos estudiar la Decitabina® únicamente en sinergia con otros fármacos, como son la metformina y la cloroquina.

3.3.1 Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

La evaluación de la supervivencia y el crecimiento celular en tratamiento con Decitabina® y metformina se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad MTT usando metformina 8mM y combinándola con 0.5, 1, 2, 3 y 6 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina. El estudio se realizó cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 73).

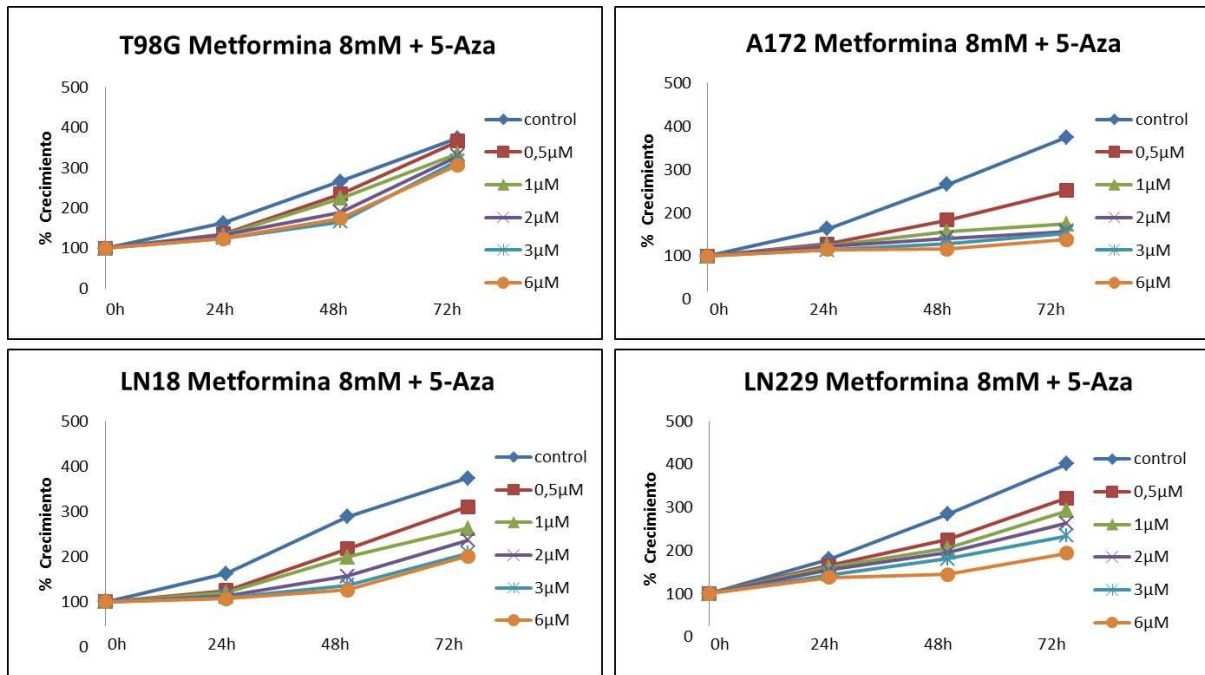


Figura 73. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 0.5, 1, 2, 3 y 6µM de Decitabina® y metformina 8mM.

En todos los casos se observó que las líneas muestran una disminución de la viabilidad celular a medida que aumentan las concentraciones de 5-aza-2'-desoxicitidina. No obstante, ninguna de las líneas alcanza la inhibición total de su crecimiento. Es por ello que se seleccionó la concentración máxima de 6µM de Decitabina® para analizar el efecto de la sinergia sobre el ciclo celular (Figura 74).

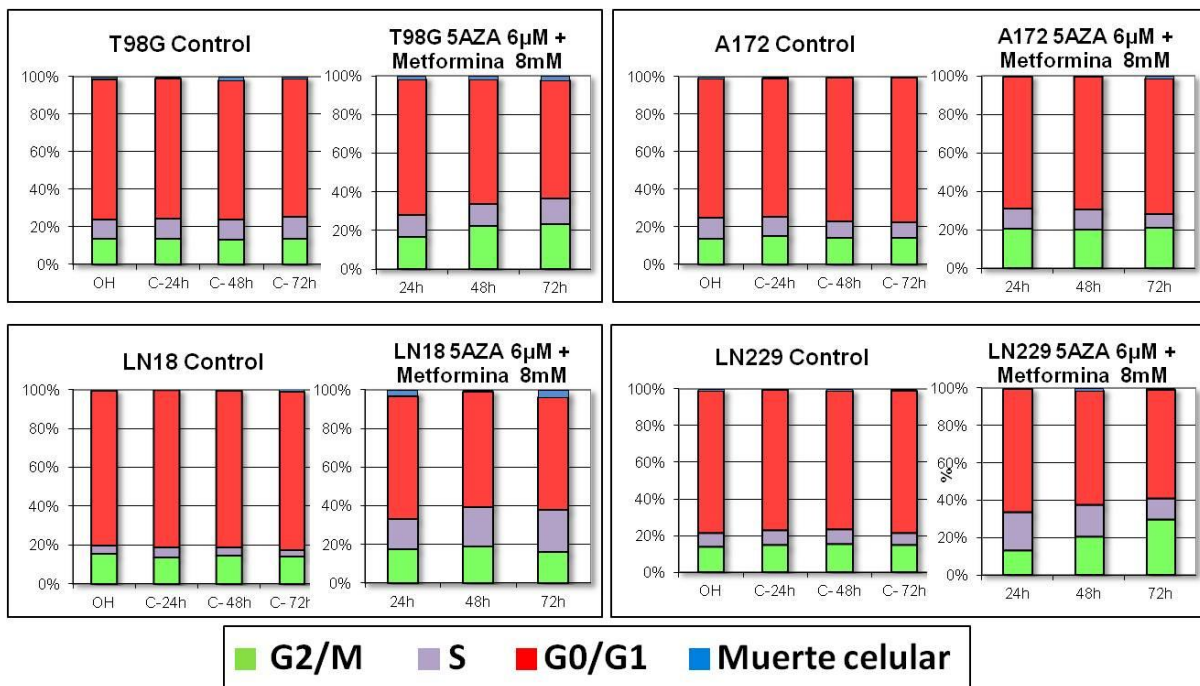


Figura 74. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6µM de Decitabina® y metformina 8mM.

El análisis de los resultados no mostró cambios importantes en el ciclo celular de las líneas celulares estudiadas. No obstante, la línea LN18 parecía mostrar un bloqueo en la fase S que alcanza el 21,84% a 72h ($p=0.000$). La línea LN229 también mostró un aumento de la fase S a las 24h (20,75%; $p=0.001$). Sin embargo, este aumento fue disminuyendo a medida que transcurría el tratamiento en favor de un aumento de la fase G2/M, que alcanzó el 29.73% a las 72h ($p=0.000$).

3.3.2 Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

El estudio del efecto de la sinergia 6 μ M de Decitabina® con metformina 8mM sobre la morfología celular fue analizado tras 72h en tratamiento en las líneas celulares de glioblastoma multiforme. Las líneas A172 y LN229 apenas mostraron diferencias morfológicas respecto a los controles. En la línea LN18 se pudieron observar numerosas vesículas intracelulares, aunque la forma de la célula no se modificó. El cambio morfológico más llamativo se produjo en la línea T98G, que disminuyó el tamaño de su citoplasma y desarrolló múltiples filopodios (Figura 75).

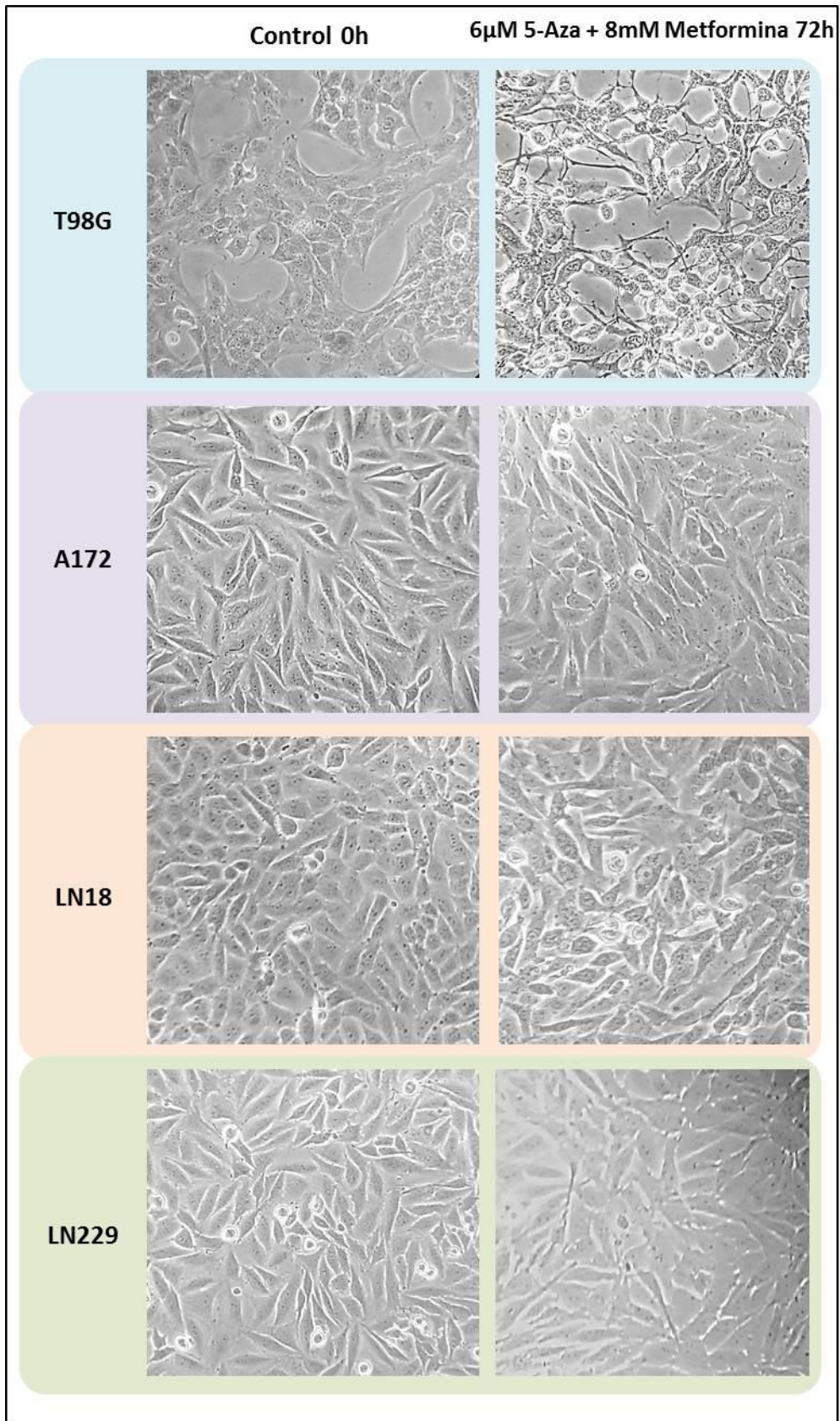


Figura 75. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6 μ M de Decitabina® y metformina 8mM. Imágenes tomadas a 20X.

3.3.3 Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para analizar el efecto de la Decitabina® en sinergia con metformina sobre la autofagia se estudió la expresión de las proteínas LC3B, p62 y Beclin1 en las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229 tratadas con los fármacos a 6 μ M y 8mM respectivamente.

El estudio de expresión de p62 mostró una ligera disminución de la proteína en la línea LN229. Al contrario que LN18, que presentó un aumento de expresión. Las líneas T98G y A172 presentaron una expresión similar a la basal tras 72h de tratamiento (Figura 76).

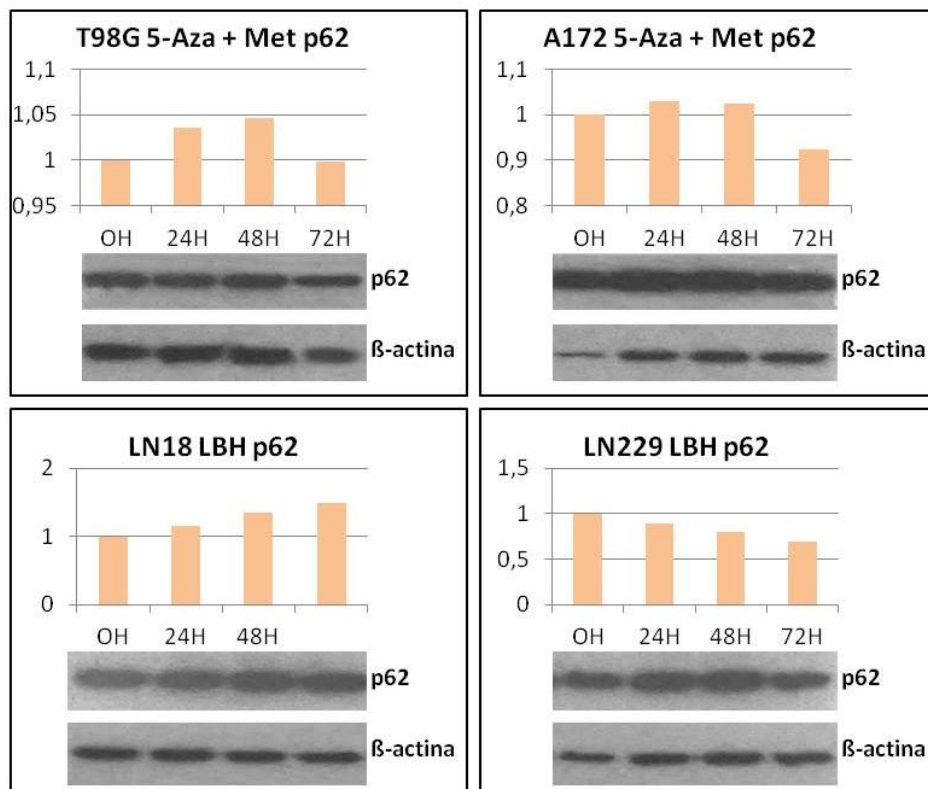


Figura 76. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/β-actina. La β-actina es el control de carga.

La expresión de LC3B-II no varió respecto al control en la línea T98G. Sin embargo su expresión aumentó en A172, LN18 y LN229. La tendencia de expresión de LC3B-I se asemejó a la de LC3B-II (Figura 77).

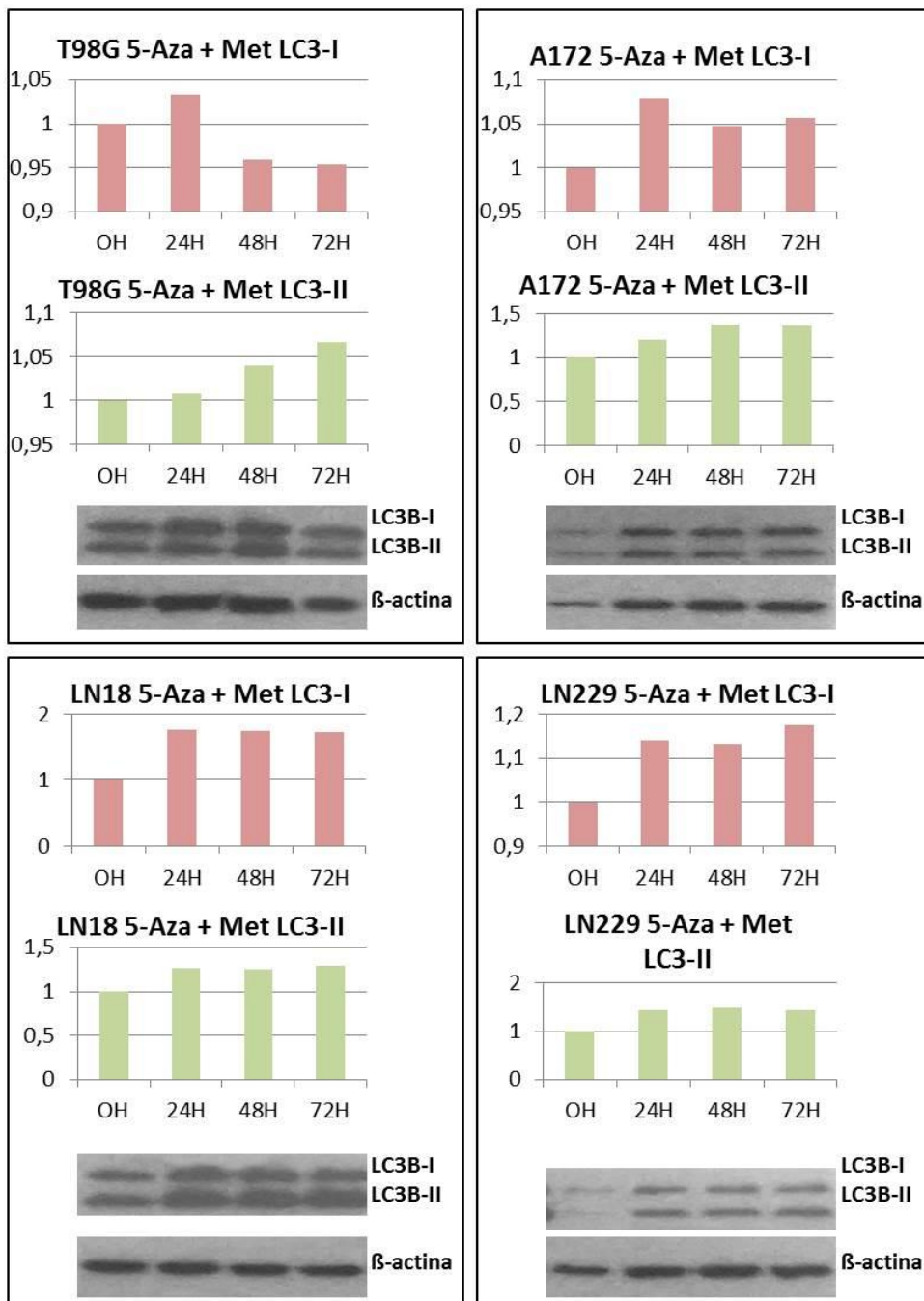


Figura 77. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

El estudio de la expresión de Beclin1 mostró que las líneas celulares presentaban niveles de expresión similares al del control tras 72h de tratamiento (Figura 78).

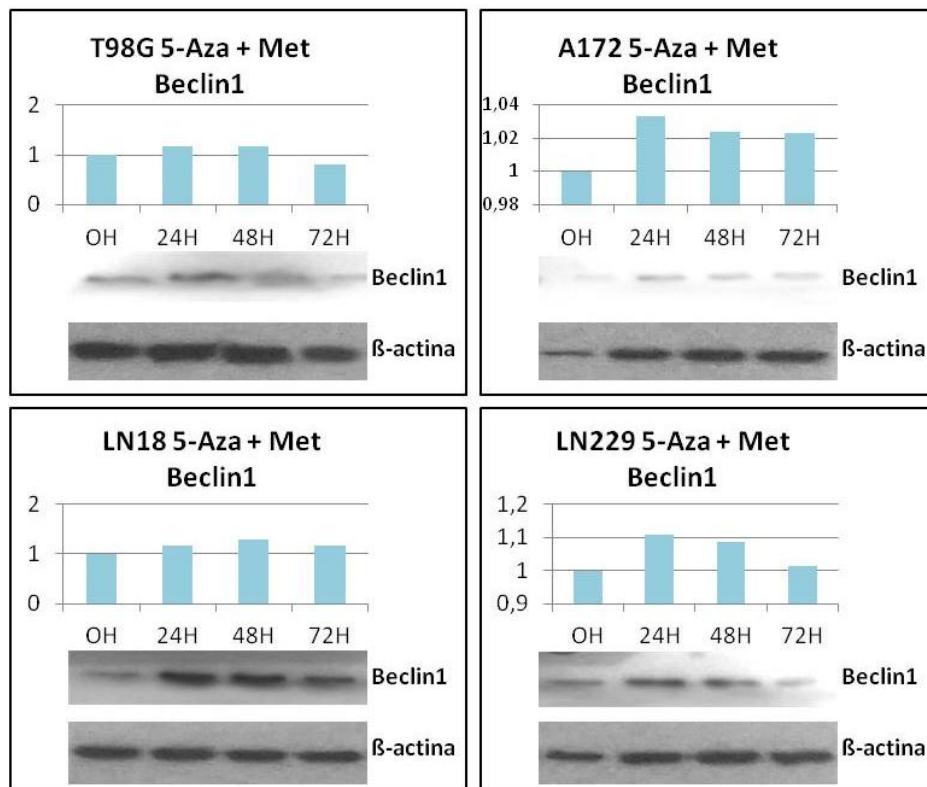


Figura 78. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y metformina 8mM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/β-actina. La β-actina es el control de carga.

3.4 Caracterización del efecto de la cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

3.4.1 Estudio del efecto de la cloroquina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

El crecimiento y la supervivencia celular en respuesta al tratamiento con cloroquina se evaluó mediante un ensayo de viabilidad MTT usando las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125μM cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 79).

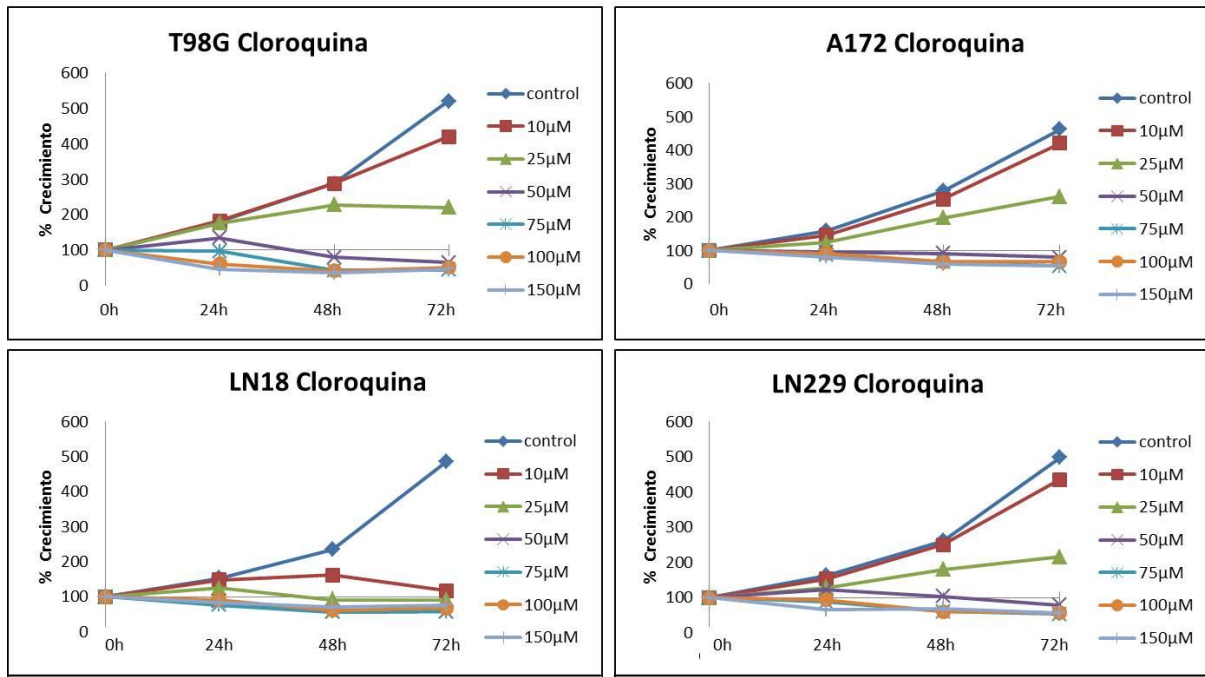


Figura 79. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 10, 25, 50, 75, 100 y 125 μM de cloroquina.

Se observó que las líneas T98G, A172, y LN229 presentaban una inhibición de viabilidad celular a 50 μM. La línea LN18 mostró más susceptibilidad a este fármaco, presentando ya a 10 μM una disminución significativa de la viabilidad.

El estudio de ciclo celular mediante citometría de flujo se realizó con la concentración de cloroquina 25 μM (Figura 80).

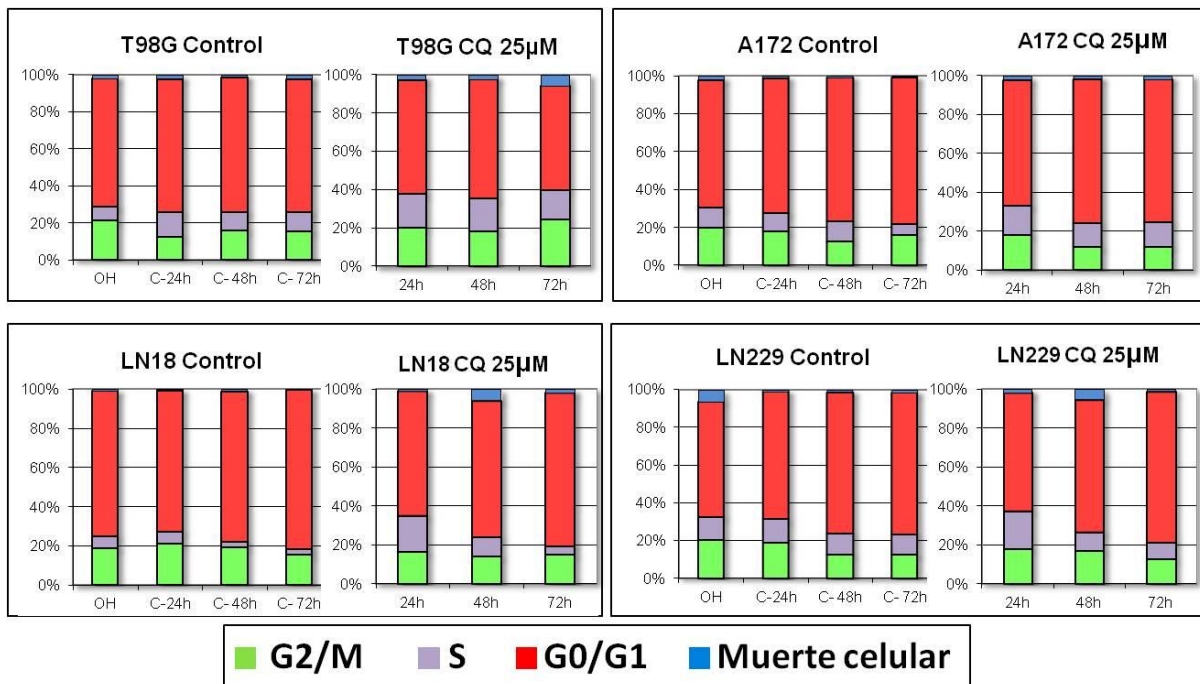


Figura 80. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 25 μM cloroquina.

El análisis de resultados no mostró cambios significativos en el ciclo celular de ninguna de las líneas tratadas con cloroquina 25 μ M tomando como referencia los controles sin tratamiento.

3.4.2 Estudio del efecto de la cloroquina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

La morfología celular de las líneas de glioblastoma fue analizada tras 72h en tratamiento con cloroquina 25 μ M. En todos los casos se observaron alteraciones en el cultivo, con cambios en la morfología de las células y aumento del espacio extracelular. En la línea T98G aumentaron los cuerpos apoptóticos y preapoptóticos. El cambio más significativo se observó en la línea A172, que presentaba pequeñas vesículas intracelulares por todo el citoplasma (Figura 81).

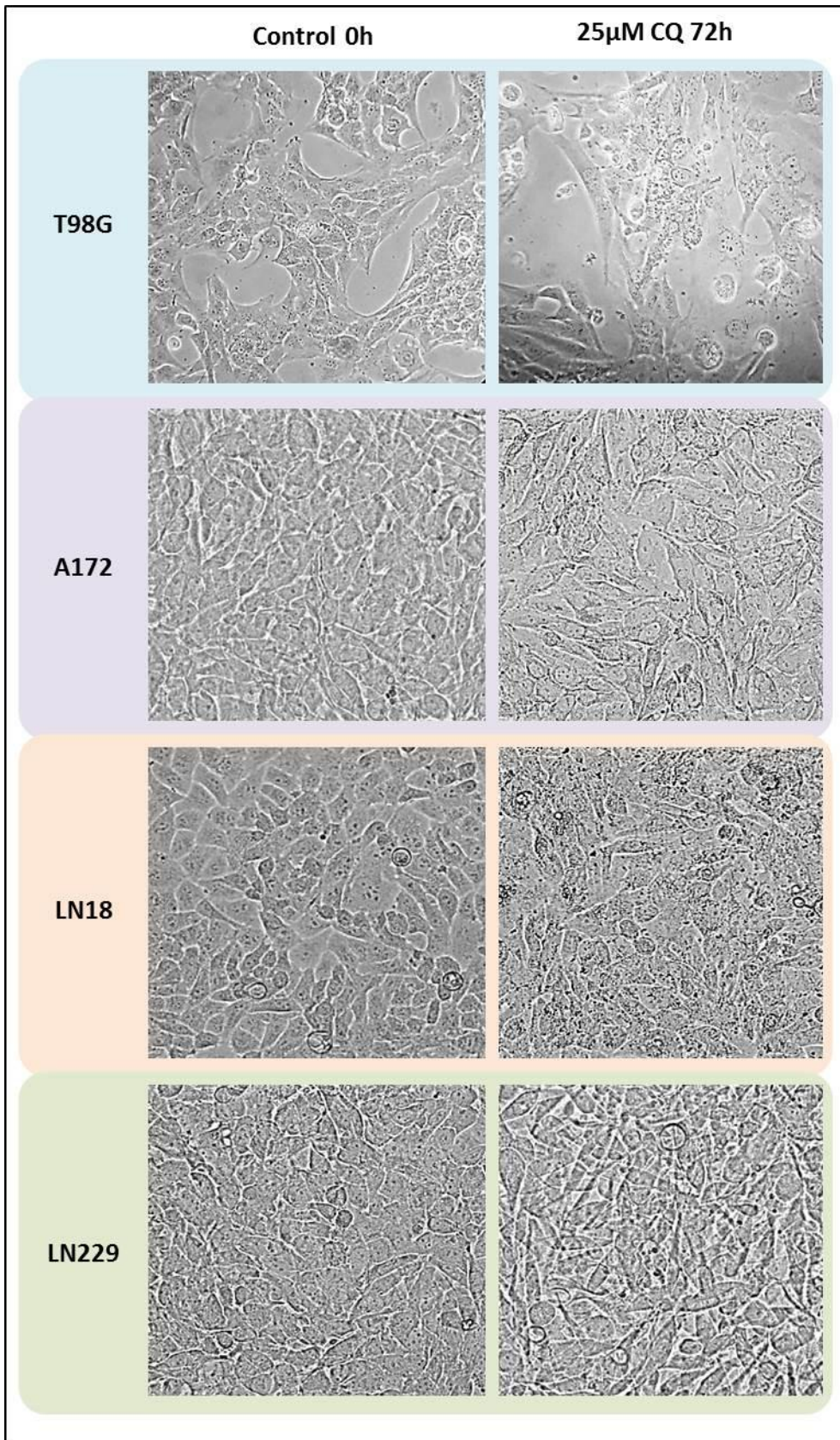


Figura 81. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25 μ M. Imágenes tomadas a 20X.

3.4.3 Análisis del efecto de la cloroquina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

El efecto que la exposición a la cloroquina tiene sobre la autofagia se estudió mediante western blot de las proteínas LC3B, p62 y Beclin1 en las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229. Para ello, las líneas fueron tratadas con el fármaco a 25 μ M durante 24, 48 y 72h. En todos los casos se utilizó un control sin tratamiento a 0h.

El estudio de la expresión de p62 presentó resultados homogéneos en todas las líneas celulares. Se vio que su expresión aumentaba con respecto al control en exposición al tratamiento. No obstante, se observó que las líneas manifestaban un aumento de la expresión de la proteína a 24 y 48h para, posteriormente a las 72, llevar a cabo una disminución de la misma, siendo más pronunciada esta disminución en las líneas A172 y LN229 (Figura 82).

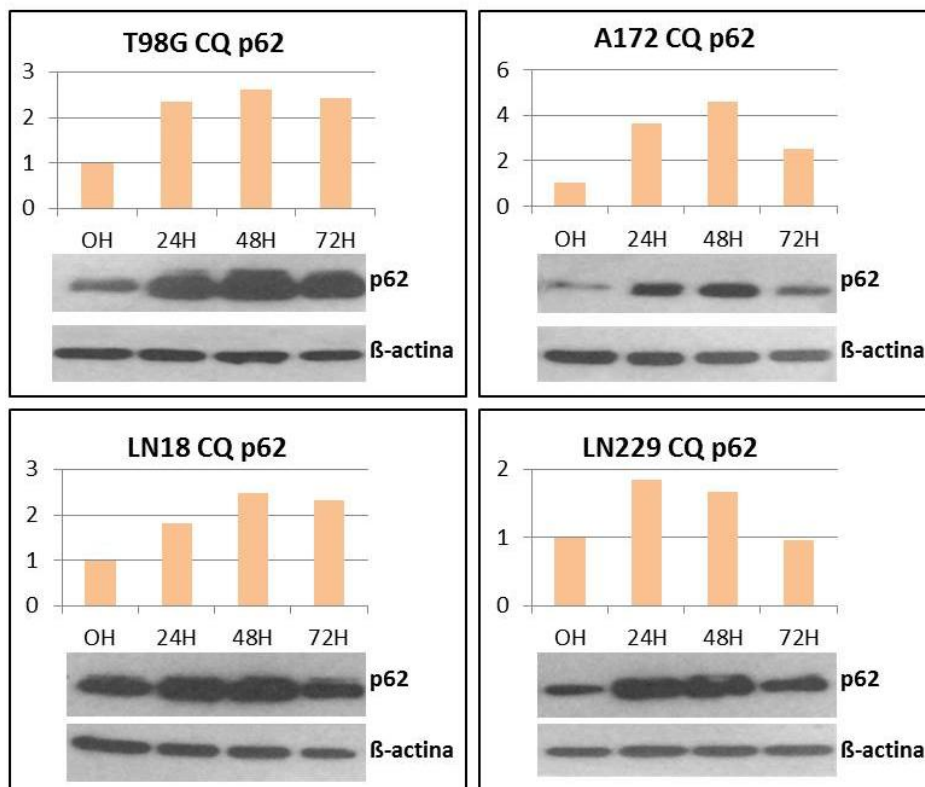


Figura 82. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25 μ M. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

El análisis de la expresión de LC3B reveló que, en las líneas A172, LN18 y LN229, LC3B-II aumentaba, mientras que la forma citosólica LC3B-I aumentaba en la primera línea y se mantenía a un nivel basal tras 72h en las otras dos. T98G mostró un aumento moderado de ambas formas de LC3B a 24 y 48h, aunque a 72h se produjo una disminución que hizo que los niveles de ambas fueran inferiores a los basales (Figura 83).

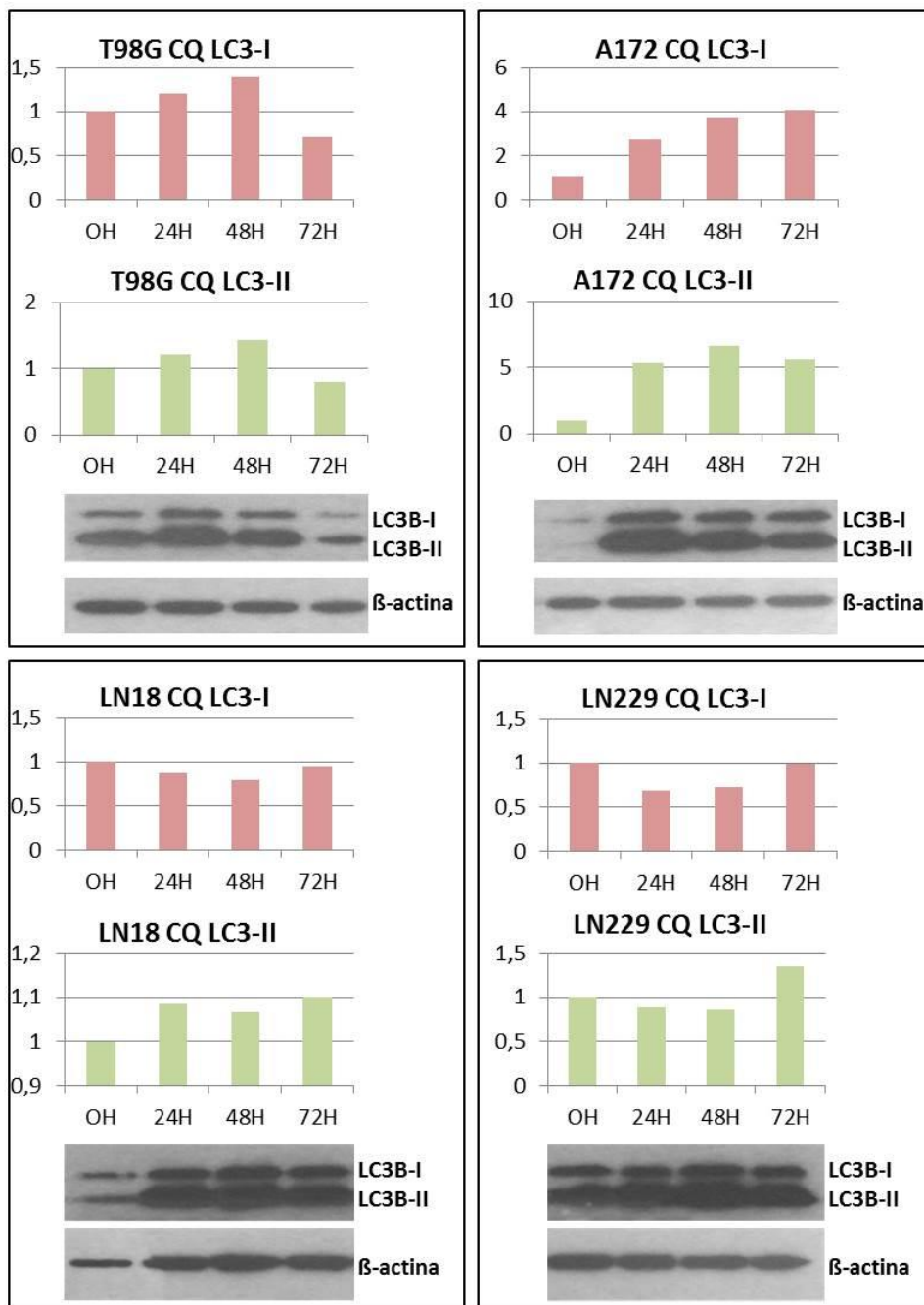


Figura 83. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25µM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

En el caso de Beclin1, T98G y LN229 presentaron niveles constantes de expresión de la proteína a lo largo del tiempo. A172 y LN18, por el contrario, mostraron un aumento de su expresión, moderado en el caso de A172, y más dramático en el caso de LN18 (Figura 84).

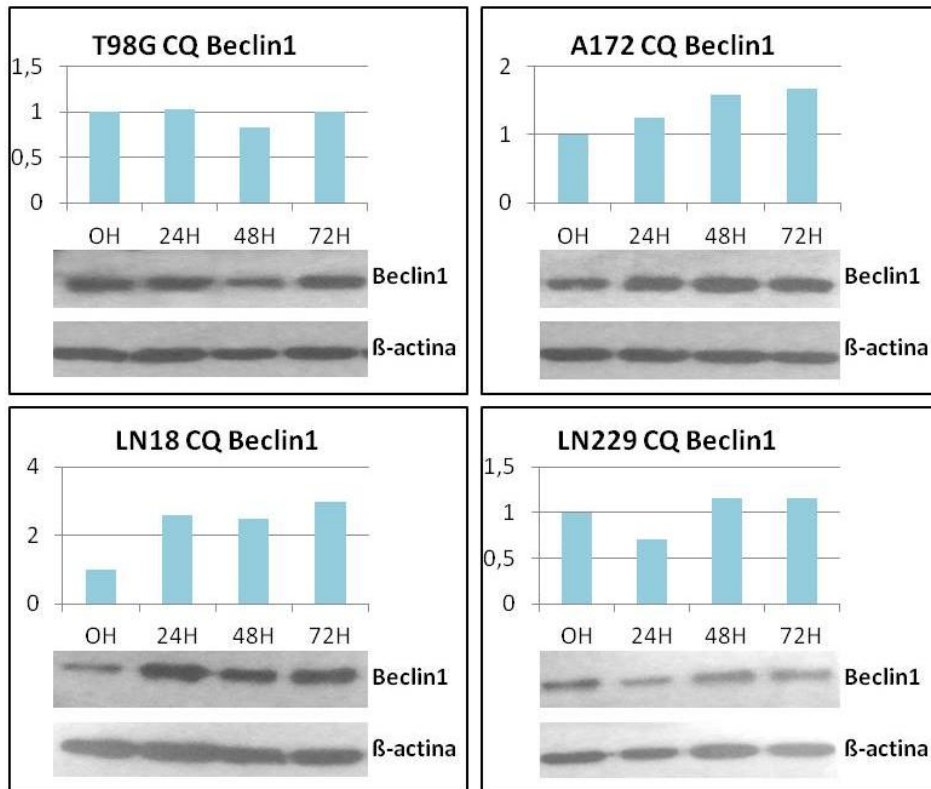


Figura 84. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con cloroquina 25 μ M. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

3.5 Caracterización del efecto de la sinergia Decitabina[®] (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

3.5.1 Estudio del efecto de la sinergia Decitabina[®] (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para evaluar la supervivencia celular al tratamiento con Decitabina[®] y cloroquina se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad MTT usando cloroquina 25 μ M y combinándola con 0.5, 1, 2, 3 y 6 μ M de Decitabina[®]. El estudio se realizó cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 85).

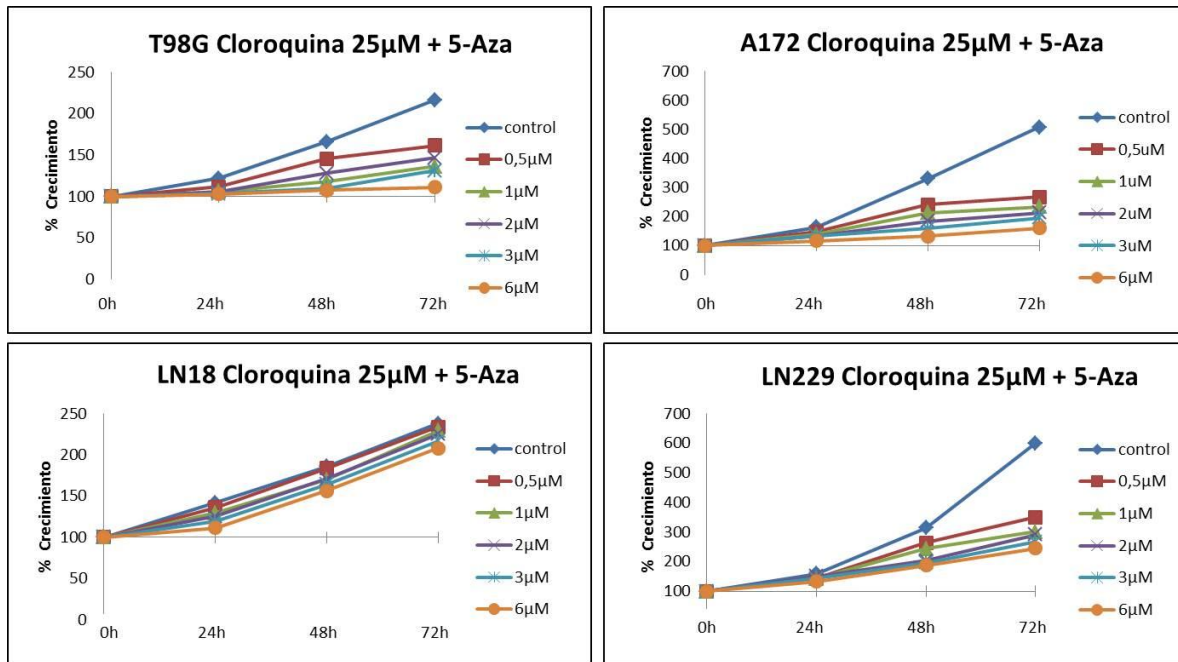


Figura 85. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 0.5, 1, 2, 3 y 6μM de Decitabina® y cloroquina 25μM.

La línea celular T98G muestra una inhibición de su viabilidad a 6μM de Decitabina® en sinergia con cloroquina 25μM. En las líneas A172 y LN229 se observa una disminución de la viabilidad a medida que aumentan las concentraciones del fármaco, sin llegar a alcanzar la inhibición total. En el caso de la línea T98G, no se aprecia disminución de la viabilidad celular a las concentraciones de estudio. La concentración de 6μM de Decitabina® fue la seleccionada para analizar el efecto de la sinergia sobre el ciclo celular (Figura 86).

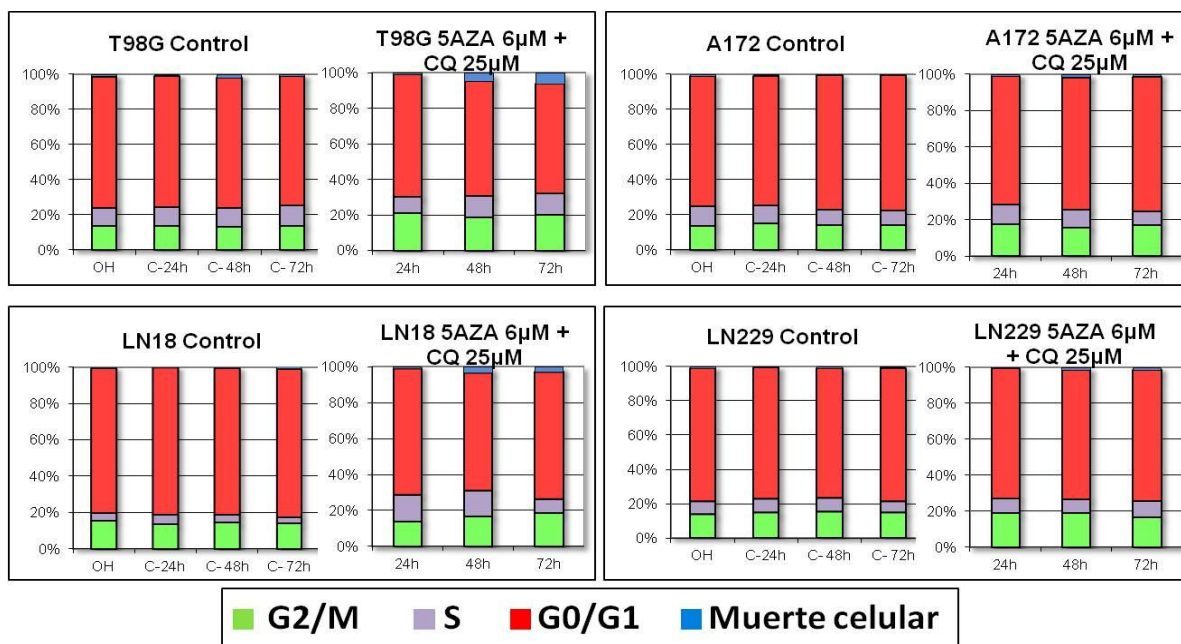


Figura 86. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6μM de Decitabina® y cloroquina 25μM.

El análisis de los resultados no mostró cambios considerables en el ciclo celular de las líneas celulares. No obstante, las líneas T98G y LN18 parecían ser algo más sensibles a la sinergia al mostrar un bloqueo en la fase S en ambos casos (T98G $p=0.025$ y LN18 $p=0.016$) y alcanzar un 6,37% y 4% respectivamente de muerte celular a las 72h de exposición al tratamiento ($p=0.000$ y $p=0.004$).

3.5.2 Estudio del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

El análisis del efecto de la sinergia $6\mu\text{M}$ de Decitabina® con cloroquina $25\mu\text{M}$ sobre la morfología celular fue analizado tras 72h en tratamiento en las líneas celulares de glioblastoma multiforme. Las líneas T98G, A172 y LN18 produjeron llamativas vesículas intracelulares alrededor de sus núcleos. LN229 desarrolló evaginaciones de la membrana plasmática (Figura 87).

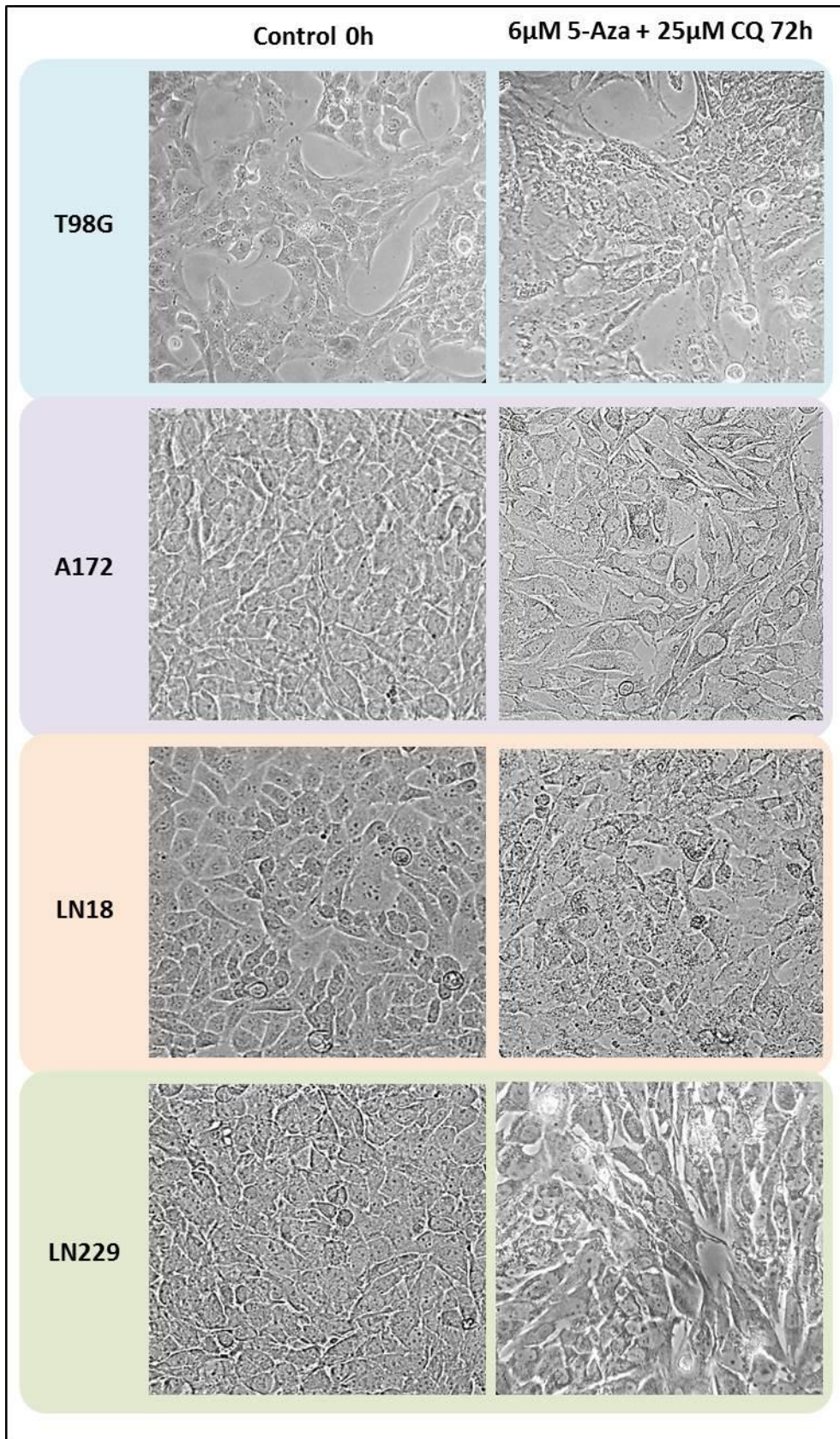


Figura 87. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 6 μ M de Decitabina® y cloroquina 25 μ M. Imágenes tomadas a 20X.

3.5.3 Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Se llevaron a cabo experimentos de western blot para estudiar la expresión de las proteínas LC3B, p62 y Beclin1 y analizar el efecto de la Decitabina® en sinergia con cloroquina sobre la autofagia. Para ello, se trataron las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229 con los fármacos a 6 μ M y 25 μ M respectivamente.

El análisis de p62 mostró una disminución de la expresión de la proteína en todas las líneas (Figura 88).

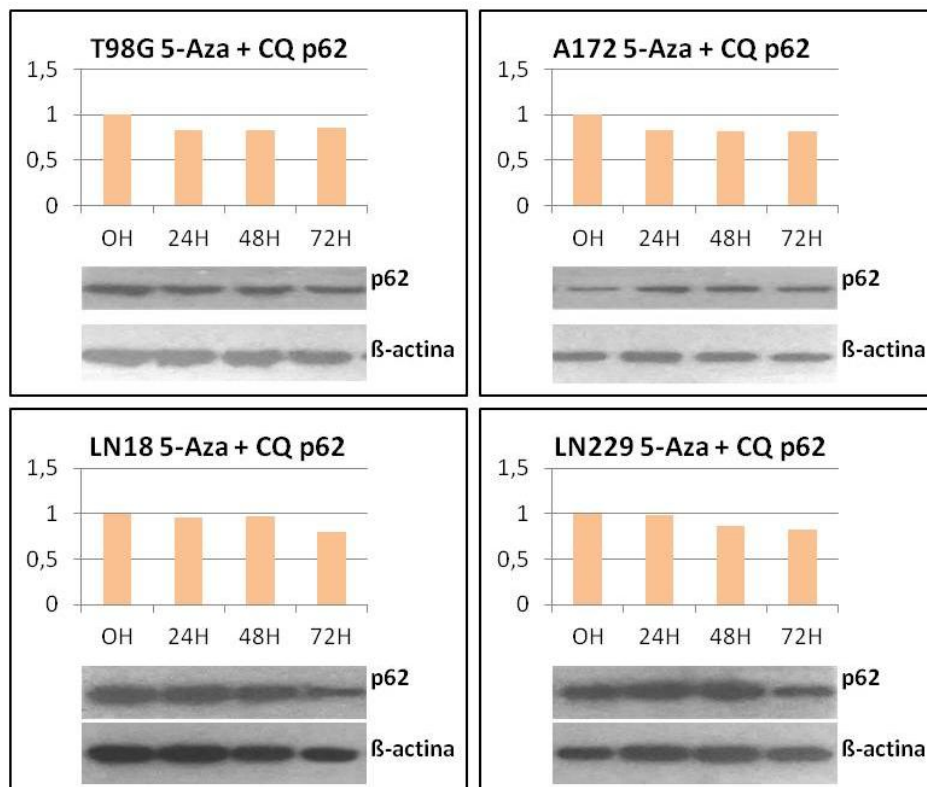


Figura 88. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y cloroquina 25 μ M. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

Respecto a la expresión de LC3B-II, se pudo observar que en todas las líneas celulares se aumentó su expresión de manera moderada. La expresión de LC3B-I se mantuvo similar al nivel basal tras 72h de tratamiento en T98G, mientras que el resto de líneas celulares aumentó ligeramente (Figura 89).

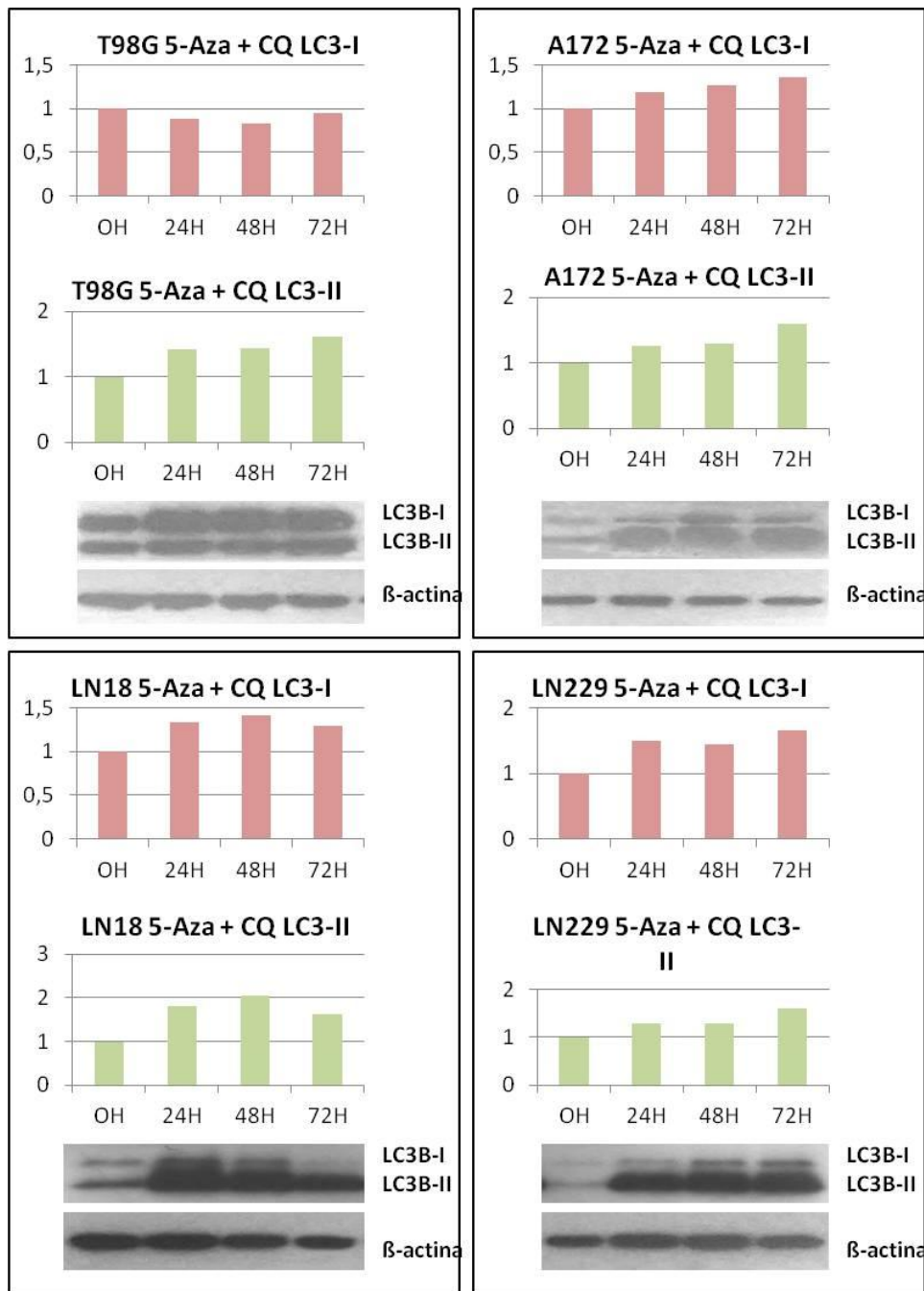


Figura 89. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y cloroquina 25µM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

El estudio de la expresión de Beclin1 mostró que las líneas celulares presentaban niveles de expresión similares al basal tras 72h de tratamiento (Figura 90).

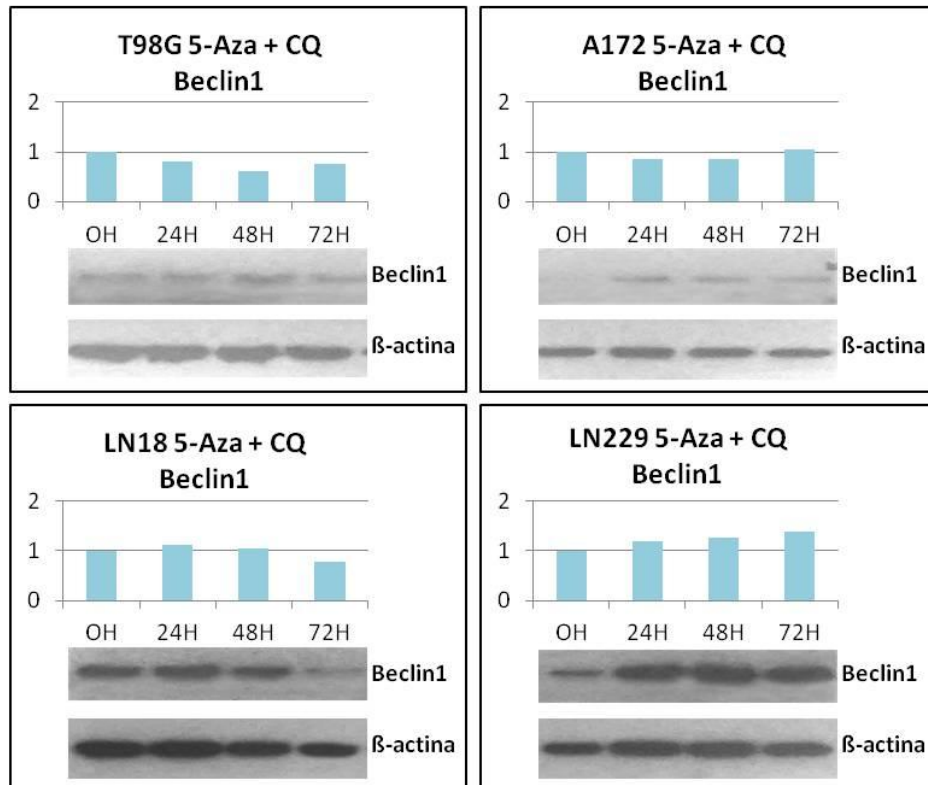


Figura 90. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Decitabina® y cloroquina 25 μ M. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

3.6 Caracterización del efecto del Panobinostat® (LBH589) en líneas celulares de glioblastoma multiforme

3.6.1 Estudio del efecto del Panobinostat® (LBH589) en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para evaluar el crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con Panobinostat® se realizó un ensayo de viabilidad MTT usando las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 91).

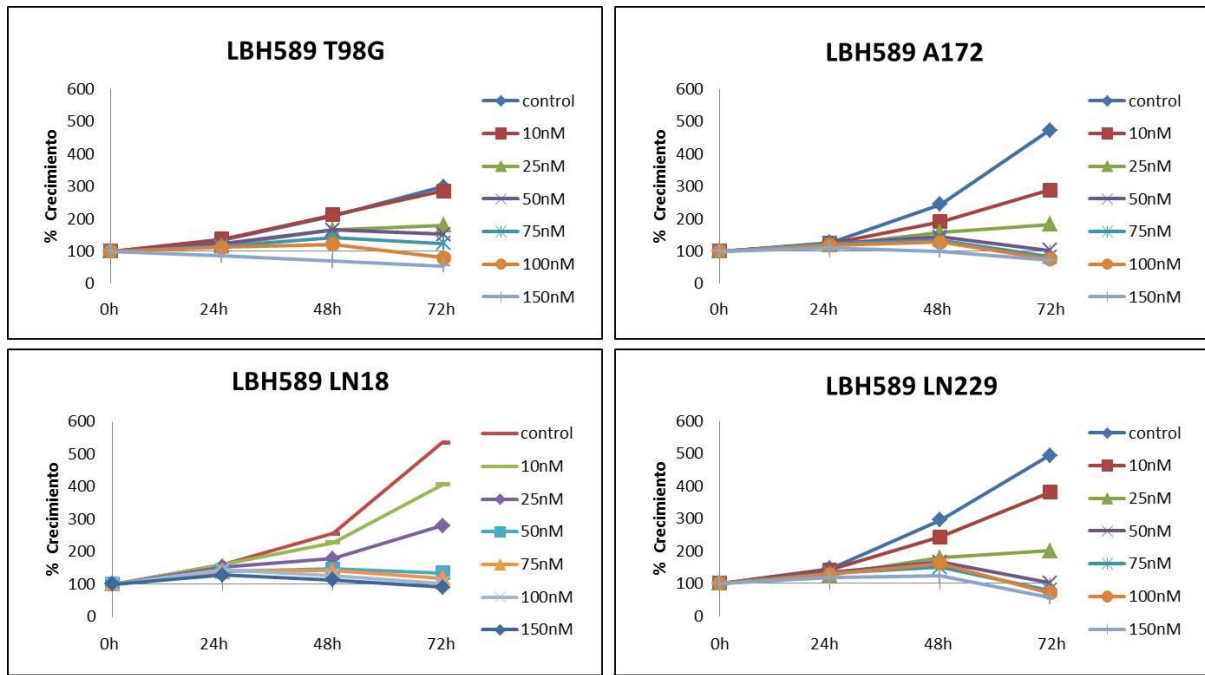


Figura 91. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM de Panobinostat®.

Se observó que las líneas A172, LN18 y LN229 presentaban una inhibición de la viabilidad a 50nM, mientras que T98G requería al menos 75nM para conseguir este efecto.

Para analizar el efecto del fármaco sobre el ciclo celular se llevó a cabo un estudio por citometría de flujo, tomando 50nM como la concentración mínima general que causa disminución de la viabilidad (Figura 92).

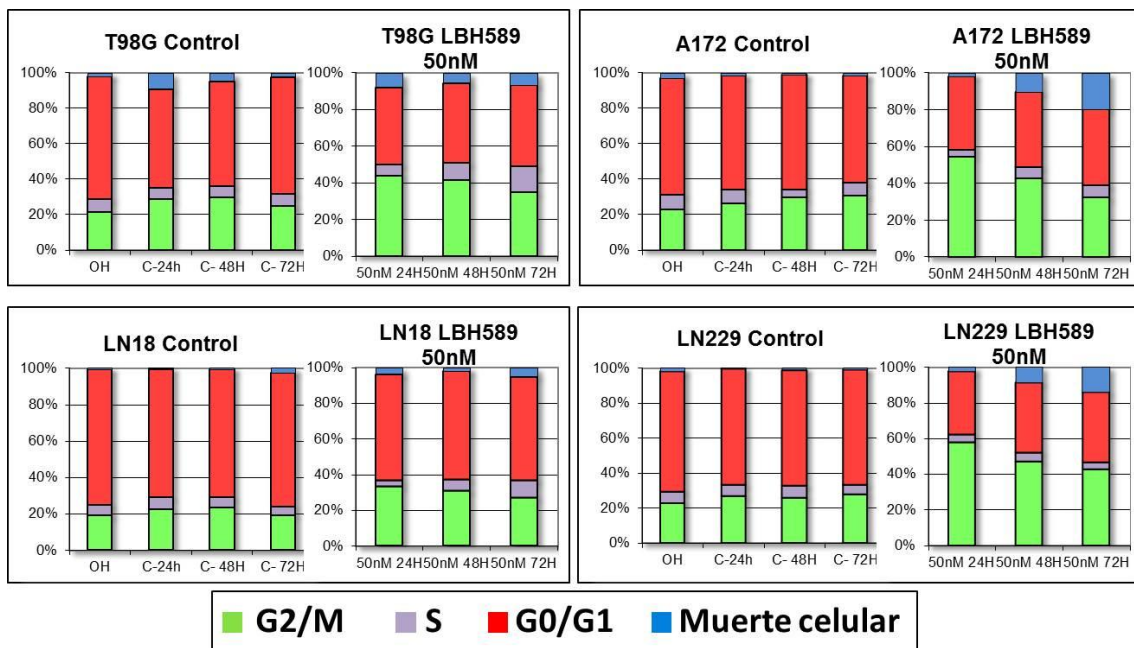


Figura 92. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 50nM de Panobinostat®.

Los resultados mostraron como en la línea A172 se alcanzaba un 20% de muerte celular a 72h ($p=0.023$). La tendencia creciente que se observó a lo largo del tiempo podría sugerir que un tratamiento a largo plazo conseguiría resultados más efectivos. En la línea LN229 se vio una mortalidad creciente a medida que transcurre el tratamiento, aunque fue más moderada que en la anterior línea celular (14.12% $p=0.040$). Las líneas T98G y LN18 no presentaron un aumento de la mortalidad respecto a los controles.

Cabe destacar que las líneas T98G, A172 y LN229 mostraron un bloqueo en G2/M a las 24h del tratamiento ($p<0.050$ en todos los casos). Dicho bloqueo parecía disminuir con el tiempo.

3.6.2 Estudio del efecto del Panobinostat® (LBH589) en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para analizar el efecto del Panobinostat® sobre la morfología celular se analizaron las líneas celulares tras 72h en tratamiento con el fármaco a 50nM. En todos los casos se observó como la morfología celular se alteraba ligeramente ya que parecía existir una pérdida parcial de las uniones intercelulares. Además, en el caso de la línea T98G, se observaron evaginaciones de la membrana plasmática y pequeñas vesículas extracelulares (Figura 93).

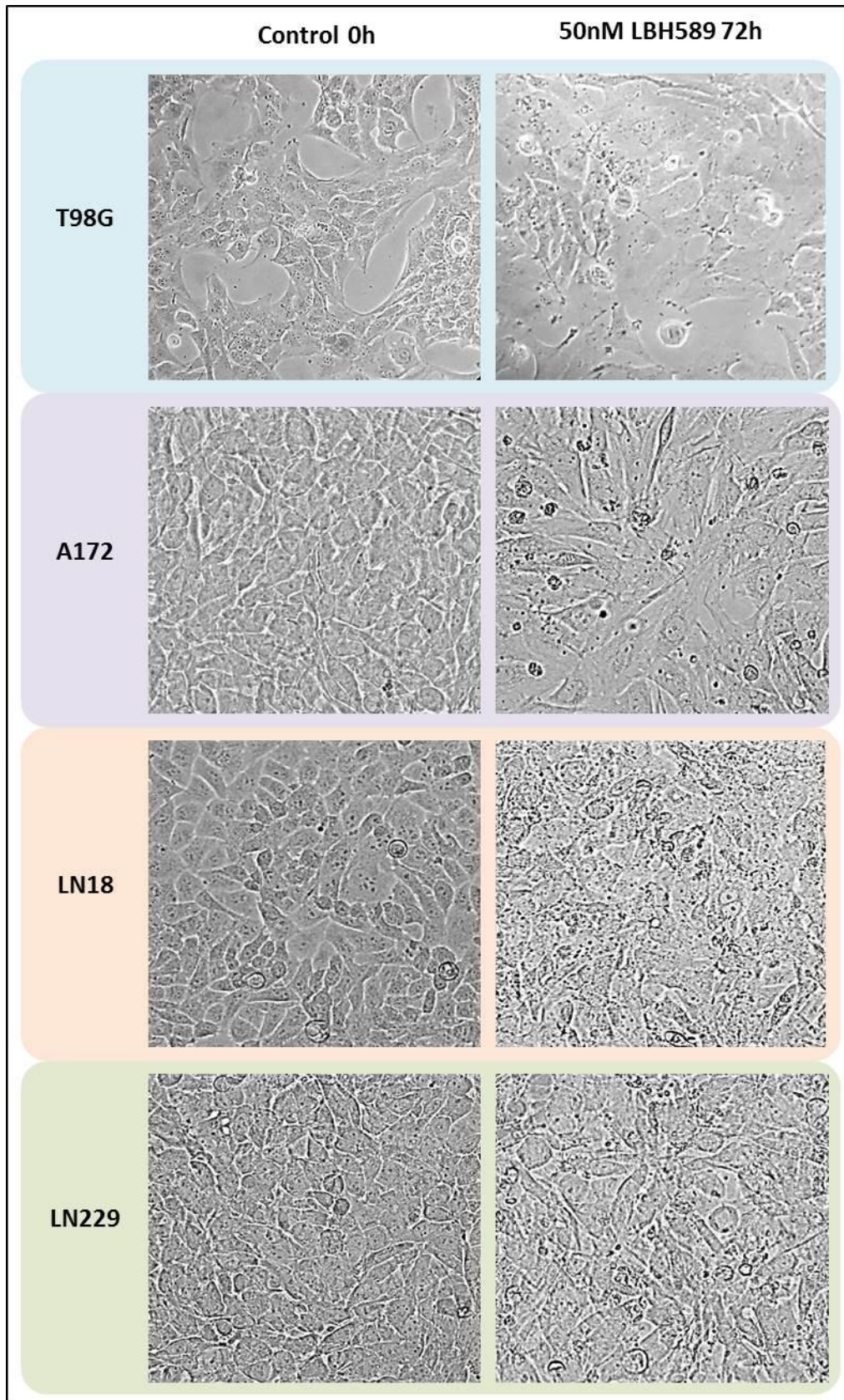


Figura 93. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Panobinostat® 50nM. Imágenes tomadas a 20X.

3.6.3 Análisis del efecto del Panobinostat® (LBH589) en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para analizar el efecto del LBH589 sobre la autofagia se estudió por western blot la expresión de las proteínas LC3B, p62 y Beclin1 en las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229 tratadas con el fármaco a 50nM durante 24, 48 y 72h. En todos los casos se utilizó un control a 0h sin tratamiento.

Respecto a la expresión de p62, las líneas T98G, A172 y LN229 manifestaron un aumento de la expresión de la proteína a 24 y 48h para, posteriormente a las 72h, mostrar una disminución de la misma. En el caso de T98G se alcanzaron niveles similares al basal a este tiempo. No obstante, en las líneas A172 y LN229 la expresión desapareció por completo a las 72h de tratamiento. La línea LN18 mostró el comportamiento inverso. A las 24 y 48h disminuyó su expresión de p62 y a 72h aumentó, aunque no llegó a alcanzar el nivel basal (Figura 94).

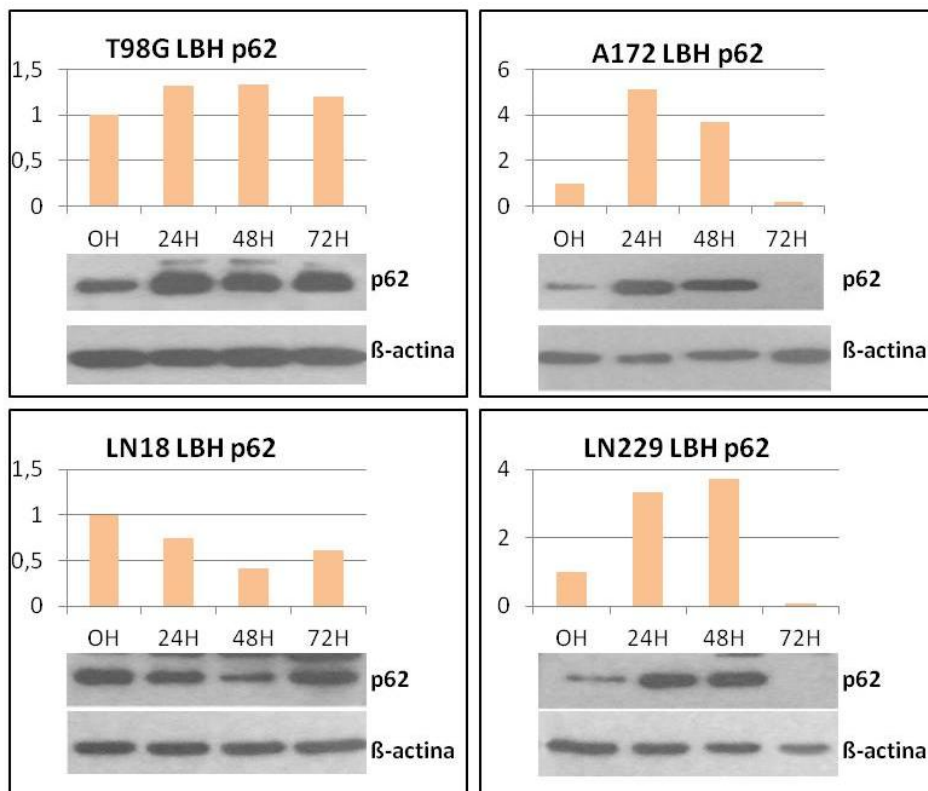


Figura 94. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/β-actina. La β-actina es el control de carga.

La expresión de LC3B fue variable en función de la línea celular. Las líneas T98G y A172 mostraron un aumento de las proteínas LC3B-I y LC3B-II, mientras que la línea LN18 presentaba un aumento de expresión de LC3B-I y niveles constantes de LC3B-II. La línea LN229 manifestó un aumento notable de la expresión de estas proteínas a 24h de tratamiento, tras lo cual, la expresión disminuyó hasta llegar a niveles basales en el caso de LC3B-II y niveles de LC3B-I inferiores al control (Figura 95).

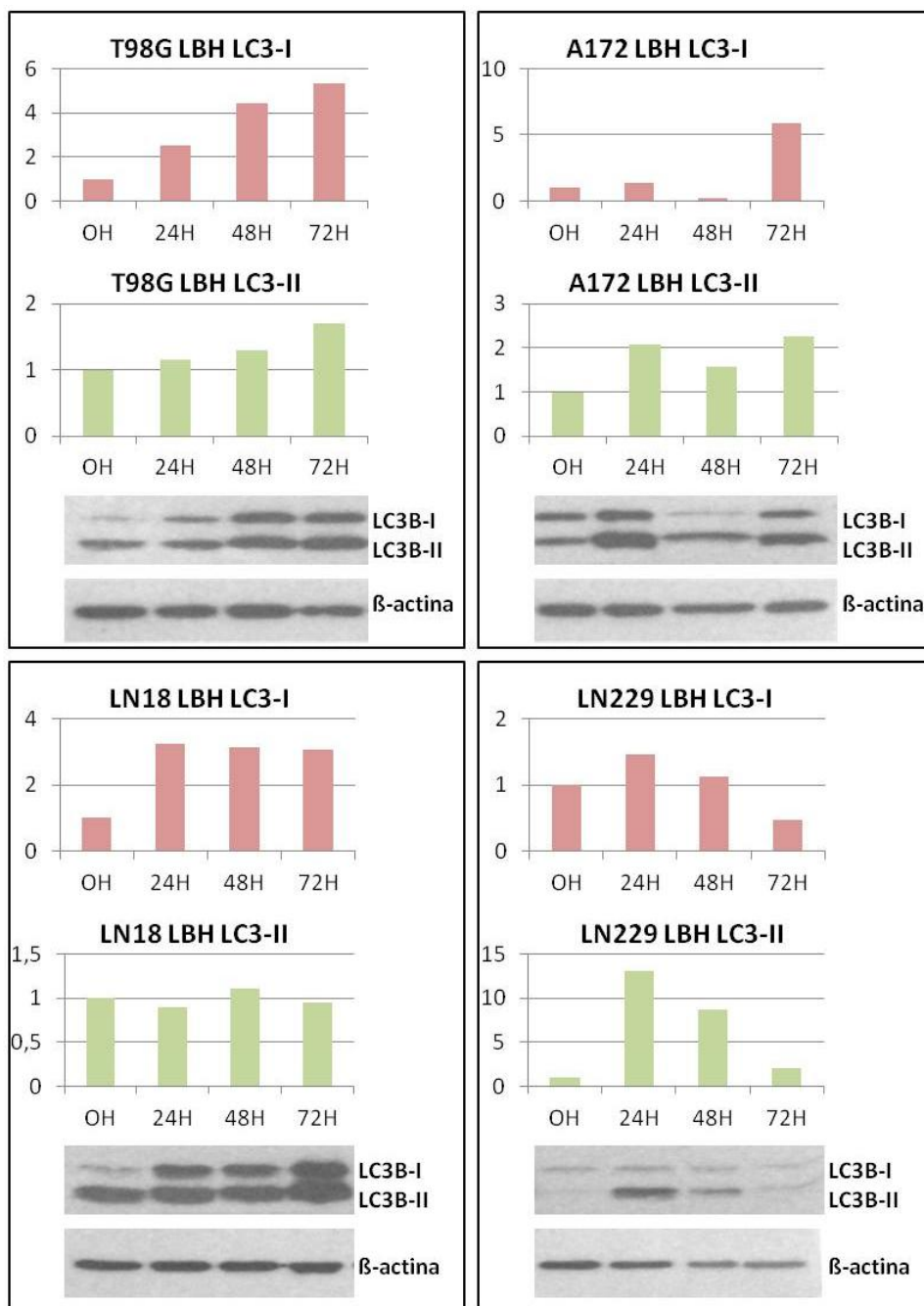


Figura 95. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

En el caso de Beclin1, las líneas presentaron un aumento leve en la expresión de esta proteína, excepto por la línea A172, en la que este efecto fue más llamativo al llegar a duplicarse la expresión a las 72h de exposición al fármaco (Figura 96).

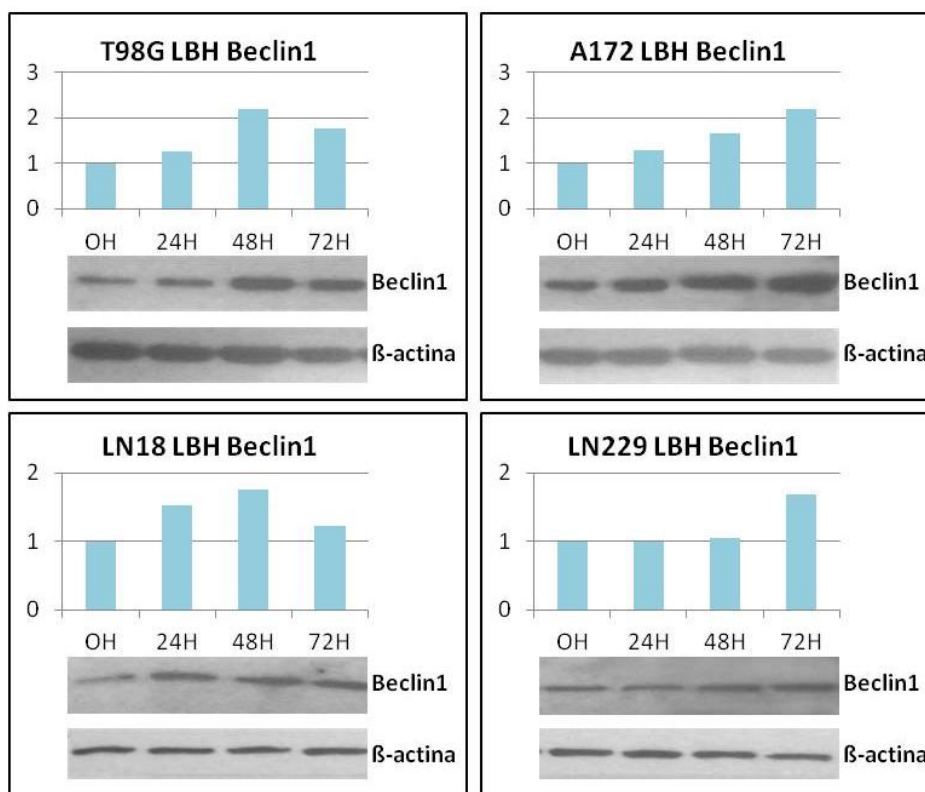


Figura 96. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/ β -actina. La β -actina es el control de carga.

3.7 Caracterización del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Recientemente se han publicado trabajos que sugieren que la combinación de inductores e inhibidores autofágicos podría aumentar la acción citotóxica de los fármacos. Es por ello que decidimos probar la combinación de LBH589®, un inductor autofágico, con cloroquina, un inhibidor del proceso.

3.7.1 Estudio del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en la proliferación de líneas celulares de glioblastoma multiforme

La evaluación del crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento de sinergia con Panobinostat® y cloroquina se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad MTT usando las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM para Panobinostat® y manteniendo constante la concentración de cloroquina a 25 μ M. El estudio se realizó cada 24h durante un máximo de 72h (Figura 97).

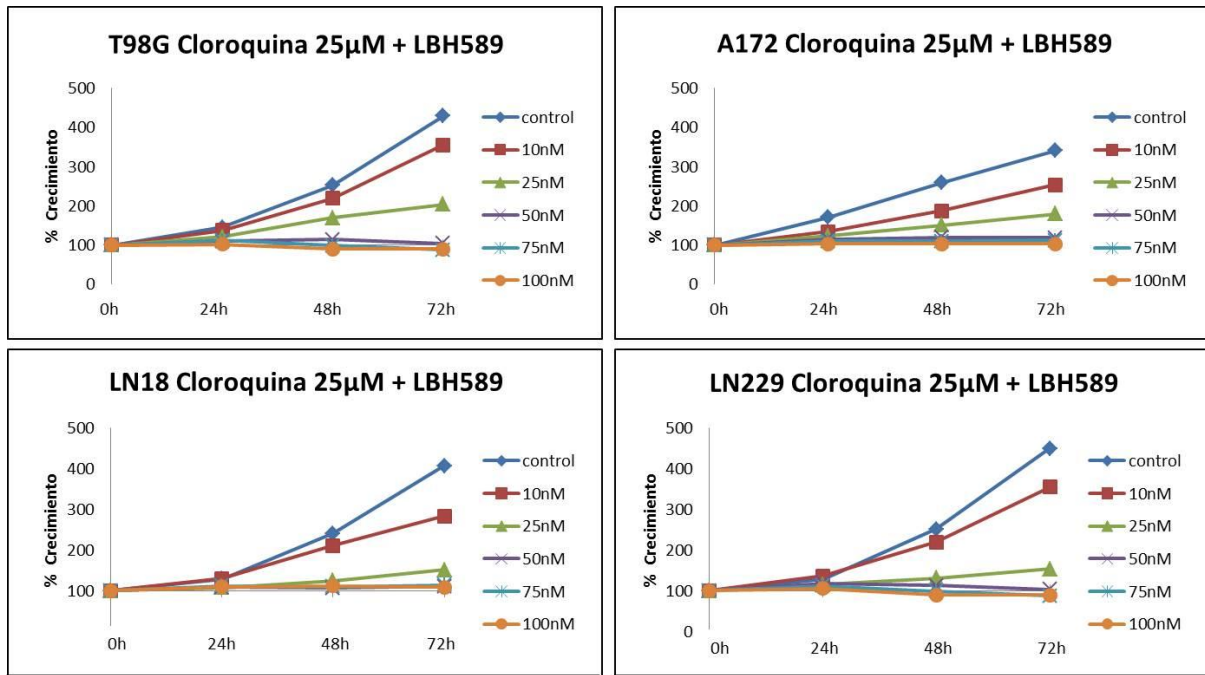


Figura 97. Análisis de la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 10, 25, 50, 75, 100 y 150nM de Panobinostat® y cloroquina 25µM.

En todas las líneas celulares se observó una inhibición total de la viabilidad celular a 50nM de Panobinostat® en sinergia con cloroquina 25µM. Es por ello que éstas fueron las concentraciones seleccionadas para analizar el efecto del fármaco sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 98).

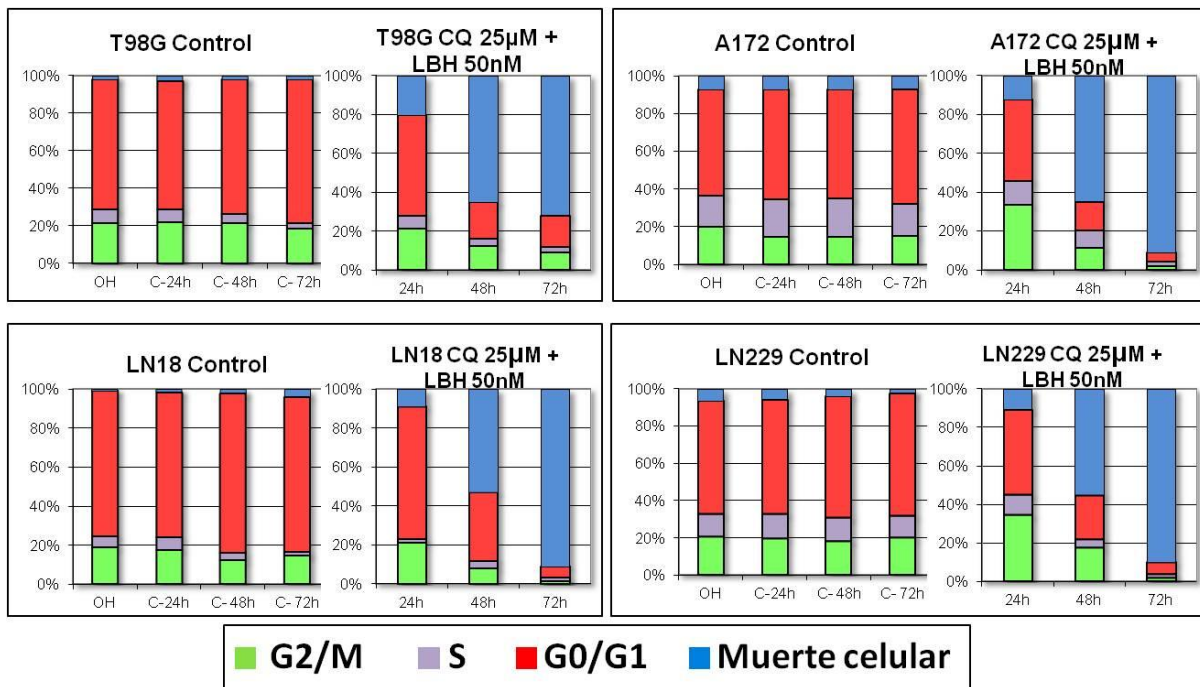


Figura 98. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con 50nM de Panobinostat® y 25µM de cloroquina.

Los resultados mostraron como en todas las líneas celulares hay un aumento de la mortalidad que se produce de manera creciente a medida que aumenta el tiempo de exposición a los fármacos. A las 72h de tratamiento T98G alcanzaba un 72% de muerte celular ($p=0.000$), siendo la línea menos sensible a los fármacos. A172 alcanzó un 90.94% a las 72h ($p=0.000$), LN229 un 90.40% ($p=0.000$) y LN18 un 90.95% ($p=0.000$).

3.7.2 Estudio del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en la morfología de líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para estudiar el efecto sobre la morfología celular del 50nM Panobinostat® en combinación con 25 μ M cloroquina se analizaron las líneas celulares de glioblastoma multiforme tras 72h en tratamiento. En todas las líneas celulares se observó un cambio de morfología. La línea T98G desarrolló largos filopodios. El número de células se redujo respecto al control, mostrando células más aisladas. Las líneas A172 y LN229 aparecieron más alargadas y filamentosas que en los controles. Además produjeron vesículas intracelulares. La forma de LN18 se redondeó y parecía haber más espacio entre las células en cultivo. En todas las líneas se pudo ver un aumento de cuerpos apoptóticos (Figura 99).

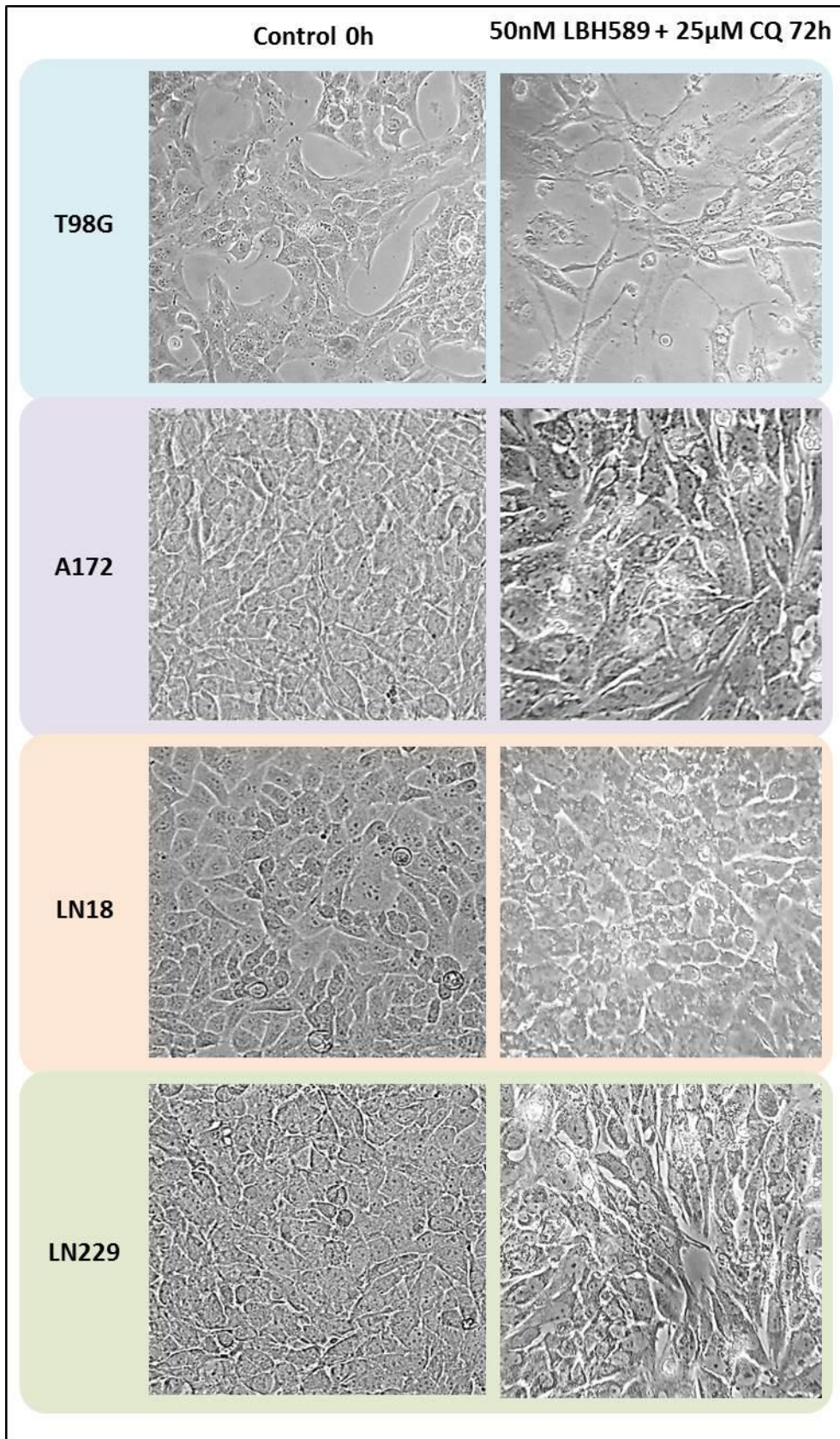


Figura 99. Cambios morfológicos de las líneas celulares de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con Panobinostat® 50nM y cloroquina 25μM. Imágenes tomadas a 20X.

3.7.3 Análisis del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en la expresión de proteínas de autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para analizar el efecto del LBH598 en sinergia con cloroquina sobre la autofagia se estudiaron las proteínas LC3B, p62 y Beclin1. Para ello, se trataron las líneas celulares T98G, A172, LN18 y LN229 con los fármacos a 50nM y 25µM respectivamente y se analizó su expresión por western blot a 24, 48 y 72h tras la exposición. En todos los casos se utilizó un control a 0h sin tratamiento.

El análisis de la expresión de p62 demostró que en todas las líneas celulares parecía aumentar dicha expresión a las 72h de tratamiento (Figura 100).

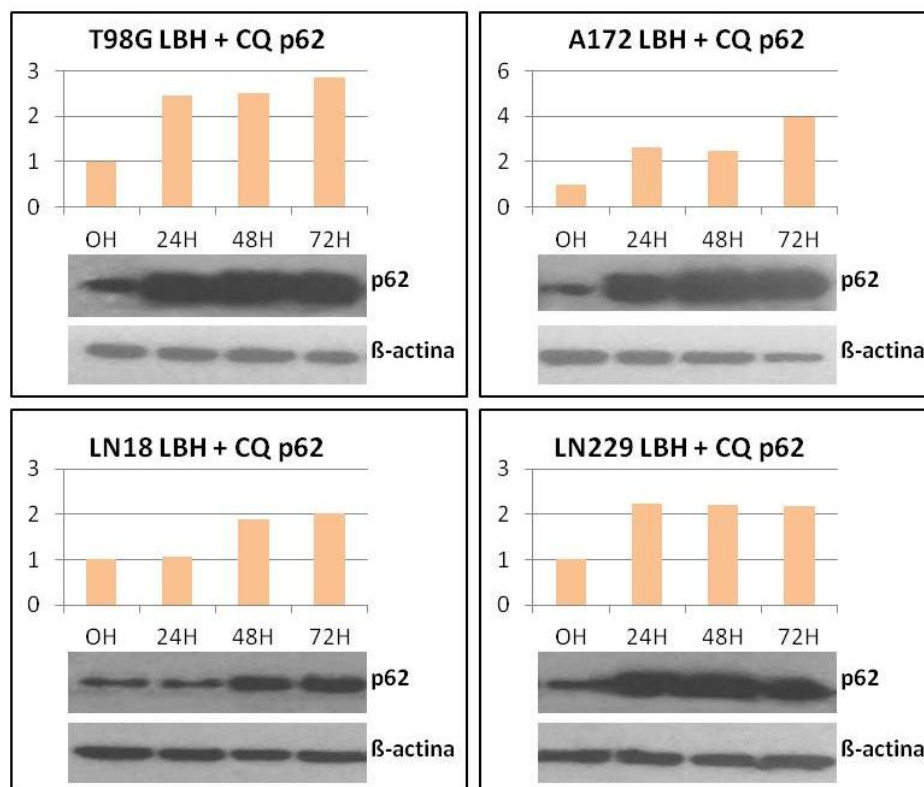


Figura 100. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM y cloroquina 25µM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/β-actina. La β-actina es el control de carga.

La expresión de LC3B fue bastante homogénea entre las líneas celulares. En todos los casos la expresión de LC3B-II aumentó a las 72h de tratamiento, siendo este incremento más dramático en las líneas A172 y LN229. LC3B-I aumento su expresión en T98G a las 24h de tratamiento para, posteriormente, disminuir a los niveles basales a las 72h. El resto de líneas celulares muestran aumento de expresión de LC3B-I (Figura 101).

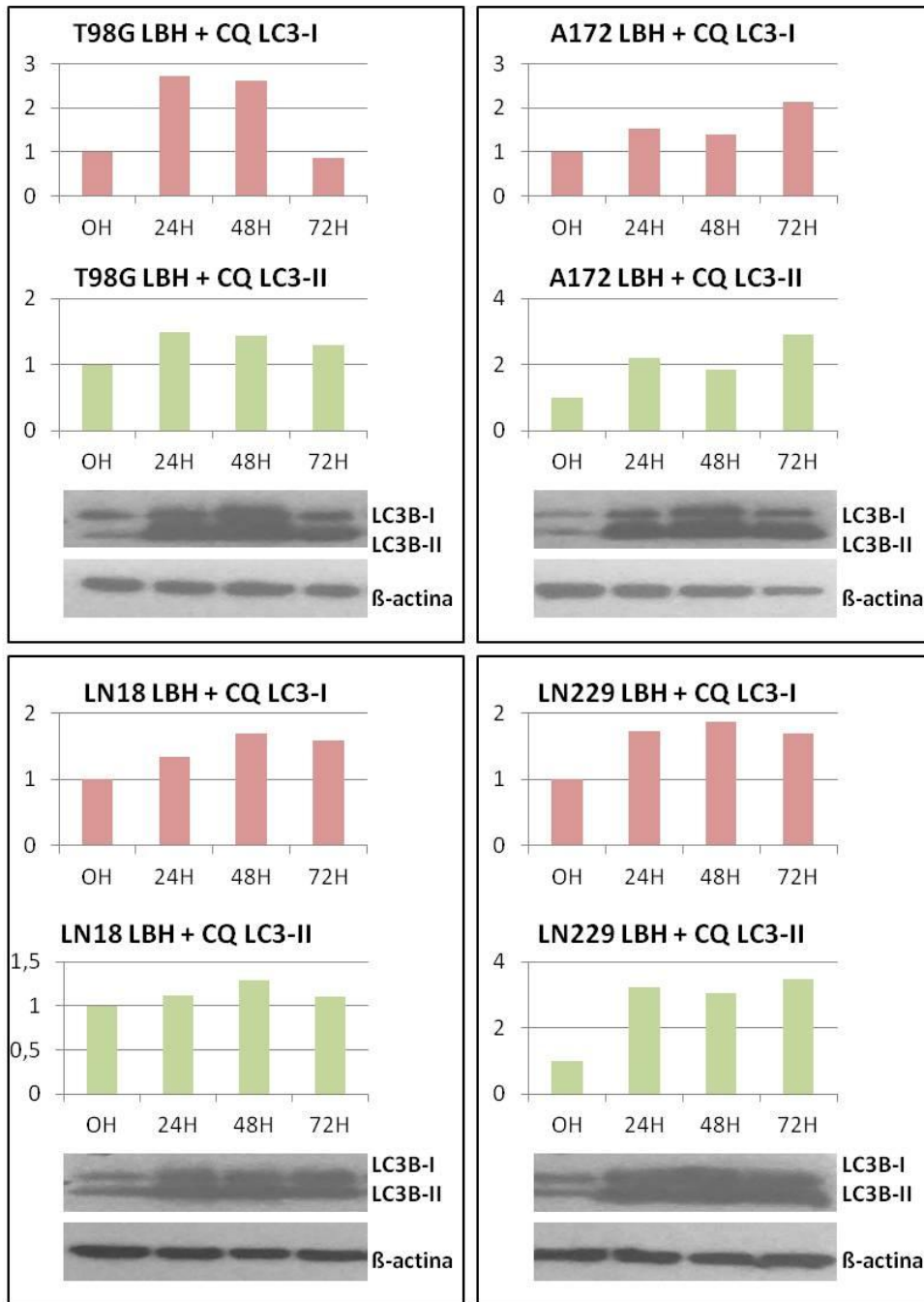


Figura 101. Expresión de las proteínas LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM y cloroquina 25µM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/β-actina. La β-actina es el control de carga.

Respecto a la expresión de Beclin1, todas las líneas presentaron un aumento de esta proteína, siendo éste más leve en las líneas LN18 y LN229 (Figura 102).

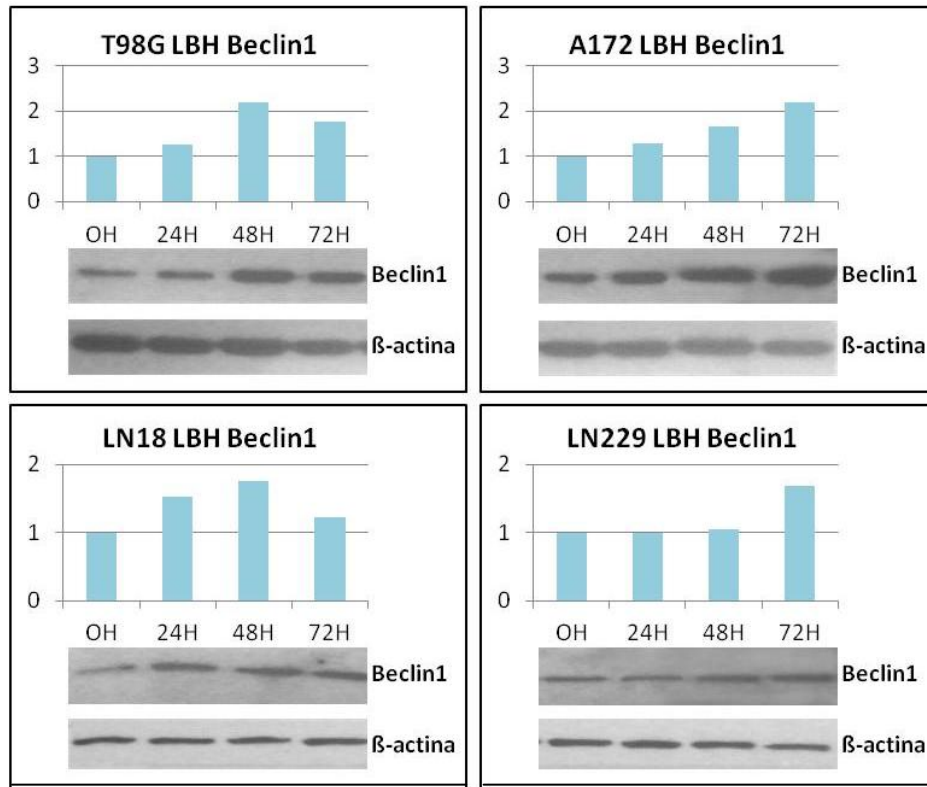
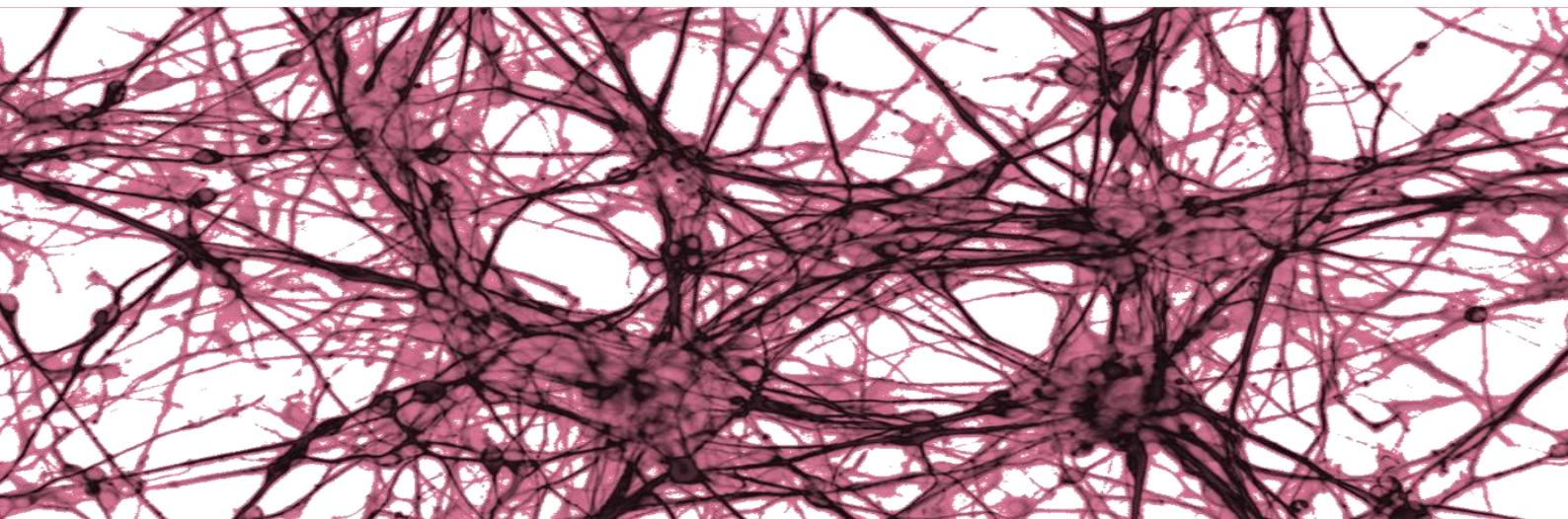


Figura 102. Expresión de la proteína Beclin1 en las líneas celulares tumorales T98G, A172, LN18 y LN229 en tratamiento con LBH589 50nM y cloroquina 25μM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin1/β-actina. La β-actina es el control de carga.

DISCUSIÓN



1 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME

La autofagia es un proceso altamente regulado indispensable para la degradación de proteínas de vida larga y orgánulos, siendo la única vía conocida para la degradación de estos últimos. En los últimos años, el estudio de la autofagia ha revelado su implicación en la patogénesis de múltiples enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades cardíacas, infecciosas e inflamatorias, neurodegenerativas, obesidad, diabetes o cáncer⁷⁴.

En nuestro trabajo, hemos seleccionado seis polimorfismos (SNPs) en cinco genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de autofagia *ATG2B* rs3759601, *ATG5* rs2245214, *ATG10* rs1864183, *ATG16L1* rs2241880, *NOD2* rs2066844 y *NOD2* rs2066845, para evaluar el posible papel de estas variables en la susceptibilidad a padecer glioblastoma multiforme (Tablas 10 y 11).

La proteína *ATG2B* es fundamental en la formación del autofagosoma y la regulación de la morfología, el tamaño y la distribución de los agregados lipídicos¹⁴¹. El polimorfismo estudiado en este trabajo *ATG2B* rs3759601 consiste en una transversión de citosina por guanina en la posición 4512 del gDNA que genera el cambio *missense* p.Q1383E. Su estudio en pacientes con glioblastoma demuestra que ser portador de los genotipos Glu/Glu y Gln/Glu podría conferir protección frente a desarrollar glioblastoma multiforme. De hecho, se confirma que el alelo G disminuye el riesgo de padecer esta enfermedad y que el genotipo GG se asocia a pacientes con mayor probabilidad de resección completa del tumor y posibilidad de tratamientos postquirúrgicos completos. Este es el primer trabajo en el que se describe el polimorfismo *ATG2B* rs3759601 como modulador de la susceptibilidad a padecer una enfermedad.

La proteína *ATG5* forma parte del complejo *ATG12-ATG5-ATG16L* necesario para la formación del autofagosoma. En este trabajo hemos estudiado el polimorfismo *ATG5* rs2245214, que genera un cambio intrónico. No hemos encontrado diferencias significativas entre los pacientes con glioblastoma y el grupo control. No obstante, se ha descrito este polimorfismo como modulador de la susceptibilidad de otras enfermedades. En todas ellas se relaciona el alelo G con un aumento de riesgo a padecer la enfermedad, como es el caso del cáncer de tiroides¹⁴², el lupus eritematoso¹⁴³ y la enfermedad ósea de Paget¹⁴⁴. Este polimorfismo también ha sido estudiado en tuberculosis, aunque no se encontró ninguna relación con la susceptibilidad a padecer la enfermedad¹⁴⁵.

La proteína *ATG10* es una enzima E2-like que permite la conjugación de *ATG5* con *ATG12* para que, posteriormente, éstas puedan formar el complejo *ATG12-ATG5-ATG16L*⁹⁴. El polimorfismo estudiado en este trabajo *ATG10* rs1864183 consiste en un cambio de una citosina por una timina en la posición 929 del gDNA, generando la mutación de cambio de sentido p.T212M. El análisis de nuestros resultados sugiere que el genotipo Met/Met aumenta el riesgo a desarrollar glioblastoma, siendo el alelo T el que confiere dicho riesgo, y que pacientes con dicho genotipo presentan supervivencias más cortas. Este polimorfismo ha sido estudiado también en pacientes con

tuberculosis, aunque no se encontró ninguna relación con la susceptibilidad a padecer esta enfermedad. No obstante, sí se observó una asociación con la producción de IL-8¹⁴⁵. La proteína IL-8 es un mediador clave de la respuesta inflamatoria y funciona como regulador positivo de la angiogénesis, un proceso que tiene un papel fundamental en el desarrollo del cáncer¹⁴⁵. Si el genotipo TT de *ATG10* altera la producción de IL-8 y activa el proceso angiogénico, podría, también, aumentar la susceptibilidad a padecer glioblastoma multiforme. El polimorfismo *ATG10* rs1864183 también ha sido estudiado en pacientes con enfermedad ósea de Paget, encontrándose que el alelo T se relacionaba con una disminución del riesgo a padecer la enfermedad¹⁴⁴.

La proteína ATG16L1 es importante en la formación del complejo ATG12-ATG5-ATG16L para la expansión de la membrana del autofagosoma¹⁴⁶. El polimorfismo rs2241880 consiste en una transición de adenina por guanina que genera una sustitución *missense* de treonina por alanina en la posición 300 (p.T300A). Este polimorfismo se encuentra en un dominio de unión a caspasa. La variante 300Ala es más sensible a la acción de la caspasa3, degradándose antes. Esto hace pensar que esta variante se asocia a una disminución del proceso autofágico¹⁴⁷. Al comparar el polimorfismo rs2241880 entre pacientes con glioblastoma y sujetos sanos no hemos encontrado diferencias significativas. Sin embargo, esta variante ha sido estudiada en otras enfermedades, encontrándose relacionada con la susceptibilidad a desarrollar enfermedad ósea de Paget¹⁴⁴, cáncer gástrico¹⁴⁸ y enfermedad de Crohn^{146,149}. Asimismo, se ha relacionado con un aumento de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal¹⁵⁰.

La proteína NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) tiene un importante papel en la inmunidad innata reconociendo lipopolisacáridos bacterianos y activando la ruta de NFκB¹⁵¹. Recientemente, se ha visto que NOD2 es crucial para el reclutamiento de ATG16L1 y la formación del autofagosoma en presencia de una infección bacteriana¹⁵². Los polimorfismos de *NOD2* analizados en este trabajo son rs2066845 y rs2066844, que generan los cambios *missense* citosina por guanina p.G908R y citosina por timina p.R702W respectivamente. Su estudio en pacientes con glioblastoma reveló diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en el caso del polimorfismo *NOD2* rs2066844, viéndose que el alelo T confería un aumento del riesgo. Además, dicho polimorfismo parecía estar asociado con el sexo del paciente y la edad de aparición del tumor. El estudio del polimorfismo *NOD2* rs206685 no mostró ninguna diferencia con el grupo control. Estos dos polimorfismos se han asociado con enfermedades como la enfermedad de Crohn^{153,154} y el cáncer colorrectal, aunque en este último caso hay informaciones contradictorias respecto al alelo que aumenta la susceptibilidad¹⁵¹. Estos polimorfismos también se han estudiado en cáncer gástrico sin observar asociaciones entre las variantes y la aparición de la enfermedad¹⁵⁵. Además, la variante *NOD2* rs206685 se ha asociado a un aumento del riesgo a padecer el síndrome de Guillain-Barré¹⁵⁶.

En resumen, nuestros resultados muestran que ser portador del alelo G del polimorfismo *ATG2B* rs3759601 confiere protección frente al desarrollo de glioblastoma multiforme, siendo éste

el primer trabajo en el que se describe dicho polimorfismo como modulador de la susceptibilidad a padecer una enfermedad. Además, mostramos que ser portador del alelo T en los polimorfismos *ATG10* rs1864183 y *NOD2* rs2066844 aumenta el riesgo a padecer este tumor de manera independiente. De este modo, se confirma que alteraciones en la autofagia pueden desempeñar un papel en la patogénesis del glioblastoma multiforme y se pone de manifiesto la importancia de esta vía como posible diana terapéutica.

2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME

La reciente asociación de alteraciones en la autofagia con la patogénesis del cáncer ha generado un interés creciente en este proceso. De hecho, la autofagia ha sido estudiada en múltiples cánceres, incluyendo el glioblastoma multiforme¹⁵⁷.

En el presente estudio hemos analizado la expresión de diferentes proteínas relacionadas con el proceso de la autofagia en pacientes con glioblastoma multiforme y astrocitoma de bajo grado para intentar esclarecer cuál es el papel de la autofagia en la patogenia y desarrollo tumoral.

2.1 LC3B

La proteína LC3B tiene un rol esencial en el proceso autofágico al ser fundamental en la expansión de la membrana del autofagosoma. Su forma citosólica, LC3B-I, se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) para obtener la forma LC3B-II, que se ancla en la membrana del autofagosoma y reconoce receptores de proteínas ubiquitinadas, como p62, acercando de esta manera el material a degradar a la maquinaria autofágica^{75,158}. La inducción de la autofagia promueve la conversión de LC3-I a LC3-II, considerándose esta última proteína un marcador específico de la actividad autofágica^{159,160}.

Giatromanolaki et al. estudiaron la expresión de LC3B en la línea celular T98G y en tejido cerebral normal observando que, en ambos casos, la expresión era débil y muy similar entre sí¹⁶¹. Esto sugiere que la línea celular T98G es un buen control para el estudio de expresión de la proteína LC3B; en nuestro trabajo hemos utilizado esta línea como control y hemos encontrado que la mayoría de los glioblastomas presentan una expresión normal de LC3B-II, mientras que aproximadamente el 30% no lo expresa o muestra una expresión baja comparada con la detectada en T98G (Figura 27). Se ha demostrado que son habituales bajos niveles de expresión de LC3B-II en astrocitomas de alto grado, sugiriendo que la reducción de la actividad autofágica podría estar relacionada con la progresión de los astrocitomas¹⁶². No obstante, aproximadamente el 70% de los tumores analizados en nuestro trabajo muestran expresión normal de esta proteína, sugiriendo actividad normal de la autofagia. Algunos estudios proponen que esto puede ser debido al hecho de que la proteína podría estar acumulada⁷⁵, en vez de formando parte de los autofagosomas,

activando la ruta autofágica. En el caso de los tumores de bajo grado la expresión de esta proteína es normal en la mayoría de los tumores (Figura 29). La comparación de la expresión entre diferentes grados tumorales demuestra que la expresión de las proteínas LC3B-I y II está asociada al grado tumoral y confirma que la reducción de la actividad autofágica podría estar relacionada con la progresión de los astrocitomas (Tabla 13).

El análisis de la relación entre la expresión de las proteínas LC3B-I y II y las características clínicas de los pacientes no mostró asociación en astrocitomas de bajo o alto grado. No obstante, la ausencia de expresión de LC3B-II se correlacionó con supervivencias más largas de pacientes con glioblastoma, sugiriendo que LC3B-II podría ser un biomarcador pronóstico de la enfermedad (Figura 28). No es la primera vez que se correlaciona la expresión de LC3B-II con un peor pronóstico; en cáncer de esófago de células escamosas, al igual que en carcinoma hepatocelular, se ha visto que altas expresiones de esta proteína se asocian a un peor pronóstico de la enfermedad ¹⁶³⁻¹⁶⁵. También en cáncer gástrico se ha observado que la expresión de LC3B se asocia a una menor supervivencia, sobretodo en pacientes de grado I, viéndose, además, una mayor invasión de los vasos sanguíneos y metástasis en nódulos linfáticos e hígado ¹⁶⁶. En el caso del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, la sobreexpresión de LC3B está relacionada con una menor supervivencia global ¹⁶⁷, y en carcinoma cutáneo de células escamosas dicha sobreexpresión se asocia a un mayor estadio y mayor diámetro del tumor ¹⁶⁸. También en cáncer colorrectal se ha encontrado que una expresión alta de esta proteína se asocia al grado de diferenciación tumoral y metástasis a nódulos linfáticos ¹⁶⁹. No obstante, en el caso del carcinoma papilar de tiroides se han encontrado resultados contradictorios puesto que se ha propuesto que la sobreexpresión de LC3B podría correlacionarse con el desarrollo del cáncer ¹⁷⁰ o que la expresión disminuida respecto a la basal se correlaciona con este tumor ¹⁷¹. Este no es el único tumor en el que se observa que la baja expresión de LC3B está relacionada con un peor pronóstico; en cáncer de mama triple negativo se ha visto que la progresión y el desarrollo del tumor está unido a una disminución de la expresión de LC3B y de la autofagia ¹⁷². En el caso del mieloma múltiple se ha observado que la expresión de esta proteína se asocia a una mayor supervivencia global de la enfermedad ¹⁷³. En carcinoma de ovario se ha descrito que una baja expresión de LC3B favorece la progresión tumoral, mientras que una alta expresión se asocia a un comportamiento menos agresivo y mejor respuesta a la quimioterapia ¹⁷⁴. También en carcinoma renal de células claras y en carcinoma de cérvix se correlaciona la baja expresión de LC3B con una mayor progresión tumoral ^{175,176}.

En vista de lo anteriormente expuesto, LC3B podría servir como biomarcador pronóstico de glioblastoma multiforme dado que la ausencia de expresión está asociada a supervivencias más largas, aunque son necesarios más estudios para determinar su papel en la aparición y el desarrollo del tumor.

2.2 p62

p62 es un modulador implicado en múltiples rutas de señalización como la ruta de NFκB y la autofagia¹⁷⁷. En los últimos tiempos se ha visto como su papel en este último proceso tiene una importancia creciente, al ser centro de señalización para la activación del complejo mTORC1 en los lisosomas, molécula central en la ruta Keap1-Nrf2 y ser un receptor de la ruta de autofagia selectiva^{178,179}. P62 se encuentra habitualmente distribuido en el citoplasma, el núcleo, los autofagosomas y los lisosomas. En respuesta al estrés se transloca a los sustratos autofágicos poliubiquitinados y los acerca a la maquinaria enzimática¹⁷⁹. Se ha observado que la autofagia es responsable de la degradación de p62 y que el bloqueo de este proceso conlleva a la formación de agregados de la proteína y su acumulación¹⁸⁰.

Otros grupos han estudiado la expresión de p62 en tejido cerebral normal, tanto por inmunohistoquímica como por western blot, observando una expresión débil¹⁶¹. El estudio de expresión de la proteína p62 en el presente trabajo muestra que aproximadamente el 97% de los pacientes con glioblastoma tienen expresiones bajas de la proteína o carecen por completo del ella, frente al 56% de pacientes con astrocitomas de bajo grado (Figuras 31 y 33). De hecho, los resultados muestran una asociación entre la expresión normal de proteína y los tumores de bajo grado, sugiriendo que la expresión de esta proteína podría estar relacionada con el estadio y la agresividad tumoral (Tabla 14). Debido a que la degradación de p62 es un marcador autofágico, se podría concluir que la autofagia está mucho más activada en los tumores de alto grado; sin embargo, existen indicios que prueban que el nivel de expresión de p62 no siempre se correlaciona inversamente con la actividad autofágica¹⁸¹. Éste no es el primer trabajo en el que se describe que la expresión de p62 podría estar relacionada con el estadio tumoral. Este efecto se ha descrito también en cáncer de mama, donde su expresión se correlaciona inversamente con el estadio del tumor¹⁸², en cáncer de pulmón de células no pequeñas¹⁸³, en sarcomas de tejidos blandos¹⁸⁴ y en gliomas¹⁸⁵, observándose en todos ellos la misma relación. En el caso del carcinoma oral de células escamosas se ha visto que expresiones altas de p62 se asocian con un comportamiento más agresivo del tumor¹⁸⁶ y se ha descrito un incremento en la expresión de la proteína también en carcinoma ductal invasivo¹⁸⁷.

El análisis de las características clínicas de edad, sexo, localización del tumor y tratamiento en nuestros pacientes no mostró ninguna asociación con la expresión de p62. No obstante, la ausencia de expresión de la proteína se asoció con supervivencias más largas en pacientes con glioblastoma (Figura 32). Este mismo resultado se ha observado en cáncer de mama después de tratamiento con quimioterapia adyuvante¹⁸⁸ y en cáncer de mama triple negativo, donde la acumulación de p62 se asocia a un peor pronóstico¹⁸⁹. En cáncer de pulmón se ha descrito que un alto nivel de expresión se correlaciona con una supervivencia más corta¹⁸³, igual que en cáncer de endometrio y cáncer de ovario epitelial^{190,191}. El estudio de expresión de p62 en gliomas también

sostiene que altos niveles de proteína se asocian a una supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad más cortas ¹⁸⁵. Por último, en cáncer gástrico, niveles elevados de p62 se correlacionan con una diferenciación más pobre, aunque menos metástasis a nódulos linfáticos ¹⁹².

A la vista de estos resultados, se puede concluir que p62 podría ser usado como biomarcador pronóstico en pacientes con glioblastoma y su expresión podría usarse como marcador de la agresividad y el estadio tumoral.

2.3 TRAF6

TRAF6 es una proteína de la familia de los factores asociados al receptor TNF (TRAF) que median la transducción de señales de la superfamilia de receptores TNF. Además, TRAF6 también participa en la ruta de transducción de la familia Toll/IL1 y de receptores como RANKL o CD40. Esta proteína también media la activación de JNK y p38. Su estructura tiene múltiples sitios de interacción con otras proteínas como las quinasas PKC α , SRC e IRAK1. Además, su interacción con p62 regula la ruta de NF κ B que activa la kinasa I κ B (IKK) ¹⁹³. Recientemente se han descubierto nuevos indicios de la importancia de TRAF6 en el proceso de autofagia, no sólo por su interacción con p62, sino porque es necesario para la activación del complejo mTORC1, regulando de esa manera el proceso ¹⁹⁴.

Numerosos estudios apoyan la importancia de TRAF6 en cáncer. En nuestro trabajo hemos observado que los niveles de expresión de TRAF6 son variables en los pacientes de glioblastoma multiforme, viéndose expresión normal comparada con el control en un 44% de los casos, un 31% sin expresión, un 9% con sobreexpresión de la proteína y el 16% restante presentaron disminución de la expresión, mientras que sus niveles en astrocitomas de bajo grado resultaron similares al control en aproximadamente el 96% de los tumores (Figuras 35 y 36). Estos resultados muestran que la ausencia de expresión de la TRAF6 o su expresión baja se asocian con glioblastoma multiforme, sugiriendo que la expresión de la proteína es inversamente proporcional al estadio y la agresividad tumoral (Tabla 15). Estudios previos de otros grupos en gliomas sugieren que la expresión de TRAF6 está relacionada con el grado del tumor ¹⁹⁵. En cáncer de pulmón se ha observado que la expresión de esta proteína se correlaciona con la presencia metástasis ganglionares, el estadio y el tamaño del tumor ¹⁹⁶ y en cáncer gástrico y de colon el nivel de expresión de TRAF6 se relaciona con el grado de diferenciación, la invasión y la metástasis ganglional ^{197,198}. Asimismo, en cáncer de páncreas se observa que la sobreexpresión de la proteína se asocia a proliferación y migración celular ¹⁹⁹.

En este trabajo no hemos encontrado relación entre la expresión de TRAF6 y la supervivencia de los pacientes. Lo mismo se ha observado en cáncer colorrectal ²⁰⁰. Sin embargo, la expresión elevada de TRAF6 se correlaciona con peor pronóstico y supervivencia corta en cáncer gástrico ¹⁹⁷, cáncer de mama triple negativo no metastático ²⁰¹, cáncer de colon ¹⁹⁸ y gliomas ¹⁹⁵. El hecho de que otros estudios hayan encontrado un valor pronóstico de la expresión de TRAF6 en gliomas, pero no en nuestro trabajo puede ser debido al tipo tumoral. No obstante, sería necesario

un estudio en mayor profundidad y con una muestra mayor para descartar por completo el valor pronóstico de esta proteína en glioblastoma multiforme.

2.4 PKCz

La proteína PKCz es una isoforma atípica de la familia de proteína quinasa C ²⁰². Esta molécula está implicada en la regulación de diversas funciones celulares al ser proteína central en varias rutas de señalización. Por una parte, PKCz promueve la supervivencia celular mediante la activación de las rutas ERK y NF-κB; además, interviene en la cascada de apoptosis ²⁰³ y modula la señalización de factores de crecimiento y otros estímulos como la insulina y la polaridad celular ²⁰⁴. PKCz necesita interactuar con proteínas como p62 o MEK5. Su interacción con p62 se produce a través de su dominio PB1 (Phox/Bem1p) ²⁰⁵.

El estudio de la expresión de PKCz en glioblastoma multiforme muestra que aproximadamente el 60% de los tumores incluidos en este trabajo tienen una expresión normal de la proteína comparada con la de la muestra control (T98G), el 30% la tiene baja y el resto la sobreexpresan (Figura 38). Además, se observa que el patrón de expresión presenta una distribución diferencial en hombres y en mujeres (Tabla 16). Sin embargo, en astrocitomas de bajo grado el nivel de expresión de PKCz es muy similar al control. No hemos observado diferencias entre los tumores de alto y bajo grado (Figura 40 y Tabla 17). Se han descrito expresiones aumentadas de PKCz en cáncer de páncreas ²⁰⁶ y se ha visto que un aumento de expresión de PKCz en líneas de tumores de endometrio se correlaciona con una alta tasa proliferativa celular ²⁰⁷. En nuestro conocimiento, no existen estudios hasta el momento que relacionen la expresión de PKCz con el sexo de los pacientes ni estudios en los que se describa esta expresión en tejido cerebral normal o células de la glía sanas.

Nuestros resultados muestran, además, que la ausencia de expresión de la proteína se asocia con supervivencias más largas en pacientes con glioblastoma. A pesar de que ésta es la primera vez se estudia el posible papel pronóstico de esta proteína en glioblastoma, sí se ha descrito que la inhibición de PKCz bloquea la proliferación de líneas celulares de glioblastoma ²⁰⁸, lo que respalda nuestros resultados. No obstante, en líneas celulares de cáncer de ovario se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína se relaciona con mayor supervivencia celular ²⁰⁹.

Este es el primer trabajo en el que se estudia la expresión de PKCz en tumores astrocíticos, encontrándose que ésta se ve asociada a la supervivencia del paciente, sugiriendo que PKCz podría ser usado como un marcador pronóstico en pacientes con glioblastoma y que su inhibición podría ser una nueva diana terapéutica en este tumor.

2.5 mTOR

mTOR es una serin-treonin quinasa que regula multitud de funciones celulares, como el crecimiento, la proliferación y la supervivencia ^{210,211}. Esta proteína puede estar formando parte de

dos complejos: mTORC1 y mTORC2 ²¹². mTORC1 inhibe el complejo ULK1 quinasa que inicia la autofagia bajo condiciones de carencia de nutrientes ^{213,214}.

Nuestro estudio de mTOR en tumores del SNC muestra que la expresión de esta proteína es similar a la basal en aproximadamente el 50% de los glioblastomas estudiados, mientras que el 35% no lo expresan (Figura 42). En los tumores astrocíticos de bajo grado encontramos expresión normal de la proteína (70%) (Figura 43). Sin embargo, mTOR aparece habitualmente sobreexpresado en muchos tipos tumorales ²¹⁵, como es el caso del cáncer colorrectal ²¹⁶, el cáncer de mama ductal invasivo ²¹⁷, las neoplasias hepáticas primarias ²¹⁸ o el carcinoma cervical de células escamosas ²¹⁹. En cáncer de ovario la sobreexpresión de mTOR está descrita en aproximadamente el 80% de los casos y se relaciona con mal pronóstico del tumor ²²⁰; esto también se ha descrito en cáncer de vejiga ²²¹, cáncer de mama luminal A en pacientes con obesidad ²²², osteosarcoma ²²³ o cáncer de cabeza y cuello ²²⁴ entre otros. No obstante, la sobreexpresión de mTOR también se asocia a pronóstico favorable en carcinoma de próstata ^{225,226} y de laringe ²²⁷. En cáncer de endometrio se ha descrito expresión de mTOR disminuida relacionada con menor supervivencia libre de enfermedad ²²⁸. En nuestro conocimiento, no existen trabajos previos que estudien la expresión de la proteína mTOR en tejido cerebral normal o células de la glial sanas, lo que nos impide evaluar el papel de la línea T98G como control en este estudio.

Nuestros resultados muestran que la expresión de mTOR en glioblastoma se correlaciona con una edad de aparición del tumor más tardía (Tabla 18). Este hallazgo también ha sido descrito en cáncer de endometrio ²²⁹ y en cáncer de ovario ²²⁰.

En conclusión, nuestros resultados revelan expresión disminuida de mTOR en glioblastoma y que la expresión de esta proteína se asocia a una aparición más tardía del tumor, sugiriendo un posible papel en el desarrollo tumoral en edades avanzadas. No obstante, son necesarios estudios en mayor profundidad para entender cuál es el mecanismo por el cual se produce esta dependencia con la edad.

2.6 Beclin1

Beclin1 es el ortólogo mamífero de Atg6/Vps30 en levaduras. Se trata de una proteína clave en el proceso de autofagia ya que forma, junto con las proteínas Vps34/PI3K, mATG14 y p150, el complejo multimérico PI3K de clase III, necesario para la formación del autofagosoma ^{230,231}.

Muchos estudios han relacionado la expresión de Beclin1 con la progresión y el pronóstico de diferentes tipos tumorales. Así, se ha visto que en el cáncer colorrectal la expresión de esta proteína es superior en las células tumorales que en el tejido sano adyacente ^{169,232}, lo que se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad ²³³. Lo mismo ocurre en el síndrome mielodisplásico ²³⁴. No obstante, en la mayoría de tumores donde se han estudiado los niveles de expresión de Beclin1 se ha visto que éstos son más bajos que en tejidos sanos y que esta baja expresión se asocia a progresión tumoral, proliferación celular, peores pronósticos y menores

supervivencias globales y libres de enfermedad. Es el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas ²³⁵, el carcinoma renal de células claras ²³⁶, el mieloma múltiple ¹⁷³, el carcinoma de lengua de células escamosas ²³⁷, el cáncer de mama ²³⁸⁻²⁴⁰, el cáncer gástrico ^{166,240}, el linfoma ²⁴⁰, el carcinoma de ovario ²⁴¹, el carcinoma de laringe de células escamosas ²⁴², el carcinoma hepatocelular ²⁴³ y el carcinoma de cérvix ²⁴⁴ entre otros. En el caso del cáncer de próstata, se han descrito niveles de expresión de Beclin1 bajos, aunque no se ha encontrado correlación entre éstos y el grado de recurrencia o el estadio tumoral ²⁴⁵.

Nuestros resultados muestran expresiones de Beclin1 cercanas a la del control en aproximadamente la mitad de los glioblastomas multiformes estudiados, mientras que casi la totalidad de los tumores restantes no muestran expresión de la proteína o la presentan muy baja (Figura 45). En los tumores de bajo grado la expresión es muy cercana a la del control en la mayoría de los casos (Figura 46). Es decir, nuestros resultados sugieren que la ausencia de expresión de Beclin1 se asocia a tumores de alto grado (Tabla 20), por lo que la expresión de Beclin1 podría estar relacionada con el grado tumoral. Estos resultados confirman los resultados de otros grupos en tumores cerebrales, que muestran que la expresión de Beclin1 es inferior en tumores de alto grado ²⁴⁶ y que los niveles de esta proteína se correlacionan con la progresión y el grado tumoral de los astrocitomas ¹⁶². La expresión de Beclin1 ha sido estudiada en la línea celular T98G y en tejido cerebral normal observando en ambos casos una expresión débil ¹⁶¹, lo que sugiere que la línea celular T98G es un control acertado para el estudio de expresión de esta proteína.

Se ha descrito también que la expresión de Beclin1 se correlaciona con apoptosis en gliomas de alto grado ²⁴⁷. A pesar de que nuestros resultados no sugieren una relación entre los niveles de expresión de Beclin1 y la supervivencia del paciente, sí se ha descrito que esta proteína puede tener alto valor pronóstico en glioblastoma multiforme. Así, se ha visto que altos niveles citoplasmáticos se asocian a mejor pronóstico de la enfermedad, menos proliferación celular, mejor estatus de Karnofsky, alta respuesta de progresión libre de enfermedad y supervivencias globales más largas ^{248,249}.

En este trabajo hemos confirmado a Beclin1 como un posible biomarcador de progresión y estadio tumoral en tumores astrocíticos. A pesar de que el valor pronóstico de esta proteína está demostrado en glioblastoma, no hemos encontrado relación entre sus niveles de expresión y las supervivencias globales de los pacientes incluidos en nuestro trabajo, por lo que un estudio en mayor profundidad, con una muestra mayor, sería necesario para confirmar estos resultados.

2.7 PI3KCA

PI3K (fosfatidil-inositol 3 quinasa de clase III) es una proteína central del metabolismo celular. Su interacción con p150, Beclin-1 y mATG14 genera el complejo proteico PI3K de clase III, necesario para la nucleación del fagoforo y el proceso de autofagia ⁸⁹. Además, tiene un papel importante en la regulación de la proliferación, la progresión y el desarrollo tumoral ^{250,251}. La ruta

PI3K/Akt/mTOR se encuentra alterada en muchos tumores mediante diferentes mecanismos, como la amplificación o la presencia de mutaciones puntuales en el gen PI3KCA²⁵¹. En gliomas de alto grado se ha observado que el gen PI3KCA está mutado en el 5-7% de los tumores²⁵² y sobreexpresado en la mayoría de los gliomas²⁵³. No obstante, nuestros resultados muestran que aproximadamente el 40% de los glioblastomas estudiados carecen de expresión de PI3KCA, mientras que otro 40% presenta expresiones muy similares a la del control (Figura 48). En el caso de los astrocitomas de bajo grado, la expresión es normal en la mayoría de los tumores, con tan sólo un 11% de ellos sin expresión (Figura 49). El análisis de estos resultados denota una asociación entre la ausencia de expresión de PI3KCA y los glioblastomas, sugiriendo una posible relación entre esta proteína y el grado tumoral (Tabla 21). La mayoría de trabajos estudian la expresión de esta proteína mediante inmunohistoquímica, lo que puede ser una de las razones por las que las expresiones detectadas en nuestros pacientes sean inferiores a las descritas en gliomas. El hecho de no disponer de tejido glial sano para utilizarlo como control de estudio también puede modificar nuestros resultados.

La expresión de la proteína PI3KCA ha sido estudiada en otros tipos tumorales. Así, se detecta sobreexpresión de esta proteína en carcinoma nasofaríngeo²⁵⁴ y en cáncer gástrico, donde, además, esta sobreexpresión se asocia a peor pronóstico y metástasis^{255,256}.

En conclusión, describimos por primera vez en este trabajo una asociación entre la expresión de PI3KCA y el grado de los tumores astrocíticos, aunque no se ha encontrado un valor pronóstico de la proteína en pacientes con este tipo de tumores.

2.8 Análisis de la correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia

En nuestro trabajo hemos encontrado correlación estadística significativa en la expresión de varias proteínas implicadas en la ruta de la autofagia en tumores astrocíticos. Así, PKCz se correlaciona con p62 y LC3; TRAF6 con LC3 y PKCz; mTOR con LC3 y PKCz; Beclin1 con LC3, PKCz y TRAF6; y PI3KCA con LC3, p62, PKCz, TRAF6 y Beclin1.

La asociación existente entre PKCz y p62 es lógica teniendo en cuenta que ambas proteínas interactúan entre ellas. De hecho, p62 fue descubierta como una proteína de interacción con la proteína quinasa atípica PKCz²⁵⁷ y se sabe que PKCz y p62 colocalizan habitualmente²⁰⁴. PKCz y p62 interactúan a través del dominio PB1, lo que conlleva la activación de la ruta de NFκB, tanto de manera dependiente de RANKL como independiente²⁰⁵.

La correlación encontrada entre PKCz y TRAF6 es algo más difícil de explicar. Se sabe que TRAF6 participa en la activación de la ruta NFκB mediante su interacción con p62 a través de su dominio TB, del mismo modo que PKCz lo hace a través del dominio PB1. De esta manera ambas proteínas podrían estar interactuando de manera indirecta a través de p62. Se piensa que es el cassette p62/PKCz el que regula la activación de la vía mediada por TRAF6²⁵⁸. Además, se sospecha

que PKC ζ podría interactuar físicamente con el complejo CARMA3/BCL10/MALT1/TRAF6 en la activación de la ruta NF κ B, aunque aún no hay estudios que confirmen de manera concluyente esta interacción²⁵⁹.

TRAF6 se une a LC3 a través de p62 y ubiquitina a Beclin1^{260,261}. La presencia de dos dominios de unión a TRAF6 en Beclin1 facilitaría la unión entre las proteínas y su ubiquitinización²⁶²; de esta manera, TRAF6 podría regular la formación del autofagosoma y activar la autofagia, lo que podría explicar la correlación entre las proteínas TRAF6, LC3 y Beclin1.

Beclin1 interactúa con la fosfatidil-inositol 3 quinasa de clase III, PI3K/Vps34, para formar el complejo proteico PI3K de clase III, necesario para la nucleación del fagoforo y regulador del proceso de autofagia en sus estadios iniciales⁹¹, lo que explicaría la correlación entre Beclin1 y PI3K.

La asociación entre las proteínas PI3K y LC3 se justificaría al ser ambas moduladores positivos del proceso de autofagia a pesar de que no interactúan de manera directa entre ellas^{75,263}.

En nuestro trabajo hemos encontrado una correlación positiva entre la proteína mTOR y LC3. No obstante, que se sepa, estas proteínas no intervienen de manera conjunta en otra ruta que no sea la autofágica y, en ella, sus roles son contrarios al ser mTOR un inhibidor de la ruta y LC3 un regulador positivo. Lo mismo ocurre en el caso de las proteínas PI3K y p62 que, según nuestros resultados, parecen tener una relación directa. Sin embargo, en nuestro conocimiento, estas proteínas tan sólo intervienen conjuntamente en la autofagia, donde presentan papeles opuestos. PI3K es un regulador positivo mientras que es la ausencia de expresión de p62 la que regula positivamente el proceso autofágico. Tampoco hemos encontrado la base biológica de la correlación entre las expresiones de las proteínas PKC ζ con LC3, mTOR, Beclin1 y PI3K; y PI3K con TRAF6.

2.9 Estado de la autofagia

Debido a que la conversión de LC3-I a LC3-II y la degradación de p62 se consideran marcadores de la inducción y el flujo autofágico respectivamente, su estudio conjunto es la mejor manera de determinar el estado de la autofagia de un tumor.

El análisis conjunto de las expresiones de LC3-II y p62 en tumores astrocíticos determinó que la mayoría de tumores presentan una autofagia activa (67,7% en glioblastoma multiforme y 88,5% en astrocitomas de bajo grado) (Tabla 24), encontrándose diferencias significativas entre grados alto y bajo. En ningún tipo tumoral hemos detectado autofagia aberrante.

Nuestros resultados no muestran una asociación entre el estado de la autofagia y el pronóstico de los pacientes, a pesar de que el estudio de la expresión de LC3B y p62 de manera independiente sí mostró relación con el pronóstico de los pacientes. En carcinoma oral de células escamosas se ha observado que tumores con autofagia aberrante y tumores de bajo grado con

autofagia activada o basal presentan pronósticos más desfavorables¹⁸⁶ y en cáncer de próstata se ha visto que bajo nivel autofágico se correlaciona con peor pronóstico²⁶⁴.

2.10 Análisis de alteraciones en el promotor de hTERT en glioblastoma multiforme

hTERT (human telomerase reverse transcription) es la subunidad catalítica con capacidad transcriptasa reversa de la telomerasa. Habitualmente las células cancerígenas escapan al acortamiento telomérico por hiperactivación de esta proteína, evitando de esta manera la muerte por apoptosis o la senescencia^{265,266}. hTERT está sobreexpresado en una amplia variedad de tumores, incluyendo los gliomas²⁶⁷. Además, es habitual encontrar mutaciones somáticas en el promotor de este gen, que confieren mayor actividad del promotor²⁶⁷. Las dos mutaciones más frecuentes son g.228C>T y g.250C>T, situadas a -124 y -146bp por delante del ATG que marca el inicio de traducción. Además, estas mutaciones son más frecuentes en glioblastomas primarios (82%) que en secundarios (35%)^{268,269}. Recientemente, se han identificado estas mutaciones como marcadores pronóstico en gliomas al correlacionarse con peor pronóstico²⁷⁰ y necesidad de tratamientos más agresivos²⁷¹.

Nuestros resultados muestran que el 60% de los glioblastomas incluidos en nuestro trabajo presenta al menos una de las dos mutaciones, siendo la mutación más frecuente la g.250C>T, que aparece en el 41% de los tumores (Tabla 25). Este porcentaje es inferior al descrito en glioblastomas primarios y mayor que en secundarios. El hecho de no tener datos respecto al tipo de glioblastoma analizado hace que probablemente el estudio se haya hecho en una mezcla de tumores primarios y secundarios, lo que explica el porcentaje observado.

El estudio de estas mutaciones en los pacientes analizados no sugiere un valor pronóstico. Sería necesario un estudio con un mayor número de pacientes, diferenciando los grupos primarios y secundarios, para confirmar el valor pronóstico de estas mutaciones en nuestra serie de pacientes.

Nuestros resultados sugieren una asociación entre la presencia de mutaciones en el promotor de hTERT y la expresión de p62. No obstante, no se ha podido encontrar una base biológica que apoye esta aseveración, al no conocerse ninguna ruta de señalización en la que participen estas dos proteínas. Por tanto, se necesitarían nuevos estudios para confirmar esta observación.

2.11 Análisis de la correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia y la clasificación molecular tumoral

Desde los años 90 se ha incrementado considerablemente el conocimiento sobre las características genéticas y moleculares de los glioblastomas, lo que ha permitido identificar patrones de expresión de proteínas asociados a diferentes subtipos moleculares de este tumor³². *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ha establecido una clasificación molecular para el glioblastoma multiforme, dividiéndolo en los subtipos proneural, clásico y mesenquimal en función de la presencia de

mutaciones o amplificaciones en genes como *EGFR*, *PDGFRA*, *PTEN*, *TP53*, *NF1*, *NFκB*, *RB1*, *IDH1* o *ATRX*, patrones de metilación del DNA y ganancias o pérdidas cromosómicas^{72,73}. Dichos subtipos, además, presentan diferente pronóstico y respuesta a los tratamientos existentes frente al tumor³⁷. La identificación de nuevos factores asociados a cada perfil molecular, por tanto, podría ser clave en el diagnóstico de los pacientes y la predicción de la evolución del tumor y su respuesta al tratamiento.

Desafortunadamente, no hemos encontrado una relación entre el subtipo molecular de los tumores analizados y la expresión de proteínas relacionadas con la ruta autofágica. No obstante, el estudio tan sólo se ha podido llevar a cabo en 24 pacientes, por lo que su ampliación para obtener un tamaño muestral mayor sería necesaria antes de descartar la expresión de estas proteínas como un factor asociado al perfil molecular del tumor.

3 NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS BASADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

3.1 Análisis del efecto del paclitaxel en líneas celulares de glioblastoma multiforme

El paclitaxel es un principio activo de la familia de los taxanos, aislado por primera vez en 1962 a partir del árbol *Taxus brevifolia*²⁷².

La diana molecular del paclitaxel son los microtúbulos, especialmente importantes en la formación del huso mitótico, pero también en el mantenimiento de la estructura celular, la motilidad y el movimiento a través del citoplasma. Estas estructuras miden unos 25-30nm de diámetro y consisten en polímeros de tubulina en equilibrio dinámico en los que heterodímeros de tubulina, formados por las subunidades α y β , se añaden o quitan de los extremos del microtúbulo maduro, preferiblemente en el extremo positivo. El paclitaxel promueve el ensamblaje de microtúbulos estables e inhibe su despolimerización. Debido a que la formación de microtúbulos ocurre durante G2 y la profase de mitosis, el paclitaxel provoca una parada en G2/M y favorece la apoptosis²⁷²⁻²⁷⁴.

El paclitaxel ha demostrado tener alto potencial antitumoral y su uso ha mejorado la respuesta al tratamiento en el cáncer de ovario²⁷⁵, mama²⁷⁶, pulmón de células no pequeñas²⁷⁷, pulmón de células pequeñas²⁷⁸, cáncer de próstata^{279,280}, neoplasia de cabeza y cuello²⁸¹, leucemia²⁸² y cáncer gástrico^{283,284}, entre otros²⁸⁵. Además, este fármaco ha sido aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama metastático, cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado o metastático y cáncer de páncreas metastático²⁸⁶.

El paclitaxel es una molécula altamente lipofílica e insoluble en agua, lo que la convierte en difícil de formular en solución. Múltiples vehículos se han desarrollado para intentar transportar el paclitaxel hasta las células cancerígenas²⁷³, incluyendo aproximaciones específicas para el

tratamiento del glioblastoma en combinación con temozolamida ²⁸⁷⁻²⁸⁹. Actualmente, también existen ensayos clínicos que incorporan el paclitaxel en el tratamiento del glioblastoma ²⁹⁰.

El estudio de la viabilidad de líneas celulares de glioblastoma tratadas con paclitaxel muestra que su crecimiento se inhibe a la menor concentración testada (5nM) lo que confirma la dosis descrita para la inhibición de la viabilidad en cultivos *in vitro* de 2.5-7.5nM ²⁹¹ (Figura 50). Como era de esperar, el paclitaxel produce un significativo bloqueo en G2/M a 24h en todas las líneas celulares a esta concentración, que disminuye a medida que aumenta el tiempo de exposición al tratamiento, alcanzando ratios de muerte de hasta 42,47% en LN18, que es la línea más sensible al fármaco (Figura 51). El bloqueo de células en G2/M por paclitaxel ha sido descrito en múltiples tipos tumorales como, entre otros, cáncer de cabeza y cuello ²⁹², mieloma ²⁹³ y cáncer de pulmón de células no pequeñas ²⁹⁴. Se ha visto, además, que la activación de PTEN favorece la acción del paclitaxel en cáncer de vejiga ²⁹⁵. Esto podría explicar que las líneas T98G y A172 tengan una respuesta ligeramente menor al fármaco, ya que presentan este gen deletado.

A pesar de que el paclitaxel induce apoptosis, este fármaco también inhibe la autofagia. En células mitóticas, este compuesto bloquea la Vps34, impidiendo la iniciación del autofagosoma. En células no mitóticas, el paclitaxel inhibe el movimiento del autofagosoma, impidiendo su maduración y fusión con el lisosoma ²⁹⁶. El estudio de la autofagia en las líneas de glioblastoma tratadas con este fármaco confirma la inhibición del proceso. En todas las líneas tratadas se observa una disminución de Beclin1 (Figura 55) y un aumento de la expresión de mTOR (Figuras 56 y 59), lo que sugiere una inhibición de la autofagia. La expresión de LC3B-II es similar a la basal o menor que ella (Figuras 54 y 58). Sin embargo, la expresión de p62 varía en función de la línea celular (Figuras 53 y 57), sugiriendo que las características moleculares de cada tumor pueden ser determinantes en la respuesta al fármaco.

En conclusión, el tratamiento con paclitaxel inhibe la autofagia e induce muerte celular en glioblastomas, por lo que es una posible aproximación terapéutica para este tumor. Su combinación con otro inhibidor autofágico podría generar resultados más prometedores, como se ha demostrado *in vitro* en otros tipos tumorales ²⁹⁷⁻³⁰², de manera que su estudio sería aconsejado en este tumor.

3.2 Análisis del efecto de la metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

La metformina es una molécula de la familia de las biguanidas, comúnmente usada como tratamiento oral para la diabetes tipo 2 ³⁰³.

Hasta la fecha, se conocen dos mecanismos de acción de la metformina. Por una parte, la metformina inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC1), provocando una disminución en la cantidad de ATP, que incrementa la AMPK (AMP-activated protein kinase). La AMPK es un regulador de la homeostasis, el metabolismo y la síntesis de proteínas, al inhibir mTOR. Por otra parte, la metformina modifica el metabolismo global, limitando

los niveles de insulina y la producción de IGF-1 por parte del hígado, al disminuir su gluconeogénesis. De esta manera, se disminuye la activación del receptor de insulina/IGF-1, que conlleva la no activación de la ruta de PI3K y a la inhibición de mTOR³⁰⁴⁻³⁰⁶. Al inhibir mTOR a través de sus dos mecanismos de acción, la metformina es un inductor de la autofagia³⁰⁷.

En los últimos años se ha visto que los pacientes diabéticos tratados con metformina presentan un menor riesgo de desarrollar cáncer a lo largo de su vida, lo que ha llevado a estudiar este fármaco como posible estrategia terapéutica antitumoral^{305,308,309}. La metformina ha demostrado ser efectiva inhibiendo el crecimiento tumoral en leucemia, cáncer de páncreas, de próstata, de ovario, melanoma, cáncer de mama, de endometrio, de pulmón, carcinoma hepatocelular y gliomas^{310,311}. De hecho, existen varios ensayos clínicos que estudian la metformina, algunos en adyuvancia con otros agentes quimioterápicos, como es la temozolamida en glioblastoma (<http://clinicaltrials.gov>).

El estudio del tratamiento con metformina en líneas celulares de glioblastoma muestra que, en la mayoría de ellas, la inhibición total de la viabilidad celular no se alcanza a la máxima concentración estudiada, 8mM, aunque se inhibe ampliamente. *Ali Ubkec et al.* expone que concentraciones mayores de 5mM empiezan a generar inhibición del crecimiento en la línea T98G, aunque concentraciones superiores obtienen mejores resultados³¹². No obstante, nuestros resultados demuestran que la línea LN18 es más sensible a este fármaco y su crecimiento se inhibe totalmente a la concentración de 8mM (Figura 61). *Sesen et al.* confirma que la línea LN18 es más sensible al tratamiento con metformina que otras líneas de glioblastoma incluidas en su trabajo y sugiere que esto podría ser debido a tener PTEN germinal³¹³. De hecho, es posible que la metformina inhiba mTOR de manera más efectiva en líneas con PTEN germinal que en líneas que lo presenten mutado y que, por tanto, tengan la ruta PI3K/AKT activa constitutivamente.

El estudio del ciclo celular apenas muestra diferencias entre las líneas celulares tratadas y los controles sin tratar a los diferentes tiempos (Figura 62). No obstante, el tratamiento con metformina a las tres semanas muestra un aumento de la muerte celular (Figura 63), sugiriendo que un tratamiento a largo plazo con este fármaco podría mejorar su efecto antitumoral. Se ha descrito que el tratamiento con metformina genera un bloqueo modesto en la fase G1 en LN18³¹³. No obstante, este estudio se llevó a cabo usando una concentración de 10mM, superior a la usada en este trabajo, lo que podría ser la causa de la diferencia. Este bloqueo en G0/G1 también se ha descrito en melanoma³¹⁴, cáncer de pulmón³¹⁵, cáncer gástrico³¹⁶ y cáncer de endometrio, donde además se observa bloqueo en G2/M³¹⁷.

El estudio de expresión de proteínas autofágicas muestra una disminución de los niveles de p62 en todas las líneas celulares tanto en el estudio a corto como a largo plazo (Figuras 65 y 69), confirmando el efecto inductor sobre la autofagia de la metformina. En el caso de LC3B-II, sus niveles de expresión no parecen variar con el tratamiento de manera significativa (Figuras 66 y 70). Esto podría indicar que la inducción de la autofagia por parte de la metformina es leve o que existe

algún mecanismo compensatorio que limita su efecto inductor. No obstante, este mecanismo no se produciría sobre mTOR ya que los resultados demuestran que su expresión disminuye con la exposición al fármaco (Figuras 68 y 72). La expresión de Beclin1 disminuye en todas las líneas celulares (Figuras 67 y 71), apoyando la existencia de un mecanismo que limite la autofagia o indicando que la inducción por parte de la metformina no es muy fuerte. *Sesen et al.* también describe una ligera disminución en la expresión de Beclin1 en LN18, pero no en U87, U251 ni en SF767, sugiriendo que el uso de la metformina debería depender de las características específicas del tumor ³¹³.

La metformina ha demostrado ser un fármaco antitumoral útil en coadyuvancia con otros agentes en múltiples tumores, incluidos los gliomas. No obstante, nuestro estudio muestra resultados moderados a la concentración de 8mM en glioblastomas, aunque su efecto citotóxico aumenta en tratamiento a largo plazo. Serían necesarios nuevos estudios con otras concentraciones y en combinación con otros fármacos para confirmar el potencial antitumoral de este inductor de la autofagia.

3.3 Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + metformina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

La metilación del DNA, mediada por las DNA metiltransferasas (DNMTs), es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados. Debido a que se ha observado hipermetilación asociada al cáncer en múltiples tumores, se piensa que la metilación del DNA juega un papel importante en la carcinogénesis y, por ello, los inhibidores de DNMTs se han convertido en una herramienta terapéutica más en la lucha contra el cáncer ³¹⁸.

La 5-aza-2'-deoxicitidina (Decitabina®) es un análogo de citidina que se incorpora al DNA, se une e inhibe a las DNMTs ya que el átomo de carbono aceptor del grupo metilo de la citidina se sustituye por nitrógeno, lo que impide la metilación. Los efectos biológicos de la Decitabina® dependen de su incorporación al DNA durante su síntesis y, por tanto, se considera un agente específico de la fase S ³¹⁹⁻³²¹.

Se ha visto que la Decitabina® es beneficiosa en el tratamiento de diferentes tipos tumorales y su uso ha sido aprobado para el tratamiento del síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda ^{322,323}. Además, se ha visto que la Decitabina® mejora la acción de otros agentes quimioterápicos o radioterápicos en diferentes tipos tumorales ³²⁴⁻³²⁷. En el caso del glioblastoma, se ha demostrado que sensibiliza las células en cultivo a la radiación y a la temozolamida, usando un nanoconjugado del compuesto en el último caso ^{327,328}.

Para comprobar si una combinación de dos inductores autofágicos mejora el efecto citotóxico de los fármacos en células tumorales, se usó Decitabina® y metformina en líneas de glioblastoma multiforme. En este caso observamos mayor crecimiento en todas las líneas celulares usando el tratamiento en sinergia, que usando la metformina con igual concentración en solitario

(Figuras 73 y 61), por lo que debe existir un mecanismo por el que la Decitabina® modifica la viabilidad de células expuestas a la metformina. El estudio del ciclo celular muestra un ligero bloqueo en las fases G2/M y S (Figura 74), lo cual es razonable al ser la Decitabina® un agente que bloquea la fase G2/M. No obstante, el bloqueo es muy moderado.

El estudio de las proteínas autofágicas en las líneas celulares tratadas con estos dos fármacos muestra un aumento de expresión de la proteína LC3B-II (Figura 77), indicando una inducción autofágica. La proteína Beclin1 se observa constante tras 72h de tratamiento (Figura 78); sin embargo, la expresión de la proteína p62 disminuye en las líneas A172 y LN229, pero se mantiene constante en T98G y aumenta ligeramente en LN18 (Figura 76). Como se ha indicado anteriormente, existen estudios que muestran que el nivel de expresión de p62 no siempre se correlaciona inversamente con la actividad autofágica¹⁸¹, por lo que esta expresión diferencial de p62 no se debería interpretar como alteraciones en la inducción de la autofagia.

En conclusión, se presenta por primera vez en glioblastoma multiforme el estudio de la combinación de Decitabina®, un inhibidor de DNA metiltransferasas, inductor de la autofagia, con la metformina, otro inductor autofágico. Aunque se confirma el efecto inductor de la autofagia de estos fármacos, el tratamiento combinado no mejora los resultados de viabilidad ni de ciclo celular obtenidos usando la metformina en monoterapia.

3.4 Análisis del efecto de la cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

La cloroquina (CQ) (N'-(7-chloroquinolin-4-yl)-N,N-diethyl-pentane-1,4-diamine)³²⁹ es un agente lisosomotrópico capaz de atravesar la membrana lisosomal para protonarse, incrementando el pH del orgánulo. Además, este fármaco es capaz de inhibir la fosfolipasa A2 y la acilhidrolasa lisofosfolipídica, necesarias para la acidificación del lisosoma, favoreciendo, así, el incremento del pH del orgánulo, impidiendo la degradación de las sustancias que hay en él e inhibiendo la autofagia^{330,331}.

La cloroquina fue inicialmente desarrollada como tratamiento antimalárico³³², aunque actualmente se usa también para el tratamiento de enfermedades reumatológicas, inmunológicas y dermatológicas³³³. Recientemente, se ha analizado su capacidad antitumoral en combinación con radioterapia o agentes quimioterápicos,^{334,335} obteniendo resultados prometedores en cáncer de mama³³⁶, vejiga³³⁷, melanoma³³⁸, cancer de pulmón³³⁹, cancer de colon³⁴⁰ y gliomas³⁴¹⁻³⁴⁴, entre otros. De hecho, actualmente existen varios ensayos clínicos que estudian el uso de la cloroquina en adyuvancia con otros agentes quimioterápicos, como la temozolamida en el caso del glioblastoma multiforme (<http://clinicaltrials.gov>)³⁴³.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con cloroquina en líneas de glioblastoma multiforme inhibe la proliferación celular a las 72h con una concentración de 50µM, excepto en la línea celular LN18, que se inhibe con 10µM (Figura 79). El estudio del ciclo celular con una concentración intermedia de 25µM no muestra cambios respecto a los controles sin

tratamiento (Figura 80). Estos resultados parecen concordantes con lo encontrado por *Fan et al.* en líneas de cáncer de pulmón que, al usar bajas concentraciones de cloroquina (0,25-32 μ M), observan inhibición de la proliferación celular, pero no apoptosis ni muerte celular hasta que se aumenta la dosis (32-64 μ M)³³⁹. También en líneas de cáncer colorrectal se ha observado que la inhibición de la viabilidad celular es dependiente de la dosis y solo se detecta a partir de 20 μ M³⁴⁵. A dosis más altas también se ha observado apoptosis en cáncer de colon y de mama^{340,346}. No obstante, se ha descrito que la cloroquina genera parada del ciclo en G0/G1 en carcinoma hepatocelular³⁴⁷ y parada en G2/M en líneas de cáncer de mama³⁴⁸. En adyuvancia con radiación, células de glioblastoma muestran bloqueo en G2/M y aumento de la muerte celular³⁴⁴, aunque nosotros no hemos podido confirmar este resultado en tratamiento sin radiación con concentraciones de fármaco menores.

El estudio de proteínas autofágicas en líneas celulares del glioblastoma multiforme en tratamiento con cloroquina confirma la actividad inhibitoria de la autofagia de este fármaco. Todas las líneas celulares muestran un aumento de p62 (Figura 82) y una tendencia de aumento de expresión de LC3B-II (Figura 83). También en el caso de Beclin1 se observan niveles de expresión mayores o similares al control sin tratamiento (Figura 84). Como se ha explicado anteriormente, la cloroquina es un fármaco que impide la fusión del autofagolisosoma y la degradación de su contenido, provocando una acumulación de autofagosomas con LC3B-II en su membrana y aumento de p62 que no se degrada.

En resumen, nuestros resultados confirman la inhibición de la autofagia en líneas celulares de glioblastoma multiforme tratadas con cloroquina. A pesar de causar inhibición del crecimiento, no se observa bloqueo del ciclo celular ni muerte a la concentración analizada. No obstante, estudios previos demuestran que concentraciones más altas de fármaco o su uso en adyuvancia obtienen resultados más prometedores en varios tipos tumorales, por lo que el estudio de tratamientos combinados podría ser una estrategia conveniente en glioblastoma multiforme.

3.5 Análisis del efecto de la sinergia Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Para comprobar si una combinación de un inductor autofágico y un inhibidor de la autofagia mejora el efecto citotóxico de los fármacos en células tumorales hemos estudiado la acción concomitante de la Decitabina® con la cloroquina. El análisis del estudio de viabilidad muestra mayor crecimiento en todas las líneas celulares que usando la misma concentración de cloroquina en solitario (Figuras 85 y 79). Esto podría ser debido a que, al ser la Decitabina® un inductor autofágico³⁴⁹, contrarresta el efecto inhibitor de la cloroquina y su citotoxicidad. Se ha descrito que la Decitabina® genera parada del ciclo celular en G2/M por supresión de la ruta de p38/NF- κ B e inducción de p53^{323,350}. También se ha observado este efecto tras el tratamiento con cloroquina. No obstante, nosotros no observamos alteraciones del ciclo celular respecto a los controles en ninguna de las líneas estudiadas, más allá de un ligero bloqueo en la fase S. Este efecto se da con

independencia del estado de mutaciones de p53 en nuestras líneas celulares (Figura 86). Sería interesante implementar nuevos estudios para confirmar estos resultados.

El estudio de las proteínas autofágicas muestra una activación autofágica en las primeras etapas del tratamiento, observando aumento de LC3B-II en todas las líneas (Figura 89), debido probablemente al efecto inductor de la Decitabina®. Apenas se observan diferencias en la expresión de Beclin1 (Figura 90) y p62 (Figura 88). No obstante, la expresión de p62 parece tener una tendencia decreciente con el tratamiento. El hecho de que la expresión disminuya probablemente se deba al efecto inhibitor de la cloroquina en etapas finales del proceso.

En conclusión, se presenta por primera vez el estudio de la combinación de un inhibidor de DNA metiltransferasas, como es la Decitabina®, con un inhibidor autofágico, como es la cloroquina, en glioblastoma multiforme. A pesar de que se confirma el efecto inductor de la autofagia del primero, no se observa alta citotoxicidad en ninguna de las líneas tumorales tratadas con ambos fármacos.

3.6 Análisis del efecto del Panobinostat® (LBH589) en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Las histonas desacetilasas (HDACs) son un grupo de enzimas que regulan la expresión génica y el comportamiento celular al eliminar los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas y otras proteínas no histonas. En el caso de las histonas, esta desacetilación conduce a un estado condensado de la cromatina y al silenciamiento génico. En los últimos años se ha visto que estas proteínas son dianas terapéuticas muy prometedoras en cáncer y la búsqueda de moléculas capaces de inhibirlas y revertir estados epigenéticos aberrantes se ha convertido en una prioridad^{351,352}.

El Panobinostat® (LBH589) es un pan-inhibidor de histona desacetilasa (pan-HDACi) de la familia del ácido hidroxámico, que ha mostrado fuerte actividad inhibitoria frente a HDACs de clase I, II y IV²⁷³. Su efecto antitumoral se debe a diversos mecanismos: por una parte, al inhibir las HDACs de clase I, el Panobinostat® favorece la transcripción de genes supresores de tumores; por otra, actúa inhibiendo la HDAC6, una HDAC de clase IIb, localizada en el citoplasma, que desempeña un papel en el transporte de proteínas mal plegadas para su degradación en el lisosoma. La inhibición de HDAC6 genera acumulación de proteínas poliubiquitinadas, lo que produce estrés del retículo endoplasmático e induce apoptosis. Además, el Panobinostat® disminuye la angiogénesis, induce parada del ciclo celular, disminuye la motilidad de las células tumorales y la expresión de oncoproteínas como BCR-Abl y HER2. Entre sus dianas se encuentran, además, p53, NFkB, E2F1, Ku70, que regula la reparación del DNA, α -tubulina, importante en el citoesqueleto, y Hsp90^{352,354,355}.

El Panobinostat® ha demostrado actividad antiproliferativa frente a cáncer de mama, ovario, pulmón y mieloma múltiple³⁵⁶. De hecho, recientemente se ha aprobado en Estados Unidos el uso del Panobinostat® oral (Farydak®) en combinación con bortezomib y dexametasona en pacientes

con mieloma múltiple recurrente que no han respondido a, al menos, dos tratamientos previos ³⁵⁷. Su estudio en gliomas ha demostrado buenos resultados en glioma pontino intrínseco difuso ³⁵⁸ y en gliomas de alto grado en combinación con radioterapia estereotáctica ³⁵⁹. Su estudio clínico en combinación con bevacizumab en gliomas de alto grado fue paralizado en la fase II por no cumplir criterios ³⁶⁰. No obstante, sus combinaciones con el virus oncolítico Delta24-RGD y con bortezomib muestran resultados prometedores en cultivos in vitro de glioblastoma ^{361,362}.

El estudio de Panobinostat® en las líneas de glioblastoma multiforme T98G, A172, LN18 y LN229 muestra que el fármaco es capaz de inhibir la proliferación celular a 50nM (Figura 91). A esta concentración, produce un bloqueo en G2/M en todas las líneas, siendo más llamativo en las líneas A172 y LN229 (Figura 92). Este bloqueo en G2/M ha sido descrito en múltiples tipos de tumor como el de próstata ³⁶³, carcinoma renal ³⁶⁴, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas ³⁶⁵ y melanoma ³⁶⁶ entre otros. Una de las razones por las que el Panobinostat® podría producir parada del ciclo celular en G2/M es por inhibir la desacetilación de proteínas de regulación del huso mitótico. Estas proteínas se activan por desacetilación gracias a HDAC3 y HDAC6 al final de la fase S. Al mantenerse hiperacetiladas con el tratamiento, no se permitiría la continuación del ciclo, se activaría el punto de control G2 y la posterior muerte celular ³⁶⁷. La alteración del cinetocoro puede ser otro mecanismo de parada en G2/M ³⁶⁸.

Se ha descrito que el Panobinostat® posee capacidad antiproliferativa y proapoptótica en el liposarcoma vía PTEN, sobreexpresando esta proteína de manera independiente a la presencia de mutaciones en p53 ³⁶⁹. Debido a que T98G y A172 presentan PTEN deletado y que la presencia o no de mutaciones en p53 no parece determinante, sería de esperar que el tratamiento funcione mejor en las líneas LN18 y LN229. No obstante, nuestros resultados muestran un aumento de la muerte celular a medida que transcurre en tiempo de exposición al fármaco en las líneas A172 y LN229, pero no en T98G o LN18. Debido a que no hemos encontrado relación entre el mecanismo de acción del Panobinostat® y la proteína p16 (cuyo gen está deletado en A172, LN18 y LN229) o el estado de metilación del promotor de la MGMT, no se ha podido explicar el diferente comportamiento frente al fármaco de las líneas celulares estudiadas.

Tras el tratamiento con Panobinostat®, se ha podido observar una inducción del proceso autofágico al observar un aumento de expresión de la forma conjugada LC3B-II y Beclin1 y una disminución de p62 en la mayoría de las líneas (Figuras 95, 95 y 96). También en el estudio de otras enfermedades se ha descrito que el fármaco LBH589 induce autofagia ³⁷⁰, como es el caso del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida ³⁷¹, cáncer de hígado ³⁷² o el cáncer de colon ³⁷³.

En conclusión, el tratamiento con Panobinostat® induce autofagia en glioblastoma multiforme y podría ser una aproximación terapéutica válida para este tumor. Su combinación con otro modulador autofágico podría generar resultados más prometedores, por lo que sería necesario el estudio de posibles sinergias con este fármaco.

3.7 Análisis del efecto de la sinergia Panobinostat® (LBH589) + cloroquina en líneas celulares de glioblastoma multiforme

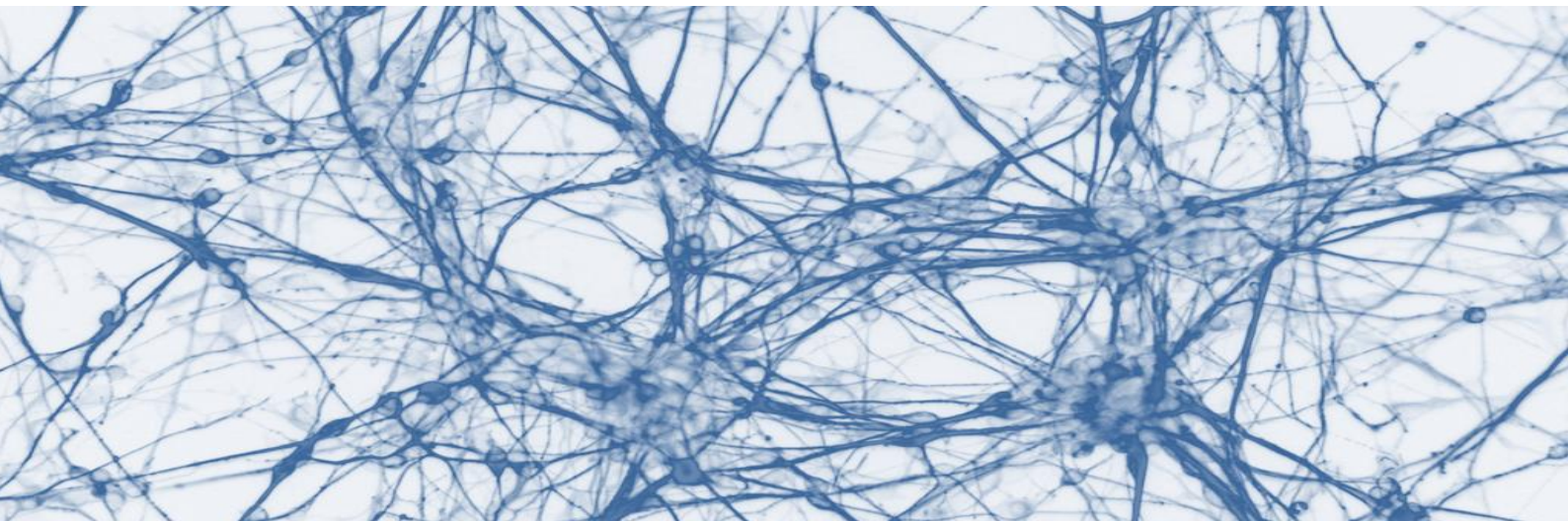
La combinación de inductores e inhibidores autofágicos podría aumentar la acción citotóxica de los fármacos por separado. *Abdel-Aziz et al.* observó el efecto sinérgico de la combinación de cloroquina y sunitinib, un inductor de la autofagia por regulación positiva de Beclin1, en líneas celulares de cáncer de mama, cervical, colorrectal, hepatocelular, laringe y próstata ³⁷⁴. En glioblastoma, se ha observado que la inhibición de la autofagia en etapas tardías del proceso y no en tempranas, usando cloroquina en combinación con un inductor de la autofagia como el trióxido arsénico, induce muerte celular apoptótica sinérgica ³⁷⁵. También en cáncer de mama ER positivo se ha visto que la combinación de HDACi y tamoxifeno, ambos inductores de la autofagia, con cloroquina promueve la inducción de la apoptosis, incluso en células resistentes ³⁷⁶. Finalmente, *Rao et al.* demostró que el cotratamiento con Panobinostat® y cloroquina producía acumulación de proteínas poliubiquitinadas, inhibía más el crecimiento y producía apoptosis en líneas de cáncer de mama triple negativas ³⁷⁷.

El estudio del crecimiento de líneas celulares de glioblastoma en tratamiento con cloroquina y Panobinostat® muestra inhibición total de la viabilidad de todas ellas usando cloroquina 25µM y Panobinostat® 50nM, manifestando mayor inhibición que con las mismas concentraciones de estos fármacos por separado (Figuras 91, 79 y 97). El análisis del ciclo celular tras el tratamiento revela una muerte celular significativa tras 24h de exposición al fármaco, que alcanza el 90% a las 72h de tratamiento en las líneas A172, LN18 y LN29 y del 75% en la línea T98G (Figura 98).

El análisis de proteínas autofágicas pone de manifiesto un aumento de los niveles de las proteínas LC3B-II, Beclin1 y p62 (Figuras 101, 102 y 100). El aumento de LC3B-II y Beclin1 indicaría una inducción de la autofagia promovida por el LBH589, mientras que el aumento de p62 denotaría acumulación de la proteína al no degradarse, ya que la autofagia estaría truncada en etapas finales del proceso por acción de la cloroquina. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito previamente en líneas de cáncer de mama triple negativo ³⁷⁷.

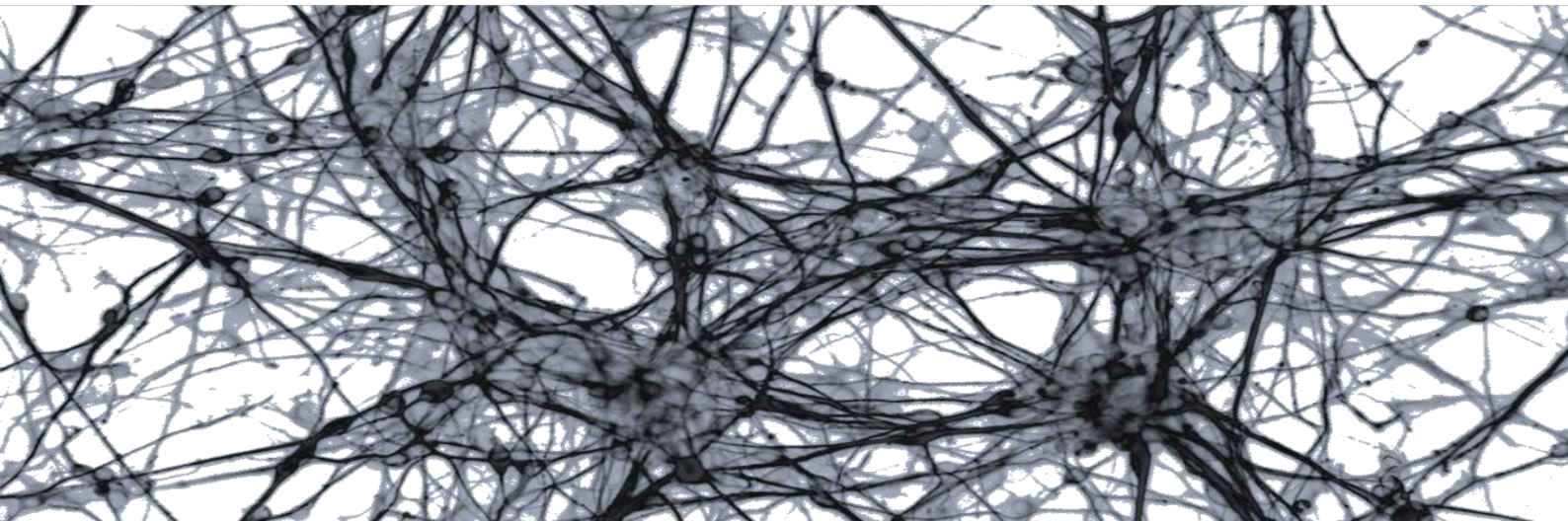
En conclusión, se describe por primera vez en este trabajo la combinación Panobinostat® + cloroquina como una posible terapia al tratamiento del glioblastoma, con altas tasas de muerte de células tumorales y buenos resultados en líneas celulares tumorales. El hecho de que la línea T98G muestre un porcentaje ligeramente menor de muerte celular indica que son necesarios nuevos estudios, probablemente de la vía de PTEN, que está deleccionado en estas células, para determinar la causa y, de esta manera, conseguir terapias personalizadas adaptadas a cada subtipo tumoral.

CONCLUSIONES



1. El estudio de polimorfismos de genes implicados en autofagia ha mostrado que la presencia del alelo G del polimorfismo *ATG2B* rs3759601 confiere protección frente al desarrollo de glioblastoma multiforme, mientras que ser portador del alelo T en los polimorfismos *ATG10* rs1864183 y *NOD2* rs2066844 aumenta el riesgo a padecer este tumor. Estos resultados ponen de manifiesto que variaciones en genes de la autofagia podrían desempeñar un papel en la susceptibilidad a desarrollar glioblastoma multiforme.
2. Nuestros resultados muestran una asociación entre la expresión de las proteínas LC3B-I, LC3B-II y p62 y el estadio tumoral en tumores astrocíticos, sugiriendo que la reducción de la actividad autofágica podría estar relacionada con la progresión de los astrocitomas. Además, la ausencia de expresión de LC3B-II o p62 se asocia con supervivencias más largas en pacientes con glioblastoma, por lo que estas proteínas podrían ser usadas como biomarcadores pronóstico en pacientes con este tumor.
3. El estudio preliminar de la expresión de las proteínas PKCz, mTOR, TRAF6, Beclin y PI3KCA muestra que variaciones en las mismas se asocian con diferentes parámetros clínicos. Consideramos que se deben realizar estudios de estas proteínas en series más grandes de pacientes para confirmar su posible utilización como biomarcadores en esta enfermedad
4. Los estudios de fármacos en líneas celulares derivadas de glioblastoma realizados en este trabajo confirman que Paclitaxel y Cloroquina tienen una actividad inhibidora del crecimiento tumoral y que los tratamientos con Panobinostat® y Metformina provocan disminución de la proliferación celular y generan muerte celular moderada en algunas líneas de glioblastoma, observando alteraciones en la autofagia en todos los casos, por lo que estos fármacos podrían emplearse en combinación con las terapias habituales para modificar los mecanismos de autofagia.
5. En nuestro trabajo hemos estudiado por primera vez en glioblastoma multiforme la combinación Panobinostat® y cloroquina, observando una disminución de la viabilidad celular y elevadas tasas de muerte celular. El hecho de que estos fármacos estén aprobados por la FDA o la Agencia Europea del Medicamento facilitaría un posible ensayo clínico para probar esta combinación en humanos.
6. Nuestros resultados muestran que las características moleculares de cada tumor son determinantes en la respuesta al tratamiento, lo que pone de relieve la importancia del conocimiento individualizado de cada tumor para poder desarrollar medicina de precisión.

BIBLIOGRAFÍA



1. Zhu, Y. & Parada, L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 616–626 (2002).
2. Wen, P. Y. & Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* **359**, 492–507 (2008).
3. Kettenmann, H. & Verkhratsky, A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* **31**, 653–659 (2008).
4. Martin-Villalba, A., Okuducu, A. F. & von Deimling, A. The evolution of our understanding on glioma. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **18**, 455–463 (2008).
5. Sehgal, A. Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin. Surg. Oncol.* **14**, 3–12 (1998).
6. Stiles, C. D. & Rowitch, D. H. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* **58**, 832–846 (2008).
7. Vescovi, A. L., Galli, R. & Reynolds, B. A. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 425–436 (2006).
8. *Las Cifras del Cáncer en España 2016*. (SEOM, 2016).
9. Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E. & Ferlay, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* **132**, 1133–1145 (2013).
10. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *Globocan 2012 v1.0: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. (International Agency for Research on Cancer, 2013).
11. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–386 (2015).
12. Bondy, M. L. *et al.* Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* **113**, 1953–1968 (2008).
13. Ohgaki, H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **472**, 323–342 (2009).
14. Preston-Martin, S., Mack, W. & Henderson, B. E. Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County. *Cancer Res.* **49**, 6137–6143 (1989).
15. Surawicz, T. S. *et al.* Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990–1994. *Neuro-Oncol.* **1**, 14–25 (1999).
16. Benson, V. S., Pirie, K., Green, J., Casabonne, D. & Beral, V. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. *Br. J. Cancer* **99**, 185–190 (2008).
17. Kabat, G. C., Etgen, A. M. & Rohan, T. E. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 2421–2427 (2010).
18. Wang, J. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 389–400 (2012).
19. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **109**, 93–108 (2005).
20. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case–control study. Available at: <http://ije.oxfordjournals.org/content/39/3/675>. (Accessed: 4th April 2016)
21. Spinelli, V. *et al.* Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. *Presse Médicale Paris Fr.* **1983** **39**, e35–44 (2010).
22. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncol.* **4**, 278–299 (2002).
23. Kyrtisis, A. P., Bondy, M. L., Rao, J. S. & Sioka, C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro-Oncol.* **12**, 104–113 (2010).
24. Farrell, C. J. & Plotkin, S. R. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol. Clin.* **25**, 925–946, viii (2007).
25. Padmalatha, C., Harruff, R. C., Ganick, D. & Hafez, G. B. Glioblastoma multiforme with tuberous sclerosis. Report of a case. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **104**, 649–650 (1980).
26. Grips, E. *et al.* [Glioblastoma multiforme as a manifestation of Turcot syndrome]. *Nervenarzt* **73**, 177–182 (2002).
27. Jeong, T.-S. & Yee, G.-T. Glioblastoma in a Patient with Neurofibromatosis Type 1: A Case Report and Review of the Literature. *Brain Tumor Res. Treat.* **2**, 36–38 (2014).
28. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **114**, 97–109 (2007).
29. Walker, C., Baborie, A., Crooks, D., Wilkins, S. & Jenkinson, M. D. Biology, genetics and imaging of glial cell tumours. *Br. J. Radiol.* **84**, S90–S106 (2011).
30. Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E. & Kruchko, C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncol.* **14**, v1–v49 (2012).
31. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 479–489 (2005).

32. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* **100**, 2235–2241 (2009).
33. van den Bent, M. J. *et al.* Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* **366**, 985–990 (2005).
34. Rao, S. A. M. *et al.* A 16-Gene Signature Distinguishes Anaplastic Astrocytoma from Glioblastoma. *PLoS ONE* **9**, (2014).
35. Stupp, R., Reni, M., Gatta, G., Mazza, E. & Vecht, C. Anaplastic astrocytoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **63**, 72–80 (2007).
36. Wang, H. *et al.* The Challenges and the Promise of Molecular Targeted Therapy in Malignant Gliomas. *Neoplasia* **17**, 239–255 (2015).
37. Delgado-López, P. D. & Corrales-García, E. M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* (2016). doi:10.1007/s12094-016-1497-x
38. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10**, 459–466 (2009).
39. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**, 2683–2710 (2007).
40. Li, Q.-J., Cai, J.-Q. & Liu, C.-Y. Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma. *Chin. Med. J. (Engl.)* **129**, 464–471 (2016).
41. Glioblastoma multiforme – an overview. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4248049/>. (Accessed: 5th April 2016)
42. Karcher, S. *et al.* Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *Int. J. Cancer* **118**, 2182–2189 (2006).
43. Kleihues, P. & Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol.* **1**, 44–51 (1999).
44. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* **17**, iv1-iv62 (2015).
45. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol.* **15 Suppl 2**, ii1-56 (2013).
46. Thakkar, J. P. *et al.* Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **23**, 1985–1996 (2014).
47. Scott, J. G. *et al.* Recursive partitioning analysis of prognostic factors for glioblastoma patients aged 70 years or older. *Cancer* **118**, 5595–5600 (2012).
48. Nanegrungsunk, D., Onchan, W., Chattipakorn, N. & Chattipakorn, S. C. Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas. *Neurol. Res.* **37**, 167–183 (2015).
49. Pourgholi, F., Hajivalili, M., Farhad, J.-N., Kafil, H. S. & Yousefi, M. Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* **77**, 98–107 (2016).
50. Zhang, J., Stevens, M. F. G. & Bradshaw, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 102–114 (2012).
51. Ramirez, Y. P., Weatherbee, J. L., Wheelhouse, R. T. & Ross, A. H. Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals* **6**, 1475–1506 (2013).
52. Lau, D., Magill, S. T. & Aghi, M. K. Molecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: current and future targets. *Neurosurg. Focus* **37**, E15 (2014).
53. Tanaka, S., Louis, D. N., Curry, W. T., Batchelor, T. T. & Dietrich, J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 14–26 (2013).
54. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**, 494–503 (2006).
55. Kanu, O. O. *et al.* Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin. Med. Oncol.* **3**, 39–52 (2009).
56. Siegal, T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **22**, 437–444 (2015).
57. Li, X. *et al.* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7961
58. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170**, 1445–1453 (2007).
59. Huang, H. S. *et al.* The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* **272**, 2927–2935 (1997).
60. Tohma, Y. *et al.* PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 684–689 (1998).
61. Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. & von Deimling, A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129**, 829–848 (2015).

62. Biernat, W., Kleihues, P., Yonekawa, Y. & Ohgaki, H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 180–185 (1997).
63. Nakamura, M. *et al.* p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **11**, 159–168 (2001).
64. Cohen, A., Holmen, S. & Colman, H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **13**, 345 (2013).
65. Huse, J. T. & Holland, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 319–331 (2010).
66. Labussière, M. *et al.* TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br. J. Cancer* **111**, 2024–2032 (2014).
67. Nonoguchi, N. *et al.* TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **126**, 931–937 (2013).
68. Mosrati, M. A. *et al.* TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* **6**, 16663–16673 (2015).
69. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).
70. Esteller, M. *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1350–1354 (2000).
71. Brigliadori, G. *et al.* Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *J. Neurooncol.* (2016). doi:10.1007/s11060-016-2116-y
72. Nakada, M. *et al.* Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers* **3**, 3242–3278 (2011).
73. Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. & von Deimling, A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129**, 829–848 (2015).
74. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
75. Pyo, J. O., Nah, J. & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* **44**, 73–80 (2012).
76. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* **221**, 3–12 (2010).
77. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
78. Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* **12**, 1542–1552 (2005).
79. Yang, Z. & Klionsky, D. J. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **335**, 1–32 (2009).
80. Mathew, R. *et al.* Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* **21**, 1367–1381 (2007).
81. Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 741–752 (2007).
82. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 132–139 (2010).
83. Jung, C. H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1992–2003 (2009).
84. Chan, E. Y. W., Longatti, A., McKnight, N. C. & Tooze, S. A. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell Biol.* **29**, 157–171 (2009).
85. Bento, C. F. *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* (2016). doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556
86. Jhanwar-Uniyal, M. *et al.* Deconstructing mTOR complexes in regulation of Glioblastoma Multiforme and its stem cells. *Adv. Biol. Regul.* **53**, 202–210 (2013).
87. Jhanwar-Uniyal, M. *et al.* Distinct signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2 in glioblastoma multiforme: a tale of two complexes. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 64–74 (2015).
88. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–170 (2011).
89. Lai, K., Killingsworth, M. C. & Lee, C. S. Gene of the month: PIK3CA. *J. Clin. Pathol.* **68**, 253–257 (2015).
90. Vicencio, J. M. *et al.* The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ.* **16**, 1006–1017 (2009).
91. He, C. & Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 140–149 (2010).
92. Decuyper, J.-P., Parys, J. B. & Bultynck, G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells* **1**, 284–312 (2012).
93. Proikas-Cezanne, T. & Codogno, P. Beclin 1 or not Beclin 1... *Autophagy* **7**, 671–672 (2011).
94. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398 (1998).

95. Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* **27**, 421–429 (2002).
96. Obara, K., Sekito, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* **283**, 23972–23980 (2008).
97. Velikkakath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. & Mizushima, N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896–909 (2012).
98. Liu, J. & Debnath, J. The Evolving, Multifaceted Roles of Autophagy in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **130**, 1–53 (2016).
99. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445–452 (2009).
100. Tanaka, Y. *et al.* Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902–906 (2000).
101. Jäger, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **117**, 4837–4848 (2004).
102. Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. & Gao, F.-B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. CB* **17**, 1561–1567 (2007).
103. Diao, J. *et al.* ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* **520**, 563–566 (2015).
104. Ktistakis, N. T. & Tooze, S. A. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol.* **0**, (2016).
105. Jahreiss, L., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic Cph. Den.* **9**, 574–587 (2008).
106. Köchl, R., Hu, X. W., Chan, E. Y. W. & Tooze, S. A. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic Cph. Den.* **7**, 129–145 (2006).
107. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. & Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84–91 (2005).
108. Juhasz, G. & Neufeld, T. P. Autophagy: A Forty-Year Search for a Missing Membrane Source. *PLoS Biol.* **4**, (2006).
109. Tooze, S. A. & Yoshimori, T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* **12**, 831–835 (2010).
110. Okamoto, K. Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.* **205**, 435–445 (2014).
111. Mancias, J. D. & Kimmelman, A. C. Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J. Mol. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.jmb.2016.02.027
112. Kabeya, Y. *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* **117**, 2805–2812 (2004).
113. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
114. Zaffagnini, G. & Martens, S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004
115. Khaminets, A., Behl, C. & Dikic, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* **26**, 6–16 (2016).
116. Katsuragi, Y., Ichimura, Y. & Komatsu, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* **282**, 4672–4678 (2015).
117. Johansen, T. & Lamark, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279–296 (2011).
118. Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229 (2012).
119. Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. & Dikic, I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* **34**, 259–269 (2009).
120. Cheng, Y., Ren, X., Hait, W. N. & Yang, J.-M. Therapeutic Targeting of Autophagy in Disease: Biology and Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **65**, 1162–1197 (2013).
121. Kimmelman, A. C. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev.* **25**, 1999–2010 (2011).
122. Qu, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112**, 1809–1820 (2003).
123. Liu, E. Y. & Ryan, K. M. Autophagy and cancer—issues we need to digest. *J. Cell Sci.* **125**, 2349–2358 (2012).
124. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* **137**, 1001–1004 (2009).
125. Jin, S. Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy* **2**, 80–84 (2006).
126. Degenhardt, K. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51–64 (2006).
127. White, E. The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* **125**, 42–46 (2015).

128. Kim, M.-J. *et al.* Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J. Biol. Chem.* **286**, 12924–12932 (2011).
129. Sui, X. *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* **4**, e838 (2013).
130. Nagelkerke, A., Sweep, F. C. G. J., Geurts-Moespot, A., Bussink, J. & Span, P. N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: molecular pathways controlling autophagy. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 89–98 (2015).
131. Nagelkerke, A., Bussink, J., Geurts-Moespot, A., Sweep, F. C. G. J. & Span, P. N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: pharmacological modulation of treatment-induced autophagy. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 99–105 (2015).
132. Wang, X. *et al.* Enhancing Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)–Targeted Cancer Therapy by Preventing mTOR/Raptor Inhibition-Initiated, mTOR/Rictor-Independent Akt Activation. *Cancer Res.* **68**, 7409–7418 (2008).
133. Yang, Y. *et al.* Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 625–635 (2013).
134. Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, W. L. & Liu, L. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol.* **11**, 89 (2010).
135. Settembre, C. *et al.* A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* **31**, 1095–1108 (2012).
136. Amaravadi, R. K. *et al.* Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 654–666 (2011).
137. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
138. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
139. Degasperis, A. *et al.* Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLoS One* **9**, e87293 (2014).
140. Liu, J.-L. *et al.* Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **111**, 944–954 (2014).
141. Velikkakath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. & Mizushima, N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896–909 (2012).
142. Plantinga, T. S. *et al.* Role of genetic variants of autophagy genes in susceptibility for non-medullary thyroid cancer and patients outcome. *PLoS One* **9**, e94086 (2014).
143. Bhattacharya, A. & Eissa, N. T. Autophagy and autoimmunity crosstalks. *Front. Immunol.* **4**, 88 (2013).
144. Usategui-Martín, R. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes are associated with paget disease of bone. *PLoS One* **10**, e0128984 (2015).
145. Songane, M. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis. *PLoS One* **7**, e41618 (2012).
146. Salem, M., Nielsen, O. H., Nys, K., Yazdanyar, S. & Seidelin, J. B. Impact of T300A Variant of ATG16L1 on Antibacterial Response, Risk of Culture Positive Infections, and Clinical Course of Crohn’s Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **6**, e122 (2015).
147. Murthy, A. *et al.* A Crohn’s disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* **506**, 456–462 (2014).
148. Burada, F. *et al.* ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility. *Pathol. Oncol. Res. POR* **22**, 317–322 (2016).
149. Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J. B. & Nielsen, O. H. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy* **11**, 585–594 (2015).
150. Grimm, W. A. *et al.* The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon. *Gut* **65**, 456–464 (2016).
151. Branquinho, D., Freire, P. & Sofia, C. NOD2 mutations and colorectal cancer - Where do we stand? *World J. Gastrointest. Surg.* **8**, 284–293 (2016).
152. Travassos, L. H. *et al.* Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* **11**, 55–62 (2010).
153. Tolentino, Y. F. M. *et al.* Common NOD2/CARD15 and TLR4 Polymorphisms Are Associated with Crohn’s Disease Phenotypes in Southeastern Brazilians. *Dig. Dis. Sci.* (2016). doi:10.1007/s10620-016-4172-8
154. Parkhouse, R. & Monie, T. P. Dysfunctional Crohn’s Disease-Associated NOD2 Polymorphisms Cannot be Reliably Predicted on the Basis of RIPK2 Binding or Membrane Association. *Front. Immunol.* **6**, 521 (2015).
155. Freire, P. *et al.* Card15 mutations and gastric cancer in a Portuguese population. *Scand. J. Gastroenterol.* **48**, 1188–1197 (2013).
156. Kharwar, N. K., Prasad, K. N., Paliwal, V. K. & Modi, D. R. Association of NOD1 and NOD2 polymorphisms with Guillain-Barré syndrome in Northern Indian population. *J. Neurol. Sci.* **363**, 57–62 (2016).

157. Giatromanolaki, A. *et al.* Autophagy and lysosomal related protein expression patterns in human glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 1468–1478 (2014).
158. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–5728 (2000).
159. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
160. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. & Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84–91 (2005).
161. Giatromanolaki, A. *et al.* Autophagy and lysosomal related protein expression patterns in human glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 1468–1478 (2014).
162. Huang, X., Bai, H.-M., Chen, L., Li, B. & Lu, Y.-C. Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **17**, 1515–1519 (2010).
163. Hao, C.-L. *et al.* High level of microtubule-associated protein light chain 3 predicts poor prognosis in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 4213–4221 (2014).
164. Lee, Y. J. *et al.* The autophagy-related marker LC3 can predict prognosis in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **8**, e81540 (2013).
165. Wu, W.-Y., Kim, H., Zhang, C.-L., Meng, X.-L. & Wu, Z.-S. Clinical significance of autophagic protein LC3 levels and its correlation with XIAP expression in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 108 (2014).
166. Masuda, G. O. *et al.* Clinicopathological Correlations of Autophagy-related Proteins LC3, Beclin 1 and p62 in Gastric Cancer. *Anticancer Res.* **36**, 129–136 (2016).
167. Tang, J.-Y. *et al.* High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **44**, 2558–2562 (2013).
168. Yoshihara, N., Takagi, A., Ueno, T. & Ikeda, S. Inverse correlation between microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 and p62/sequestosome-1 expression in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Dermatol.* **41**, 311–315 (2014).
169. Wu, S. *et al.* Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 3882–3891 (2015).
170. Li, X., Lin, X. & Ma, H. Overexpression of LC3 in Papillary Thyroid Carcinomas and Lymph Node Metastases. *Acta Chir. Belg.* **115**, 356–363 (2015).
171. Zhang, N. *et al.* Study of autophagy-related protein light chain 3 (LC3)-II expression levels in thyroid diseases. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* **69**, 306–310 (2015).
172. Chang, S.-J. *et al.* Decreased expression of autophagy protein LC3 and stemness (CD44+/CD24-/low) indicate poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Hum. Pathol.* **48**, 48–55 (2016).
173. Jung, G. *et al.* Autophagic Markers BECLIN 1 and LC3 are Associated with Prognosis of Multiple Myeloma. *Acta Haematol.* **134**, 17–24 (2015).
174. Valente, G. *et al.* Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *BioMed Res. Int.* **2014**, 462658 (2014).
175. Zhu, W., Pan, X., Li, F., Zhang, Y. & Lu, X. Expression of Beclin 1 and LC3 in FIGO stage I-II cervical squamous cell carcinoma and relationship to survival. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **33**, 1653–1659 (2012).
176. Deng, Q. *et al.* Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **43**, 1261–1268 (2013).
177. Puissant, A., Fenouille, N. & Auberger, P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am. J. Cancer Res.* **2**, 397–413 (2012).
178. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell* **147**, 724–727 (2011).
179. Katsuragi, Y., Ichimura, Y. & Komatsu, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* **282**, 4672–4678 (2015).
180. Komatsu, M. & Ichimura, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1374–1378 (2010).
181. Sahani, M. H., Itakura, E. & Mizushima, N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* **10**, 431–441 (2014).
182. Choi, J., Jung, W. & Koo, J. S. Expression of autophagy-related markers beclin-1, light chain 3A, light chain 3B and p62 according to the molecular subtype of breast cancer. *Histopathology* **62**, 275–286 (2013).
183. Wang, X., Du, Z., Li, L., Shi, M. & Yu, Y. Beclin 1 and p62 expression in non-small cell lung cancer: relation with malignant behaviors and clinical outcome. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 10644–10652 (2015).
184. Sorbye, S. W. *et al.* Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One* **7**, e47068 (2012).

185. Zhao, M. *et al.* Impact of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and p62/sequestosome expression on prognosis of patients with gliomas. *Hum. Pathol.* **46**, 843–849 (2015).
186. Liu, J.-L. *et al.* Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **111**, 944–954 (2014).
187. Cha, Y. J., Kim, Y. H., Cho, N. H. & Koo, J. S. Expression of autophagy related proteins in invasive lobular carcinoma: comparison to invasive ductal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 3389–3398 (2014).
188. Ladoire, S., Enot, D., Andre, F., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death-related biomarkers: Impact on the survival of breast cancer patients after adjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* **5**, e1082706 (2016).
189. Luo, R.-Z. *et al.* Accumulation of p62 is associated with poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *OncoTargets Ther.* **6**, 883–888 (2013).
190. Iwadata, R. *et al.* High Expression of p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis and Aggressive Phenotypes in Endometrial Cancer. *Am. J. Pathol.* **185**, 2523–2533 (2015).
191. Iwadata, R. *et al.* High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Histochem. Cytochem.* **47**, 295–301 (2014).
192. Mohamed, A. *et al.* P62/Ubiquitin IHC Expression Correlated with Clinicopathologic Parameters and Outcome in Gastrointestinal Carcinomas. *Front. Oncol.* **5**, 70 (2015).
193. Inoue, J., Gohda, J. & Akiyama, T. Characteristics and biological functions of TRAF6. *Adv. Exp. Med. Biol.* **597**, 72–79 (2007).
194. Linares, J. F. *et al.* K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. *Mol. Cell* **51**, 283–296 (2013).
195. Liu, J. *et al.* miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas. *Oncotarget* **6**, 29129–29142 (2015).
196. Zhang, X.-L. *et al.* Expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in lung cancer tissues. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **15**, 10591–10596 (2014).
197. Han, F., Zhang, L., Qiu, W. & Yi, X. TRAF6 promotes the invasion and metastasis and predicts a poor prognosis in gastric cancer. *Pathol. Res. Pract.* **212**, 31–37 (2016).
198. Zhang, T., Wang, H. & Han, L. Expression and Clinical Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 in Patients With Colon Cancer. *Iran. Red Crescent Med. J.* **18**, e23931 (2016).
199. Rong, Y. *et al.* TRAF6 is over-expressed in pancreatic cancer and promotes the tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 260 (2014).
200. Sun, H. *et al.* TRAF6 is upregulated in colon cancer and promotes proliferation of colon cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53**, 195–201 (2014).
201. Bilir, C. *et al.* Increased serum tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 expression in patients with non-metastatic triple-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* **9**, 2819–2824 (2015).
202. Mellor, H. & Parker, P. J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332** (Pt 2), 281–292 (1998).
203. Martin, P. *et al.* Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *EMBO J.* **21**, 4049–4057 (2002).
204. Tobias, I. S. & Newton, A. C. Protein scaffolds control localized protein kinase C ζ Activity. *J. Biol. Chem.* (2016). doi:10.1074/jbc.M116.729483
205. Chamoux, E., McManus, S., Laberge, G., Bisson, M. & Roux, S. Involvement of kinase PKC-zeta in the p62/p62(P392L)-driven activation of NF- κ B in human osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 475–484 (2013).
206. Evans, J. D., Cornford, P. A., Dodson, A., Neoptolemos, J. P. & Foster, C. S. Expression patterns of protein kinase C isoenzymes are characteristically modulated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **119**, 392–402 (2003).
207. Bamberger, A. M., Bamberger, C. M., Wald, M., Kratzmeier, M. & Schulte, H. M. Protein kinase C (PKC) isoenzyme expression pattern as an indicator of proliferative activity in uterine tumor cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **123**, 81–88 (1996).
208. Donson, A. M., Banerjee, A., Gamboni-Robertson, F., Fleitz, J. M. & Foreman, N. K. Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines. *J. Neurooncol.* **47**, 109–115 (2000).
209. Seto, K. K. Y. & Andrulis, I. L. Atypical protein kinase C zeta: potential player in cell survival and cell migration of ovarian cancer. *PLoS One* **10**, e0123528 (2015).
210. Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 21–35 (2011).
211. Hay, N. & Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18**, 1926–1945 (2004).
212. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
213. Dibble, C. C. & Manning, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* **15**, 555–564 (2013).

214. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1287–1295 (2010).
215. Ballou, L. M. & Lin, R. Z. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J. Chem. Biol.* **1**, 27–36 (2008).
216. Wang, L.-F. *et al.* [Expression of Rictor and mTOR in colorectal cancer and their clinical significance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **36**, 396–400 (2016).
217. Jhaveri, K. *et al.* Hyperactivated mTOR and JAK2/STAT3 Pathways: Molecular Drivers and Potential Therapeutic Targets of Inflammatory and Invasive Ductal Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin. Breast Cancer* **16**, 113–122.e1 (2016).
218. Sahin, F. *et al.* mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 8421–8425 (2004).
219. Feng, W., Duan, X., Liu, J., Xiao, J. & Brown, R. E. Morphoproteomic evidence of constitutively activated and overexpressed mTOR pathway in cervical squamous carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesions. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2**, 249–260 (2009).
220. Bajwa, P. *et al.* Age related increase in mTOR activity contributes to the pathological changes in ovarian surface epithelium. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8468
221. Costa, C. *et al.* Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PloS One* **10**, e0141253 (2015).
222. Toro, A. L., Costantino, N. S., Shriver, C. D., Ellsworth, D. L. & Ellsworth, R. E. Effect of obesity on molecular characteristics of invasive breast tumors: gene expression analysis in a large cohort of female patients. *BMC Obes.* **3**, 22 (2016).
223. Ding, L. *et al.* mTOR: An attractive therapeutic target for osteosarcoma? *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.9305
224. Marques, A. E. M. *et al.* mTOR pathway protein immunoexpression as a prognostic factor for survival in head and neck cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **45**, 319–328 (2016).
225. Kremer, C. L. *et al.* Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *The Prostate* **66**, 1203–1212 (2006).
226. Stelloo, S. *et al.* mTOR pathway activation is a favorable prognostic factor in human prostate adenocarcinoma. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8767
227. García-Carracedo, D. *et al.* Impact of PI3K/AKT/mTOR pathway activation on the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8957
228. Choi, C. H. *et al.* Clinical significance of pmTOR expression in endometrioid endometrial carcinoma. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **153**, 207–210 (2010).
229. No, J. H. *et al.* Expression of mTOR protein and its clinical significance in endometrial cancer. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **15**, BR301-305 (2009).
230. Cao, Y. & Klionsky, D. J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res.* **17**, 839–849 (2007).
231. Zeng, X., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J. Cell Sci.* **119**, 259–270 (2006).
232. Shuhua, W. *et al.* Autophagy-related genes Raptor, Rictor, and Beclin1 expression and relationship with multidrug resistance in colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* **46**, 1752–1759 (2015).
233. Han, Y. *et al.* Prognostic significance of Beclin-1 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **15**, 4583–4587 (2014).
234. Wan, S.-Y. *et al.* [Expression of autophagy related gene Beclin1 in myelodysplastic syndrome patients and its significance]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui J. Exp. Hematol. Chin. Assoc. Pathophysiol.* **21**, 936–939 (2013).
235. Jiang, L. *et al.* Reduced expression of liver kinase B1 and Beclin1 is associated with the poor survival of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **32**, 1931–1938 (2014).
236. Deng, Q. *et al.* Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **43**, 1261–1268 (2013).
237. Wang, Y. *et al.* Decrease of autophagy activity promotes malignant progression of tongue squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **42**, 557–564 (2013).
238. Liang, X. H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672–676 (1999).
239. Yao, Q. *et al.* The significance of expression of autophagy-related gene Beclin, Bcl-2, and Bax in breast cancer tissues. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **32**, 1163–1171 (2011).
240. He, Y. *et al.* The prognostic value of autophagy-related markers beclin-1 and microtubule-associated protein light chain 3B in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 7317–7326 (2014).
241. Lin, H.-X. *et al.* Decreased Expression of Beclin 1 Correlates Closely with Bcl-xL Expression and Poor Prognosis of Ovarian Carcinoma. *PLOS ONE* **8**, e60516 (2013).

242. Wang, J. *et al.* Aberrant Expression of Beclin-1 and LC3 Correlates with Poor Prognosis of Human Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* **8**, e69038 (2013).
243. Ding, Z.-B. *et al.* Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **68**, 9167–9175 (2008).
244. Cheng, H. Y. *et al.* Expression of beclin 1, an autophagy-related protein, in human cervical carcinoma and its clinical significance. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **33**, 15–20 (2012).
245. Liu, B., Miyake, H., Nishikawa, M., Tei, H. & Fujisawa, M. Expression Profile of Autophagy-related Markers in Localized Prostate Cancer: Correlation With Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *Urology* **85**, 1424–1430 (2015).
246. Miracco, C. *et al.* Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int. J. Oncol.* **30**, 429–436 (2007).
247. Pirtoli, L. *et al.* The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* **5**, 930–936 (2009).
248. Tini, P. *et al.* Combined epidermal growth factor receptor and Beclin1 autophagic protein expression analysis identifies different clinical presentations, responses to chemo- and radiotherapy, and prognosis in glioblastoma. *BioMed Res. Int.* **2015**, 208076 (2015).
249. Kaza, N., Kohli, L. & Roth, K. A. Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **22**, 89–98 (2012).
250. Yuan, T. L. & Cantley, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497–5510 (2008).
251. Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. & Vogt, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 921–929 (2005).
252. Kita, D., Yonekawa, Y., Weller, M. & Ohgaki, H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **113**, 295–302 (2007).
253. Zhang, M., Liu, Y., Gao, Y. & Li, S. Silibinin-induced glioma cell apoptosis by PI3K-mediated but Akt-independent downregulation of FoxM1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 346–354 (2015).
254. Yip, W. K., He, P. Y., Abdullah, M. A., Yusoff, S. & Seow, H. F. Increased Expression of Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 α and Gene Amplification of PIK3CA in Nasopharyngeal Carcinoma. *Pathol. Oncol. Res. POR* **22**, 413–419 (2016).
255. Liang, M. *et al.* Downregulation of miR203 induces overexpression of PIK3CA and predicts poor prognosis of gastric cancer patients. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3607–3616 (2015).
256. Liu, J.-F. *et al.* Up-regulation of PIK3CA promotes metastasis in gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4986–4991 (2010).
257. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 230–236 (2012).
258. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* **1**, 399–403 (2000).
259. Sun, W. & Yang, J. Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF- κ B activation. *Cell. Signal.* **22**, 1799–1803 (2010).
260. Paul, P. K. *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1248–1259 (2012).
261. Nakamura, K., Kimple, A. J., Siderovski, D. P. & Johnson, G. L. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 2077–2089 (2010).
262. Shi, C.-S. & Kehrl, J. H. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci. Signal.* **3**, ra42 (2010).
263. Wild, P., McEwan, D. G. & Dikic, I. The LC3 interactome at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 3–9 (2014).
264. Atala, A. Re: Autophagy Defects Suggested by Low Levels of Autophagy Activator MAP1S and High Levels of Autophagy Inhibitor LRPPRC Predict Poor Prognosis of Prostate Cancer Patients. *J. Urol.* **195**, 1948–1949 (2016).
265. Hiraga, S. *et al.* Telomerase activity and alterations in telomere length in human brain tumors. *Cancer Res.* **58**, 2117–2125 (1998).
266. Lötsch, D. *et al.* Prognostic significance of telomerase-associated parameters in glioblastoma: effect of patient age. *Neuro-Oncol.* **15**, 423–432 (2013).
267. Park, C.-K. *et al.* Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. *Oncotarget* **5**, 3399–3407 (2014).
268. Mosrati, M. A. *et al.* TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* **6**, 16663–16673 (2015).
269. Harada, K. *et al.* Telomerase activity in primary and secondary glioblastomas multiforme as a novel molecular tumor marker. *J. Neurosurg.* **93**, 618–625 (2000).
270. Labussière, M. *et al.* TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br. J. Cancer* **111**, 2024–2032 (2014).

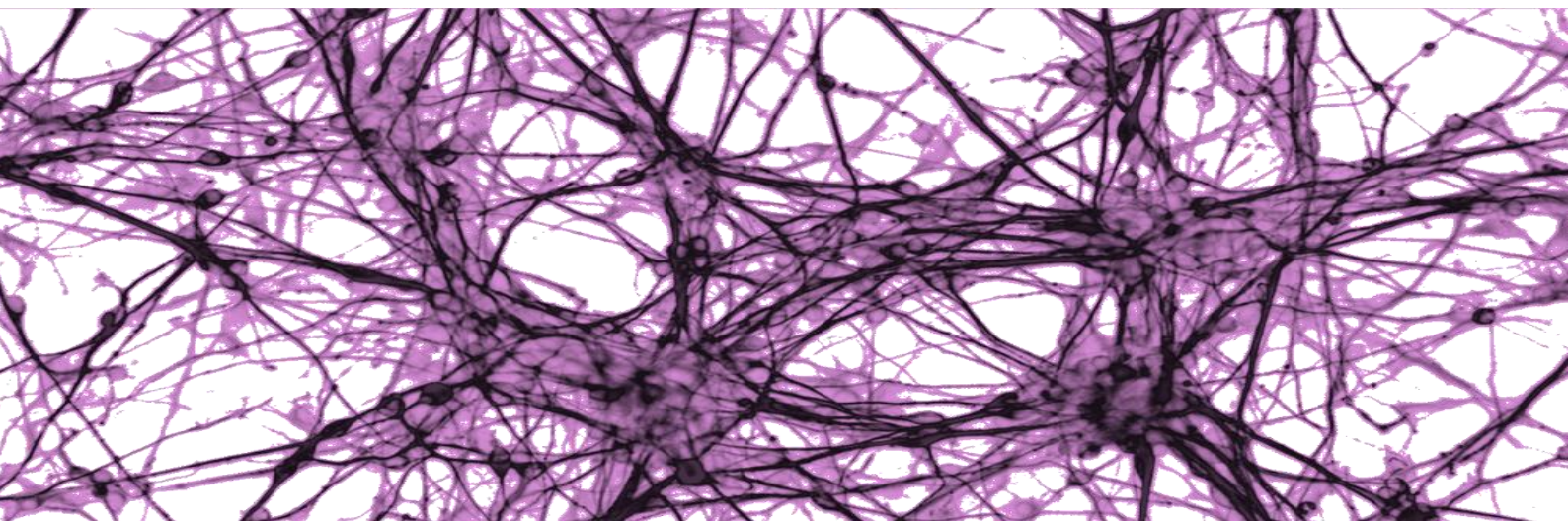
271. Heidenreich, B. *et al.* TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences. *Oncotarget* **6**, 10617–10633 (2015).
272. Kampan, N. C., Madondo, M. T., McNally, O. M., Quinn, M. & Plebanski, M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Res. Int.* **2015**, 413076 (2015).
273. Khanna, C., Rosenberg, M. & Vail, D. M. A Review of Paclitaxel and Novel Formulations Including Those Suitable for Use in Dogs. *J. Vet. Intern. Med. Am. Coll. Vet. Intern. Med.* **29**, 1006–1012 (2015).
274. Barbuti, A. M. & Chen, Z.-S. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. *Cancers* **7**, 2360–2371 (2015).
275. McGuire, W. P. *et al.* Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann. Intern. Med.* **111**, 273–279 (1989).
276. Holmes, F. A. *et al.* Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 1797–1805 (1991).
277. Hirabayashi, M. *et al.* Phase II study of carboplatin and weekly paclitaxel combination chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a Kansai Clinical Oncology Group study. *Lung Cancer Amst. Neth.* **44**, 355–362 (2004).
278. Ettinger, D. S., Finkelstein, D. M., Sarma, R. P. & Johnson, D. H. Phase II study of paclitaxel in patients with extensive-disease small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **13**, 1430–1435 (1995).
279. Roth, B. J. *et al.* Taxol in advanced, hormone-refractory carcinoma of the prostate. A phase II trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* **72**, 2457–2460 (1993).
280. Smith, D. C., Esper, P., Strawderman, M., Redman, B. & Pienta, K. J. Phase II trial of oral estramustine, oral etoposide, and intravenous paclitaxel in hormone-refractory prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**, 1664–1671 (1999).
281. Forastiere, A. A., Neuberg, D., Taylor, S. G., DeConti, R. & Adams, G. Phase II evaluation of Taxol in advanced head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology group trial. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 181–184 (1993).
282. Rowinsky, E. K. *et al.* Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Res.* **49**, 4640–4647 (1989).
283. Ajani, J. A. *et al.* Phase II study of Taxol in patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer J. Sci. Am.* **4**, 269–274 (1998).
284. Gadgeel, S. M. *et al.* Phase II study of paclitaxel and carboplatin in patients with advanced gastric cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **26**, 37–41 (2003).
285. Wen, G. *et al.* Recent advances in design, synthesis and bioactivity of paclitaxel-mimics. *Fitoterapia* **110**, 26–37 (2016).
286. Kundranda, M. N. & Niu, J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3767–3777 (2015).
287. Xu, Y. *et al.* The synergic antitumor effects of paclitaxel and temozolomide co-loaded in mPEG-PLGA nanoparticles on glioblastoma cells. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7896
288. Xu, Y., Shen, M., Sun, Y., Gao, P. & Duan, Y. Polymer Nanocomposites Based Thermo-Sensitive Gel for Paclitaxel and Temozolomide Co-Delivery to Glioblastoma Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 9777–9787 (2015).
289. Mu, Q. *et al.* Stable and efficient Paclitaxel nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1236–1245 (2015).
290. Elinzano, H. *et al.* PPX and Concurrent Radiation for Newly Diagnosed Glioblastoma Without MGMT Methylation: A Randomized Phase II Study: BrUOG 244. *Am. J. Clin. Oncol.* (2015). doi:10.1097/COC.0000000000000247
291. Florian, S. & Mitchison, T. J. Anti-Microtubule Drugs. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1413**, 403–421 (2016).
292. Maushagen, R. *et al.* Effects of paclitaxel on permanent head and neck squamous cell carcinoma cell lines and identification of anti-apoptotic caspase 9b. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 1261–1271 (2016).
293. Fisi, V., Kátai, E., Bogner, P., Miseta, A. & Nagy, T. Timed, sequential administration of paclitaxel improves its cytotoxic effectiveness in a cell culture model. *Cell Cycle Georget. Tex* **15**, 1227–1233 (2016).
294. Yuan, H., Sun, B., Gao, F. & Lan, M. Synergistic anticancer effects of andrographolide and paclitaxel against A549 NSCLC cells. *Pharm. Biol.* 1–7 (2016). doi:10.1080/13880209.2016.1176056
295. Chen, N.-C., Chyau, C.-C., Lee, Y.-J., Tseng, H.-C. & Chou, F.-P. Promotion of mitotic catastrophe via activation of PTEN by paclitaxel with supplement of mulberry water extract in bladder cancer cells. *Sci. Rep.* **6**, 20417 (2016).
296. Veldhoen, R. A. *et al.* The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis. *Oncogene* **32**, 736–746 (2013).
297. Zhang, Q. *et al.* Suppression of autophagy enhances preferential toxicity of paclitaxel to folliculin-deficient renal cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **32**, 99 (2013).
298. Liu, S. & Li, X. Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel. *Int. J. Oncol.* **46**, 2399–2408 (2015).

299. Wen, J. *et al.* Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Breast Cancer Res. Treat.* **149**, 619–629 (2015).
300. Chen, K. & Shi, W. Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2016). doi:10.1007/s13277-016-4929-x
301. Xu, L., Liu, J.-H., Zhang, J., Zhang, N. & Wang, Z.-H. Blockade of autophagy aggravates endoplasmic reticulum stress and improves Paclitaxel cytotoxicity in human cervical cancer cells. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **47**, 313–321 (2015).
302. Rebecca, V. W. *et al.* Inhibition of autophagy enhances the effects of the AKT inhibitor MK-2206 when combined with paclitaxel and carboplatin in BRAF wild-type melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 465–478 (2014).
303. Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I. & Sowers, J. R. Metformin: an update. *Ann. Intern. Med.* **137**, 25–33 (2002).
304. Leone, A., Di Gennaro, E., Bruzzese, F., Avallone, A. & Budillon, A. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer Treat. Res.* **159**, 355–376 (2014).
305. Kasznicki, J., Sliwinska, A. & Drzewoski, J. Metformin in cancer prevention and therapy. *Ann. Transl. Med.* **2**, (2014).
306. Kalender, A. *et al.* Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* **11**, 390–401 (2010).
307. Zhang, D. *et al.* Metformin Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury via Autophagy Flux Stimulation. *Mol. Neurobiol.* (2016). doi:10.1007/s12035-016-9895-1
308. Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **330**, 1304–1305 (2005).
309. Franciosi, M. *et al.* Metformin Therapy and Risk of Cancer in Patients with Type 2 Diabetes: Systematic Review. *PLoS ONE* **8**, (2013).
310. Pollak, M. N. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer Discov.* **2**, 778–790 (2012).
311. Pollak, M. Potential applications for biguanides in oncology. *J. Clin. Invest.* **123**, 3693–3700 (2013).
312. UCBEK, A., ÖZÜNAL, Z. G., UZUN, Ö. & GEPDİREMEN, A. Effect of metformin on the human T98G glioblastoma multiforme cell line. *Exp. Ther. Med.* **7**, 1285–1290 (2014).
313. Sesen, J. *et al.* Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One* **10**, e0123721 (2015).
314. Tomic, T. *et al.* Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* **2**, e199 (2011).
315. Ashinuma, H. *et al.* Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncol. Rep.* **28**, 8–14 (2012).
316. Kato, K. *et al.* The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 549–560 (2012).
317. Takahashi, A. *et al.* Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int.* **14**, 53 (2014).
318. Chalitchagorn, K. *et al.* Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* **23**, 8841–8846 (2004).
319. Christman, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483–5495 (2002).
320. Momparler, R. L. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* **42**, S9-16 (2005).
321. Stresemann, C. & Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* **123**, 8–13 (2008).
322. Nieto, M. *et al.* The European Medicines Agency Review of Decitabine (Dacogen) for the Treatment of Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *The Oncologist* (2016). doi:10.1634/theoncologist.2015-0298
323. Yao-Yu, H. *et al.* Systematic discovery of drug action mechanisms by an integrated chemical genomics approach: identification of functional disparities between azacytidine and decitabine. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8455
324. Suh, I. *et al.* Antineoplastic effects of decitabine, an inhibitor of DNA promoter methylation, in adrenocortical carcinoma cells. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **145**, 226–232 (2010).
325. Shang, D., Han, T., Xu, X. & Liu, Y. Decitabine induces G2/M cell cycle arrest by suppressing p38/NF-κB signaling in human renal clear cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 11140–11148 (2015).
326. Viet, C. T. *et al.* Decitabine rescues cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **9**, e112880 (2014).
327. Kim, H. J. *et al.* DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* **7**, 39 (2012).

328. Cui, Y., Naz, A., Thompson, D. H. & Irudayaraj, J. Decitabine nanoconjugate sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide. *Mol. Pharm.* **12**, 1279–1288 (2015).
329. Njaria, P. M., Okombo, J., Njuguna, N. M. & Chibale, K. Chloroquine-containing compounds: a patent review (2010 - 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 1003–1024 (2015).
330. Sotelo, J., Briceño, E. & López-González, M. A. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **144**, 337–343 (2006).
331. Duffy, A., Le, J., Sausville, E. & Emadi, A. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **75**, 439–447 (2015).
332. Takala-Harrison, S. & Laufer, M. K. Antimalarial drug resistance in Africa: key lessons for the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1342**, 62–67 (2015).
333. Al-Bari, M. A. A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 1608–1621 (2015).
334. Zhang, Y., Liao, Z., Zhang, L. & Xiao, H. The utility of chloroquine in cancer therapy. *Curr. Med. Res. Opin.* **31**, 1009–1013 (2015).
335. Pascolo, S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. *Eur. J. Pharmacol.* **771**, 139–144 (2016).
336. Liang, D. H. *et al.* The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair. *Cancer Lett.* **376**, 249–258 (2016).
337. Lin, J.-F. *et al.* Autophagy inhibition enhances RAD001-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 1501–1513 (2016).
338. Lakhter, A. J. *et al.* Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2247–2254 (2013).
339. Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S. & Miao, J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3218–3222 (2006).
340. Zheng, Y. *et al.* Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis. *Cancer Invest.* **27**, 286–292 (2009).
341. Li, C. *et al.* Impact of autophagy inhibition at different stages on cytotoxic effect of autophagy inducer in glioblastoma cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **35**, 1303–1316 (2015).
342. Hori, Y. S. *et al.* Chloroquine potentiates temozolomide cytotoxicity by inhibiting mitochondrial autophagy in glioma cells. *J. Neurooncol.* **122**, 11–20 (2015).
343. Yan, Y. *et al.* Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **35**, 23 (2016).
344. Roy, L.-O., Poirier, M.-B. & Fortin, D. Chloroquine inhibits the malignant phenotype of glioblastoma partially by suppressing TGF-beta. *Invest. New Drugs* **33**, 1020–1031 (2015).
345. Park, D. & Lee, Y. Biphasic activity of chloroquine in human colorectal cancer cells. *Dev. Reprod.* **18**, 225–231 (2014).
346. Jiang, P.-D. *et al.* Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* **64**, 609–614 (2010).
347. Hu, T. *et al.* Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **35**, 43–49 (2016).
348. Jiang, P. *et al.* Cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis induced by chloroquine in human breast cancer cell line Bcap-37. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **22**, 431–440 (2008).
349. Chen, M.-Y. *et al.* Decitabine and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibit growth of ovarian cancer cell lines and xenografts while inducing expression of imprinted tumor suppressor genes, apoptosis, G2/M arrest, and autophagy. *Cancer* **117**, 4424–4438 (2011).
350. Shang, D., Han, T., Xu, X. & Liu, Y. Decitabine induces G2/M cell cycle arrest by suppressing p38/NF-κB signaling in human renal clear cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 11140–11148 (2015).
351. West, A. C. & Johnstone, R. W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J. Clin. Invest.* **124**, 30–39 (2014).
352. Anne, M., Sammartino, D., Barginear, M. F. & Budman, D. Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *OncoTargets Ther.* **6**, 1613–1624 (2013).
353. Prince, H. M., Bishton, M. J. & Johnstone, R. W. Panobinostat (LBH589): a potent pan-deacetylase inhibitor with promising activity against hematologic and solid tumors. *Future Oncol. Lond. Engl.* **5**, 601–612 (2009).
354. Ma, N. *et al.* Selective Histone Deacetylase Inhibitors with Anticancer Activity. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 415–426 (2016).
355. Slingerland, M., Guchelaar, H.-J. & Gelderblom, H. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer. Drugs* **25**, 140–149 (2014).
356. Ganai, S. A. Panobinostat: The Small Molecule Metalloenzyme Inhibitor with Marvelous Anticancer Activity. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 427–434 (2016).

357. Garnock-Jones, K. P. Panobinostat: first global approval. *Drugs* **75**, 695–704 (2015).
358. Bagcchi, S. Panobinostat active against diffuse intrinsic pontine glioma. *Lancet Oncol.* **16**, e267 (2015).
359. Shi, W. *et al.* Phase I trial of panobinostat and fractionated stereotactic re-irradiation therapy for recurrent high grade gliomas. *J. Neurooncol.* **127**, 535–539 (2016).
360. Lee, E. Q. *et al.* Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro-Oncol.* **17**, 862–867 (2015).
361. Berghauer Pont, L. M. E. *et al.* The HDAC Inhibitors Scriptaid and LBH589 Combined with the Oncolytic Virus Delta24-RGD Exert Enhanced Anti-Tumor Efficacy in Patient-Derived Glioblastoma Cells. *PLoS One* **10**, e0127058 (2015).
362. Yu, C. *et al.* Mitochondrial Bax translocation partially mediates synergistic cytotoxicity between histone deacetylase inhibitors and proteasome inhibitors in glioma cells. *Neuro-Oncol.* **10**, 309–319 (2008).
363. Chuang, M.-J. *et al.* The HDAC inhibitor LBH589 induces ERK-dependent prometaphase arrest in prostate cancer via HDAC6 inactivation and down-regulation. *PLoS One* **8**, e73401 (2013).
364. Cha, T.-L. *et al.* Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 840–850 (2009).
365. Prystowsky, M. *et al.* Inhibition of Plk1 and Cyclin B1 expression results in panobinostat-induced G₂ delay and mitotic defects. *Sci. Rep.* **3**, 2640 (2013).
366. Landreville, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 408–416 (2012).
367. Li, Y. *et al.* A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes Dev.* **20**, 2566–2579 (2006).
368. Robbins, A. R. *et al.* Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle Georget. Tex* **4**, 717–726 (2005).
369. Ou, W.-B. *et al.* HDACi inhibits liposarcoma via targeting of the MDM2-p53 signaling axis and PTEN, irrespective of p53 mutational status. *Oncotarget* **6**, 10510–10520 (2015).
370. Oh, M., Choi, I.-K. & Kwon, H. J. Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1179–1183 (2008).
371. Campbell, G. R., Bruckman, R. S., Chu, Y.-L. & Spector, S. A. Autophagy induction by histone deacetylase inhibitors inhibits HIV type 1. *J. Biol. Chem.* **290**, 5028–5040 (2015).
372. Di Fazio, P. *et al.* Autophagy-related cell death by pan-histone deacetylase inhibition in liver cancer. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.8585
373. Gandesiri, M. *et al.* DAPK plays an important role in panobinostat-induced autophagy and commits cells to apoptosis under autophagy deficient conditions. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **17**, 1300–1315 (2012).
374. Abdel-Aziz, A. K., Shouman, S., El-Demerdash, E., Elgendy, M. & Abdel-Naim, A. B. Chloroquine synergizes sunitinib cytotoxicity via modulating autophagic, apoptotic and angiogenic machineries. *Chem. Biol. Interact.* **217**, 28–40 (2014).
375. Li, C. *et al.* Impact of autophagy inhibition at different stages on cytotoxic effect of autophagy inducer in glioblastoma cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **35**, 1303–1316 (2015).
376. Thomas, S., Thurn, K. T., Biçaku, E., Marchion, D. C. & Münster, P. N. Addition of a histone deacetylase inhibitor redirects tamoxifen-treated breast cancer cells into apoptosis, which is opposed by the induction of autophagy. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 437–447 (2011).
377. Rao, R. *et al.* Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 973–983 (2012).

ANEXOS



Anexo 1. Datos clínicos y, si los hay, moleculares de los pacientes.

Tabla 27. Datos clínicos de los pacientes con GBM del estudio de genotipado.

Paciente	Sexo	Edad	Superv (d)	Censura	Exéresis	Tratamiento	Localización	Hemisferio
3470	Mujer	76	1326	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
3582	Mujer	52	129	1	Exéresis total	R	Parietal	Derecho
3583	Mujer	69	788	1	Exéresis total	R	Parietal	Izquierdo
3803	Varón	62	139	1	Exéresis subtotal	R	Temporal	Izquierdo
3939	Varón	64	35	1	Exéresis total	R	Otra	Otra
4130	Varón	57	317	1	Exéresis total	R	Frontal	Izquierdo
4295	Mujer	67	340	1	Exéresis total	R	Otra	Otra
4373	Varón	57	928	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Derecho
4386	Varón	77	248	1	Exéresis subtotal	R	Frontal	Derecho
4471	Mujer	66	343	1	Exéresis subtotal	R	Frontal	Izquierdo
4491	Varón	45	137	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
4580	Varón	65	648	1	Exéresis total	R	Temporal	Izquierdo
4664	Mujer	66	440	1	Exéresis total	R	Occipital	Derecho
4943	Varón	65	108	1	Exéresis subtotal	R	Temporal	Derecho
4971	Mujer	62	415	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
4994	Varón	55	224	1	Exéresis total	R+Q	Parietal	Derecho
5036	Varón	50	119	1	Exéresis subtotal	No	Parietal	Izquierdo
5153	Varón	67	346	1	Exéresis subtotal	R	Parietal	Izquierdo
5171	Varón	54	4119	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
5238	Varón	76	246	1	Exéresis total	No	Frontal	Derecho
5240	Varón	69	206	1	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
5330	Varón	60	441	0	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
5343	Varón	64	344	1	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
5484	Varón	71	657	0	Exéresis total	R	Frontal	Izquierdo
5631	Varón	72	251	1	Exéresis subtotal	R	Occipital	Derecho

5686	Mujer	79	47	1	Exéresis subtotal	R	Frontal	Derecho
5700	Varón	64	675	1	Exéresis subtotal	R+Q	Parietal	Izquierdo
5868	Mujer	71	302	0	Exéresis total	R	Occipital	Derecho
5915	Varón	51	507	1	Exéresis total	R	Frontal	Izquierdo
6264	Mujer		884	1	Exéresis total	R	Frontal	Izquierdo
6450	Mujer	49	295	1	Exéresis subtotal	R	Otra	Otra
6498	Varón	34	20	1	Exéresis total	No	Otra	Otra
6628	Varón	66	739	1	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
6685	Varón	56	425	1	Exéresis total	R	Parietal	Derecho
6727	Varón	55	241	1	Exéresis total	R	Parietal	Derecho
6803	Varón	52	506	1	Exéresis total	R	Parietal	Izquierdo
6854	Varón	55	9	1	Exéresis total	No	Temporal	Derecho
7168	Mujer	52	872	1	Exéresis total	R	Otra	Otra
7188	Mujer	67	295	1	Exéresis total	R	Occipital	Derecho
7231	Varón	65	167	1	Exéresis total	R	Temporal	Izquierdo
7263	Varón	70	239	1	Exéresis subtotal	R	Parietal	Izquierdo
7272	Varón	76	167	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
7345	Varón	67	122	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
7368	Mujer	73	261	1	Exéresis subtotal	R	Occipital	Derecho
7380	Mujer	70	564	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
7533	Mujer	67	177	1	Exéresis total	R	Temporal	Izquierdo
7618	Varón	62	7	1	Exéresis subtotal	No	Temporal	Derecho
7632	Mujer	66	621	1	Exéresis subtotal	R+Q	Temporal	Derecho
7661	Varón	69	613	1	Exéresis total	R+Q	Occipital	Derecho
7729	Varón	48	222	1	exérsis total	No	Temporal	Izquierdo
7734	Mujer	74	368	1	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
7757	Mujer	63	263	1	exérsis total	R	Temporal	Derecho
7911	Varón	68	306	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
7939	Mujer	69	448	1	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
8658	Mujer	35	303	1	Exéresis subtotal	R+Q	Temporal	Izquierdo
8700	Varón	72	350	1	Exéresis total	R	Temporal	Izquierdo

993	Varón	61	414	1	Exéresis total	R	Temporal	Izquierdo
9268	Varón	62	381	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
9398	Mujer	27	3046	1	exeresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
9550	Mujer	67	437	1	Exéresis total	R	Frontal	Derecho
9561	Varón	54	276	1	Exéresis total	R	Frontal	Izquierdo
10799	Varón	72	241	1	Exéresis total	No	Temporal	Derecho
10980	Varón	59	192	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
11335	Mujer	61	150	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
11697	Varón	69	479	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
11817	Varón	72	398	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
11885	Mujer	69	108	1	Exéresis subtotal	R	Parietal	Derecho
12015	Varón	65	410	1	Exéresis subtotal	R	Otra	Otra
12072	Mujer	72	551	1	Exéresis total	R	Otra	Otra
12250	Varón	61	143	0	Exéresis subtotal	R	Temporal	Derecho
12267	Varón	62	124	1	Exéresis subtotal	R	Frontal	Derecho
12500	Mujer	64	209	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
12526	Mujer	55	330	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
13011	Varón	53	233	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Derecho
13035	Mujer	68	681	1	Exéresis subtotal	R+Q	Frontal	Izquierdo
13439	Varón	57	1773	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
14135	Varón	69	121	1	Exéresis subtotal	R	Temporal	Derecho
15799	Mujer	76	378	1	Exéresis total	R+Q	Otra	Otra
16027	Mujer	64	625	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
16030	Varón	69	192	1	Exéresis subtotal	No	Parietal	Izquierdo
16037	Varón	68	1441	0	Exéresis subtotal	R+Q	Parietal	Izquierdo
16043	Varón	50	181	1	Exéresis subtotal	R+Q	Otra	Otra
16214	Mujer	65	285	1	Exéresis subtotal	R+Q	Otra	Otra
16715	Mujer	76	1232	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
16782	Mujer	67	393	1	Exéresis total	R+Q	Parietal	Izquierdo
16882	Mujer	74	96	1	Exéresis total	R	Parietal	Izquierdo

17106	Mujer	71	383	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
17382	Varón	63	373	1	Exéresis total	R+Q	Otra	Otra
17515	Mujer	67	1045	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
17785	Mujer	55	923	0	Exéresis total	R+Q	Parietal	Derecho
17889	Varón	69	320	1	Exéresis total	R+Q	Parietal	Izquierdo
17906	Varón	45	551	0	Exéresis total	R+Q	Temporal	Derecho
17994	Mujer	73	?	?	Exéresis subtotal	No	Otra	Otra
18058	Mujer	58	508	0	Exéresis subtotal	R+Q	Otra	Otra
18063	Mujer	72	374	1	Exéresis subtotal	R+Q	Otra	Otra
18571	Mujer	77	230	1	Exéresis total	R	Temporal	Derecho
19054	Varón	76	241	1	Exéresis total	R+Q	Parietal	Izquierdo
20570	Varón	53	372	1	Exéresis subtotal	R+Q	Frontal	Izquierdo
20647	Mujer	61	146	1	Exéresis subtotal	R+Q	Otra	Otra
21440	Varón	69	300	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
21516	Varón	74	65	1	Exéresis subtotal	R+Q	Otra	Otra
21536	Mujer	75	135	1	Exéresis total	No	Frontal	Derecho
21632	Mujer	69	349	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
22790	Mujer	61	469	0	Exéresis total	R+Q	Parietal	Izquierdo
34218	Varón	70	180	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Derecho
33919	Varón	73	60	1	Sólo biopsia		Frontal	Izquierdo
33795	Mujer	67	365	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
33920	Varón	72	9	1	Exéresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
33790	Mujer	55	540	1	Exéresis total	R+Q	Occipital	Derecho
33921	Mujer	63	390	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
34224	Varón	50	630	0	Exéresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
33796	Mujer	51	480	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
34223	Varón	49	300	1	Exéresis total	R+Q	Fronto-temporal	Derecho
34221	Mujer	45	450	0	Exéresis total	R+Q	Fronto-temporal	Derecho
33922	Varón	64	30	1	Exéresis total		Temporal	Derecho

34222	Varón	40	365	0	Exéresis total	R+Q	Occipito-parietal	Izquierdo
34216	Varón	48	420	0	Exéresis total	R+Q	Temporal	Izquierdo
33730	Mujer	55	365	0	Exéresis total	R+Q	Temporo-parietal	Izquierdo
33923	Varón	68	390	0	Exéresis total	R+Q	Parietal	Izquierdo
33728	Mujer	59	390	0	Exéresis total	R+Q	Temporo-parietal	Derecho
34217	Varón	67	365	1	Exéresis total	R+Q	T-P	Derecho
34219	Varón	75	365	0	Exéresis subtotal	R+Q	T-P	Derecho
33734	Mujer	63	390	1	Exéresis total	R+Q	Frontal	Derecho
33735	Mujer	55	540	1	Exéresis total	R+Q	Occipital	Derecho
33732	Mujer	55	540	1	Exéresis total	R+Q	Occipital	Derecho
34220	Mujer	68	180	0	Exéresis subtotal	R+Q	Fronto-temporal	Derecho
33924	Mujer	57	180	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
33797	Varón	71	150	1	Exéresis total	R	Parietal	Izquierdo
33791	Mujer	65	90	1	Exéresis subtotal	R+Q	T-P	Izquierdo
33792	Varón	64	90	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
33798	Varón	67	90	0	Exéresis subtotal	R+Q	Frontal	Izquierdo
33793	Varón	41	60	0	Exéresis subtotal	R+Q	Temporal	Derecho
33731	Mujer	34	60	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
33729	Mujer	44	60	0	Exéresis total	R+Q	Frontal	Izquierdo
33733	Varón	75	60	0	Exéresis subtotal	R+Q	T-P-O	Izquierdo
24958	Varón	63	150	1		R + Q	Frontal	Izquierdo
26426	Mujer	63	360	1		R + Q	Temporal	Derecho
26427	Mujer	47	240	1		R + Q	Otra	Derecho
27755	Varón	74	240	1		R + Q	Parietal	Izquierdo
27757	Varón	50	180	1		R + Q	Otra	Derecho
27861	Mujer	70	365	1		R + Q	Parietal	Derecho
28083	Mujer	72	330	1		R + Q	Frontal	Derecho

28085	Varón	57	300	1	R + Q	Temporal	Derecho
28513	Mujer	66	750	0	R + Q	Otra	Derecho
28993	Varón	51	930	0	R + Q	Parietal	Derecho
29116	Mujer	59	570	1	R + Q	Otra	Derecho
29201	Mujer	68	420	1	R + Q	Occipital	Derecho
29203	Mujer	51	600	1	R + Q	Otra	Derecho
29228	Mujer	72	210	1	R + Q	Temporal	Derecho
29490	Mujer	63	2920	1	R + Q	Frontal	Izquierdo
29615	Mujer	67	60	1	R + Q	Temporal	Izquierdo
29709	Mujer	64	120	1	R + Q	Otra	
30165	Mujer	69	90	1	R + Q	Parietal	Izquierdo
30287	Mujer	44	810	0	R + Q	Otra	Izquierdo
30378	Mujer	65	420	1	R + Q	Temporal	Izquierdo
30476	Varón	74	150	1	R + Q	Temporal	Izquierdo
30998	Mujer	51	365	1	R + Q	Otra	Derecho
31028	Varón	63	180	1	R + Q	Parietal	Derecho
31268	Varón	52	240	1	R + Q	Otra	Derecho
31503	Varón	79	180	1	R + Q	Otra	Derecho
31566	Varón	48	330	1	R + Q	Parietal	Izquierdo
32086	Varón	44			R + Q	Temporal	Derecho
32272	Varón	49	270	0	R + Q	Frontal	Izquierdo
32274	Mujer	72	300	0	R + Q	Temporal	Derecho
32871	Varón	53	270	0	R + Q	Occipital	Derecho
32990	Varón	68	210	0	R + Q	Frontal	Izquierdo

Tabla 28. Datos clínicos de los pacientes del estudio de expresión de proteínas de autofagia.

Pacientes	Diagnóstico	Sexo	Edad	Tratamiento	Supervivencia (d)	Censura	Exéresis	Localización	Hemisferio
5171	Glioblastoma	Varón	54	R+Q	4119	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
5322	Glioblastoma	Varón	45	R	500	1	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
5330	Glioblastoma	Varón	60	R	441	0	Exéresis total	Frontal	Derecho
5343	Glioblastoma	Varón	64	R	344	1	Exéresis total	Frontal	Derecho
5686	Glioblastoma	Mujer	79	R	47	1	Exéresis subtotal	Frontal	Derecho
5700	Glioblastoma	Varón	64	R+Q	675	1	Exéresis subtotal	Parietal	Izquierdo
5868	Glioblastoma	Mujer	71	R	302	0	Exéresis total	Occipital	Derecho
6264	Glioblastoma	Mujer		R	884	1	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
6498	Glioblastoma	Varón	34	No	20	1	Exéresis total	Otra	Otra
6628	Glioblastoma	Varón	66	R	739	1	Exéresis total	Frontal	Derecho
6803	Glioblastoma	Varón	52	R	506	1	Exéresis total	Parietal	Izquierdo
7188	Glioblastoma	Mujer	67	R	295	1	Exéresis total	Occipital	Derecho
7263	Glioblastoma	Varón	70	R	239	1	Exéresis subtotal	Parietal	Izquierdo
7363	Glioblastoma	Mujer	51	R	200	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
7618	Glioblastoma	Varón	62	No	7	1	Exéresis subtotal	Temporal	Derecho
7632	Glioblastoma	Mujer	66	R+Q	621	1	Exéresis subtotal	Temporal	Derecho
7911	Glioblastoma	Varón	68	R	306	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
7939	Glioblastoma	Mujer	69	R	448	1	Exéresis total	Frontal	Derecho
8700	Glioblastoma	Varón	72	R	350	1	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
9398	Glioblastoma	Mujer	27	R+Q	3046	1	exeresis total	Temporal	Izquierdo
10799	Glioblastoma	Varón	72	No	241	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
11335	Glioblastoma	Mujer	61	R	150	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
11885	Glioblastoma	Mujer	69	R	108	1	Exéresis subtotal	Parietal	Derecho
12015	Glioblastoma	Varón	65	R	410	1	Exéresis subtotal	Otra	Otra
12072	Glioblastoma	Mujer	72	R	551	1	Exéresis total	Otra	Otra
12500	Glioblastoma	Mujer	64	R+Q	209	1	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
12526	Glioblastoma	Mujer	55	R+Q	330	1	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
13035	Glioblastoma	Mujer	68	R+Q	681	1	Exéresis subtotal	Frontal	Izquierdo

16715	Glioblastoma	Mujer	76	R+Q	1232	0	Exéresis total	Frontal	Derecho
16882	Glioblastoma	Mujer	74	R	96	1	Exéresis total	Parietal	Izquierdo
17515	Glioblastoma	Mujer	67	R+Q	1045	0	Exéresis total	Frontal	Derecho
18058	Glioblastoma	Mujer	58	R+Q	508	0	Exéresis subtotal	Otra	Otra
18063	Glioblastoma	Mujer	72	R+Q	374	1	Exéresis subtotal	Otra	Otra
18571	Glioblastoma	Mujer	77	R	230	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
33697	Glioblastoma	Varón	70	R+Q	180	1	Exéresis total	Temporal dch	Derecho
33698	Glioblastoma	Varón	73		60	1	Sólo biopsia	Frontal	Izquierdo
33699	Glioblastoma	Mujer	67	R+Q	365	1	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
33700	Glioblastoma	Varón	72	R+Q	9 días	1	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
33701	Glioblastoma	Mujer	55	R+Q	540	1	Exéresis total	Occipital dch	Derecho
33702	Glioblastoma	Mujer	63	R+Q	390	1	Exéresis total	Frontal	Derecho
33703	Glioblastoma	Varón	50	R+Q	630	0	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
33704	Glioblastoma	Mujer	51	R+Q	480	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
33705	Glioblastoma	Varón	49	R+Q	300	1	Exéresis total	Fronto-temporal	Derecho
33706	Glioblastoma	Mujer	45	R+Q	450	0	Exéresis total	Fronto-temporal	Derecho
33707	Glioblastoma	Varón	64		30	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
33708	Glioblastoma	Varón	40	R+Q	365	0	Exéresis total	Occipito-parietal	Izquierdo
33709	Glioblastoma	Varón	48	R+Q	420	0	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
33710	Glioblastoma	Mujer	55	R+Q	365	0	Exéresis total	Temporo-parietal	Izquierdo
33711	Glioblastoma	Varón	68	R+Q	390	0	Exéresis total	Parietal	Izquierdo
33712	Glioblastoma	Mujer	59	R+Q	390	0	Exéresis total	Temporo-parietal	Derecho
33713	Glioblastoma	Varón	67	R+Q	365	1	Exéresis total	Temporo-parietal	Derecho
33714	Glioblastoma	Varón	75	R+Q	365	0	Exéresis subtotal	Temporo-parietal	Derecho
33715	Glioblastoma	Mujer	63	R+Q	390	1	Exéresis total	Frontal	Derecho
33716	Glioblastoma	Mujer	55	R+Q	540	1	Exéresis total	Occipital	Derecho
33717	Glioblastoma	Mujer	68	R+Q	180	0	Exéresis subtotal	Fronto-temporal	Derecho
33718	Glioblastoma	Mujer	57	R+Q	180	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
33719	Glioblastoma	Varón	71	R	150	1	Exéresis total	Parietal	Izquierdo
33721	Glioblastoma	Mujer	65	R+Q	90	1	Exéresis subtotal	T-P	Izquierdo
33722	Glioblastoma	Varón	64	R+Q	90	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo

33723	Glioblastoma	Varón	67	R+Q	90	0	Exéresis subtotal	Frontal	Izquierdo
33724	Glioblastoma	Varón	41	R+Q	60	0	Exéresis subtotal	Temporal	Derecho
33725	Glioblastoma	Mujer	34	R+Q	60	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
33726	Glioblastoma	Mujer	44	R+Q	60	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
33727	Glioblastoma	Varón	75	R+Q	60	0	Exéresis subtotal	Temporo parieto occipital	Izquierdo
5162	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	39	R+Q	1916	1	Exéresis subtotal	Parietal	Derecho
5893	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	32	No	668	0	Exéresis subtotal	Parietal	Derecho
5965	Astrocitoma pilocítico	Varón	15	No	2700	0	Exéresis total	Otra	Otra
7666	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	33	R+Q	1713	1	Exéresis total	Temporal	Derecho
7709	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	31	R+Q	2738	0	Exéresis subtotal		Derecho
9063	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	55	R+Q	1842	1	Exéresis subtotal	Otra	Otra
11423	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	43	No	2130	0	Exéresis total	Frontal	Derecho
11924	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	33	No	160	1	Exéresis subtotal	Otra	Otra
12100	Astrocitoma pilocítico	Mujer	17	No	1855	0	Exéresis total	Otra	Otra
12126	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	52	R	1040	0	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
12359	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	41	R+Q	912	0	Exéresis total	Frontal	Derecho
12971	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	40	R	1910	0	Exéresis parcial	Otra	Otra
13123	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	29	No	1614	0	Exéresis total	Frontal	Izquierdo
16506	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	69	R+Q	552	1	Exéresis subtotal	Otra	Otra
16520	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	22	No	1284	0	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
18789	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	29	R+Q	956	0	Exéresis subtotal	Frontal	Izquierdo
4530	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	64	R	436	1	Exéresis subtotal	Parietal	Izquierdo
13603	Astrocitoma Bajo Grado	Varón	49	R	1605	0	Exéresis total	Otra	Otra
14933	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	38	R	1603	1	Exéresis subtotal	Otra	Otra
26446	Astrocitoma Bajo Grado	Hombre	27	No	677	0	Exéresis total	Frontal	Derecho
26928	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	38	R	579	0	Exéresis subtotal	Temporal	Izquierdo
26935	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	67	No	122	1	Exéresis subtotal	Frontal	Derecho
27370	Astrocitoma Bajo Grado	Mujer	44	No	246	0	Exéresis total	Temporal	Izquierdo
28004	Astrocitoma Bajo Grado	Hombre	28	R	3015	0	Exéresis total	Temporal	Izquierdo

Tabla 29. Perfil molecular de los glioblastomas analizados en la correlación entre las expresiones de proteínas de autofagia y el subtipo molecular tumoral.

Pacientes	Expresión p53	Mutación P53	Mutación IDH1 o IDH2	Expresión EGFRvIII	Mutación PTEN	Delección PTEN FISH	Amplif EGFR FISH	Clasificación molecular
5171	>90%	No mutado	Mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	No amplificado	Proneural
5322	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	No amplificado	Clásico
5330	10-50%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	Amplificado	Mesenquimal
5343	50-90%	No mutado	No mutado	Positiva	Mutado			Clásico
5686	>90%	Mutado	No mutado	Positiva	Mutado			Mesenquimal
5700	50-90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado		Amplificado	Clásico
5868	10-50%	No mutado	No mutado	Positiva	Mutado	Deleciónado	Amplificado	Mesenquimal
6264	50-90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	Amplificado	Clásico
6498	>90%	Mutado	No mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	Amplificado	Proneural
6628	10-50%	Mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	No amplificado	Mesenquimal
6803	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	Amplificado	Clásico
7363	>90%	Mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	No amplificado	Mesenquimal
7618	50-90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	No amplificado	Clásico
7632	>90%	No mutado	No mutado		No mutado	Deleciónado	No amplificado	Clásico
7911	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	Amplificado	Clásico
7939	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	Amplificado	Clásico
8700 SP	50-90%	Mutado	No mutado	Positiva	Mutado			Mesenquimal
9398 SP	10-50%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado			Proneural
11885 SP	50-90%	No mutado	No mutado	Positiva	Mutado	Deleciónado	No amplificado	Clásico
12015 SP	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado		No amplificado	Clásico
12072 SP	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	Amplificado	Clásico
12500SP	>90%	Mutado	No mutado	Positiva	No mutado	No deleciónado	No amplificado	Proneural
12526 SP	>90%	No mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	No amplificado	Clásico
13035 SP	>90%	Mutado	No mutado	Positiva	No mutado	Deleciónado	No amplificado	Mesenquimal

Anexo 2. Resumen de resultados estadísticos.

Tabla 30. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo *ATG2B* rs3759601.

		ATG2B rs3759601			Chi-cuadrado	Sig.
		CC	CG	GG		
Sexo	Mujeres	21	34	22	1,525	,466
	Hombres	32	33	24		
Edad	<63	23	26	23	1,242	,538
	>63	30	40	23		
Tratamiento	R+Q	21	39	36	18,122	,001
	R	28	24	6		
	No	4	4	2		
Hemisferio	Izquierdo	23	23	20	7,221	,125
	Derecho	21	38	24		
	Otro	9	5	2		
Localización	Frontal	14	18	13	3,273	,916
	Temporal	18	20	9		
	Parietal	8	12	10		
	Occipital	3	3	2		
	Otra	10	14	12		
Exéresis	Total	39	32	26	6,069	,048
	Subtotal	14	20	4		
Supervivencia					4,538	,103

Tabla 31. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo *ATG5* rs2245214.

		ATG5 rs2245214			Chi-cuadrado	Sig.
		CC	CG	GG		
Sexo	Mujeres	29	39	9	,236	,889
	Hombres	35	42	12		
Edad	<63	24	38	10	1,601	,449
	>63	40	42	11		
Tratamiento	R+Q	42	47	7	9,530	,049
	R	16	29	13		
	No	5	4	1		
Hemisferio	Izquierdo	28	33	5	6,531	,163
	Derecho	27	41	15		
	Otro	9	6	1		
Localización	Frontal	19	19	7	9,365	,312
	Temporal	17	24	6		
	Parietal	8	19	3		
	Occipital	1	5	2		
	Otra	19	14	3		
Exéresis	Total	34	51	12	1,068	,586
	Subtotal	14	17	7		
Supervivencia					,043	,979

Tabla 32. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo *ATG10* rs1864183.

		<i>ATG10</i> rs1864183			Chi-cuadrado	Sig.
		CC	CT	TT		
Sexo	Mujeres	17	39	21	,821	,663
	Hombres	15	50	24		
Edad	<63	17	37	18	1,504	,471
	>63	15	51	27		
Tratamiento	R+Q	18	49	29	6,125	,190
	R	12	36	10		
	No	1	4	5		
Hemisferio	Izquierdo	13	35	18	4,651	,325
	Derecho	19	43	21		
	Otro	0	10	6		
Localización	Frontal	8	24	13	4,713	,788
	Temporal	8	25	14		
	Parietal	8	15	7		
	Occipital	2	6	0		
	Otra	6	19	11		
Exéresis	Total	17	59	21	2,313	,315
	Subtotal	6	19	13		
Supervivencia					8,592	,014

Tabla 33. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo *ATG16L1* rs2241880.

		<i>ATG16L1</i> rs2241880			Chi-cuadrado	Sig.
		GG	GA	AA		
Sexo	Mujeres	23	38	16	2,097	,351
	Hombres	18	51	20		
Edad	<63	18	37	17	,280	,869
	>63	23	51	19		
Tratamiento	R+Q	32	47	17	8,934	,063
	R	8	35	15		
	No	1	6	3		
Hemisferio	Izquierdo	16	38	12	2,574	,631
	Derecho	20	41	22		
	Otro	4	10	2		
Localización	Frontal	9	28	8	10,151	,255
	Temporal	13	22	12		
	Parietal	6	13	11		
	Occipital	2	6	0		
	Otra	11	20	5		
Exéresis	Total	17	53	27	,241	,887
	Subtotal	7	22	9		
Supervivencia					,438	,803

Tabla 34. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo *NOD2* rs2066844.

		<i>NOD2</i> rs2066844				
		CC	CT	TT	Chi-cuadrado	Sig.
Sexo	Mujeres	56	21	0	8,796	,012
	Hombres	74	11	4		
Edad	<63	61	8	3	6,818	,033
	>63	68	24	1		
Tratamiento	R+Q	73	22	1	15,604	,112
	R	48	7	3		
	No	7	3	0		
Hemisferio	Izquierdo	53	11	2	26,139	,052
	Derecho	69	12	2		
	Otro	7	9	0		
Localización	Frontal	36	6	3	21,383	,164
	Temporal	40	6	1		
	Parietal	22	8	0		
	Occipital	6	2	0		
	Otra	26	10	0		
Exéresis	Total	73	21	3	12,501	,130
	Subtotal	28	9	1		
Supervivencia					1,303	,521

Tabla 35. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto al polimorfismo *NOD2* rs2066845.

		<i>NOD2</i> rs2066845			
		GG	GC	Chi-cuadrado	Sig.
Sexo	Mujeres	74	3	,384	,535
	Hombres	87	2		
Edad	<63	70	2	,028	,868
	>63	90	3		
Tratamiento	R+Q	92	4	5,046	,410
	R	58	0		
	No	9	1		
Hemisferio	Izquierdo	65	1	1,854	,985
	Derecho	80	3		
	Otro	15	1		
Localización	Frontal	43	2	3,744	,879
	Temporal	47	0		
	Parietal	29	1		
	Occipital	8	0		
	Otra	34	2		
Exéresis	Total	94	3	,247	,993
	Subtotal	37	1		
Supervivencia				1,050	,306

Tabla 36. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de p62.

		P62			Chi-cuadrado	Sig.
		Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal		
Sexo	Mujeres	26	8	0	4,230	0,121
	Hombres	26	2	1		
Edad	<63	23	3	0	1,517	,468
	>63	28	7	1		
Tratamiento	R+Q	32	6	0	20,802	,000
	R	17	3	0		
	No	1	1	1		
Hemisferio	Izquierdo	26	3	0	4,121	,390
	Derecho	23	5	1		
	Otro	3	2	0		
Localización	Frontal	20	1	1	8,676	,370
	Temporal	11	4	0		
	Parietal	6	3	0		
	Occipital	2	0	0		
	Otra	13	2	1		
Exéresis	Total	38	7	1	,416	,812
	Subtotal	14	3	0		
Supervivencia					4,949	,026
hTERT C228T	WT	36	11	2	4,364	,113
	Mutado	13	0	0		
hTERT C250T	WT	27	10	0	7,845	,020
	Mutado	22	1	2		
hTERT Mut gral	WT	15	10	0	14,969	,001
	Mutado	34	1	2		

Tabla 37. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de mTOR.

		mTOR				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión		
Sexo	Mujeres	18	5	9	2	4,242	,236
	Hombres	11	2	15	2		
Edad	<63	6	5	12	3	12,080	,007
	>63	23	1	12	1		
Tratamiento	R+Q	16	3	15	4	5,312	,505
	R	12	2	7	0		
	No	1	1	1	0		
Hemisferio	Izquierdo	11	3	14	1	4,249	,643
	Derecho	15	3	9	3		
	Otro	3	1	1	0		
Localización	Frontal	11	3	7	0	8,628	,734
	Temporal	6	1	9	1		
	Parietal	3	1	4	1		
	Occipital	2	0	0	0		
	Otra	7	2	4	2		
Exéresis	Total	23	6	16	2	2,744	,433
	Subtotal	6	1	8	2		
Supervivencia						,909	,823
hTERT C228T	WT	25	4	17	4	1,721	,632
	Mutado	6	2	5	0		
hTERT C250T	WT	16	5	13	3	2,584	,460
	Mutado	15	1	9	1		
hTERT Mut gral	WT	10	3	9	3	3,079	,380
	Mutado	21	3	13	1		

Tabla 38. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de LC3B-I.

		LC3B-I				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión		
Sexo	Mujeres	18	14	2	0	3,075	,380
	Hombres	11	17	1	1		
Edad	<63	15	11	0	0	4,987	,173
	>63	13	20	3	1		
Tratamiento	R+Q	16	19	2	1	1,565	,955
	R	11	9	1	0		
	No	1	2	0	0		
Hemisferio	Izquierdo	18	9	1	1	8,911	,179
	Derecho	10	18	2	0		
	Otro	1	4	0	0		
Localización	Frontal	12	7	2	0	13,771	,316
	Temporal	10	7	0	0		
	Parietal	3	5	1	0		
	Occipital	0	2	0	0		
	Otra	4	10	0	1		
Exéresis	Total	22	23	2	0	2,932	,402
	Subtotal	7	8	1	1		
Supervivencia						6,468	,039
hTERT C228T	WT	20	27	3	0	,999	,607
	Mutado	7	5	1	0		
hTERT C250T	WT	18	16	3	0	2,145	,342
	Mutado	9	16	1	0		
hTERT Mut gral	WT	12	11	2	0	,810	,667
	Mutado	15	21	2	0		

Tabla 39. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de LC3B-II.

		LC3B-II			Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sin expresión	Baja expresión		
Sexo	Mujeres	22	9	3	,375	,829
	Hombres	21	6	3		
Edad	<63	18	6	2	,177	,915
	>63	25	8	4		
Tratamiento	R+Q	27	7	4	4,609	,330
	R	12	8	1		
	No	3	0	0		
Hemisferio	Izquierdo	18	7	4	1,609	,807
	Derecho	21	7	2		
	Otro	4	1	0		
Localización	Frontal	12	5	4	5,583	,694
	Temporal	12	5	0		
	Parietal	6	2	1		
	Occipital	2	0	0		
	Otra	11	3	1		
Exéresis	Total	32	11	4	,162	,922
	Subtotal	11	4	2		
Supervivencia					8,218	,016
hTERT C228T	WT	37	11	2	3,039	,219
	Mutado	7	4	2		
hTERT C250T	WT	25	8	4	3,057	,217
	Mutado	19	7	0		
hTERT Mut gral	WT	19	4	2	1,465	,481
	Mutado	25	11	2		

Tabla 40. Relación de resultados no significativos en GBM respecto a la expresión de Beclin1.

		Beclin1				Chi-cuadrado	Sig.
		Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal	Sobreexpresión		
Sexo	Mujeres	7	7	16	2	1,799	,615
	Hombres	7	6	14	0		
Edad	<63	5	4	13	2	3,676	,299
	>63	9	9	17	0		
Tratamiento	R+Q	6	8	21	2	5,495	,482
	R	6	5	7	0		
	No	0	0	2	0		
Hemisferio	Izquierdo	8	5	12	2	3,892	,691
	Derecho	5	7	16	0		
	Otro	1	1	2	0		
Localización	Frontal	7	5	6	2	16,163	,184
	Temporal	5	0	10	0		
	Parietal	1	2	5	0		
	Occipital	0	1	1	0		
	Otra	1	5	8	0		
Exéresis	Total	12	7	22	2	4,297	,231
	Subtotal	2	6	8	0		
Supervivencia						3,688	,158
hTERT C228T	WT	10	10	25	1	3,467	,325
	Mutado	5	2	4	1		
hTERT C250T	WT	12	6	15	2	5,173	,160
	Mutado	3	6	14	0		
hTERT Mut gral	WT	7	4	12	1	,554	,907
	Mutado	8	8	17	1		

Tabla 41. Relación de resultados estadísticos en GBM respecto a la expresión de PKCz.

		PKCz				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión		
Sexo	Mujeres	26	6	0	1	13,838	,003
	Hombres	9	11	1	6		
Edad	<63	16	5	1	2	2,841	,417
	>63	19	11	0	5		
Tratamiento	R+Q	21	9	1	6	3,482	,746
	R	12	6	0	1		
	No	2	0	0	0		
Hemisferio	Izquierdo	12	11	1	4	7,361	,289
	Derecho	19	6	0	3		
	Otro	4	0	0	0		
Localización	Frontal	12	8	1	0	8,911	,710
	Temporal	9	3	0	3		
	Parietal	5	1	0	2		
	Occipital	1	1	0	0		
	Otra	8	4	0	2		
Exéresis	Total	24	13	1	6	1,404	,705
	Subtotal	11	4	0	1		
Supervivencia						13,258	,004
hTERT C228T	WT	30	11	1	4	2,123	,547
	Mutado	6	5	0	2		
hTERT C250T	WT	22	10	0	4	1,661	,646
	Mutado	14	6	1	2		
hTERT Mut gral	WT	17	5	0	2	2,048	,562
	Mutado	19	11	1	4		

Tabla 42. Relación de resultados no significativos en GBM respecto a la expresión de PI3KCA.

		PI3KCA				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión		
Sexo	Mujeres	15	2	4	12	1,286	,732
	Hombres	9	1	4	13		
Edad	<63	10	0	4	10	2,365	,500
	>63	14	3	4	14		
Tratamiento	R+Q	15	1	6	15	9,661	,140
	R	8	1	2	8		
	No	1	1	0	1		
Hemisferio	Izquierdo	9	1	2	16	9,993	,125
	Derecho	13	1	6	8		
	Otro	2	1	0	1		
Localización	Frontal	6	0	4	11	7,540	,820
	Temporal	7	2	2	4		
	Parietal	4	0	1	3		
	Occipital	1	0	0	1		
	Otra	6	1	1	6		
Exéresis	Total	16	3	7	18	2,480	,479
	Subtotal	8	0	1	7		
Supervivencia						,930	,818
hTERT C228T	WT	20	4	5	17	1,585	,663
	Mutado	5	0	2	6		
hTERT C250T	WT	18	1	4	12	3,689	,297
	Mutado	7	3	3	10		
hTERT Mut gral	WT	13	1	2	8	2,492	,477
	Mutado	12	3	5	15		

Tabla 43. Relación de resultados no significativos en GBM respecto a la expresión de TRAF6.

		TRAF6				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión		
Sexo	Mujeres	13	2	4	15	5,861	,119
	Hombres	16	4	5	5		
Edad	<63	12	3	5	6	1,683	,641
	>63	17	3	4	13		
Tratamiento	R+Q	14	5	6	13	6,316	,389
	R	12	1	2	6		
	No	3	0	0	0		
Hemisferio	Izquierdo	12	3	3	11	3,738	,71
	Derecho	14	3	6	7		
	Otro	3	0	0	2		
Localización	Frontal	7	3	3	8	8,507	,744
	Temporal	12	0	2	3		
	Parietal	4	1	1	3		
	Occipital	1	0	0	1		
	Otra	5	2	3	5		
Exéresis	Total	21	5	7	14	,525	,913
	Subtotal	8	1	2	6		
Supervivencia						7,552	,056
hTERT C228T	WT	23	3	9	15	3,620	,305
	Mutado	7	2	0	4		
hTERT C250T	WT	18	2	4	13	2,238	,525
	Mutado	12	3	5	6		
hTERT Mut gral	WT	11	1	4	9	1,477	,687
	Mutado	19	4	5	10		

Tabla 44. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de p62.

		P62			Chi-cuadrado	Sig.
		Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal		
Sexo	Mujeres	4	3	3	1,280	,527
	Hombres	5	2	7		
Edad	<63	6	3	6	15,160	,513
	>63	3	2	4		
Tratamiento	R+Q	4	2	1	5,482	,241
	R	3	0	4		
	No	2	3	5		
Hemisferio	Izquierdo	2	1	5	5,000	,287
	Derecho	5	2	1		
	Otro	2	2	4		
Localización	Frontal	2	2	2	7,858	,249
	Temporal	1	1	4		
	Parietal	3	0	0		
	Otra	2	2	4		
Exéresis	Total	3	4	5	2,800	,247
	Subtotal	6	1	5		
Supervivencia					,338	,844

Tabla 45. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de mTOR.

		mTOR				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión		
Sexo	Mujeres	8	0	1	1	2,194	,533
	Hombres	8	1	4	1		
Edad	<63	9	1	4	1	21,190	,627
	>63	7	0	1	1		
Tratamiento	R+Q	5	0	2	0	2,777	,836
	R	5	0	1	1		
	No	6	1	2	1		
Hemisferio	Izquierdo	5	0	1	2	8,475	,205
	Derecho	4	1	3	0		
	Otro	7	0	1	0		
Localización	Frontal	5	0	1	0	15,513	,078
	Temporal	2	0	2	2		
	Parietal	2	1	0	0		
	Otra	7	0	1	0		
Exéresis	Total	6	0	4	2	5,800	,122
	Subtotal	10	1	1	0		
Supervivencia					3,866	276	

Tabla 46. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de LC3B-I.

		LC3B-I		
		Expresión normal	Chi-cuadrado	Sig.
Sexo	Mujeres	10	-	-
	Hombres	14		
Edad	<63	15	-	-
	>63	9		
Tratamiento	R+Q	7	-	-
	R	7		
	No	10		
Hemisferio	Izquierdo	8	-	-
	Derecho	8		
	Otro	8		
Localización	Frontal	6	-	-
	Temporal	6		
	Parietal	3		
	Otra	8		
Exéresis	Total	12	-	-
	Subtotal	12		
Supervivencia			-	-

Tabla 47. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de LC3B-II.

		LC3B-II			
		Expresión normal	Baja expresión	Chi-cuadrado	Sig.
Sexo	Mujeres	8	2	,882	,348
	Hombres	13	1		
Edad	<63	13	2	1,94	,983
	>63	8	1		
Tratamiento	R+Q	5	2	2,710	,258
	R	7	0		
	No	9	1		
Hemisferio	Izquierdo	8	0	2,286	,319
	Derecho	6	2		
	Otro	7	1		
Localización	Frontal	5	1	1,483	,686
	Temporal	6	0		
	Parietal	3	0		
	Otra	7	1		
Exéresis	Total	10	2	,381	,537
	Subtotal	11	1		
Supervivencia				1,700	,192

Tabla 48. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de Beclin1.

		Beclin1			Chi-cuadrado	Sig.
		Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal		
Sexo	Mujeres	0	1	9	,891	,640
	Hombres	1	2	11		
Edad	<63	1	1	13	4,546	,998
	>63	0	2	7		
Tratamiento	R+Q	0	2	5	4,137	,388
	R	0	0	7		
	No	1	1	8		
Hemisferio	Izquierdo	0	0	8	4,400	,355
	Derecho	0	2	6		
	Otro	1	1	6		
Localización	Frontal	0	1	5	2,556	,862
	Temporal	0	1	5		
	Parietal	0	0	3		
	Otra	1	1	6		
Exéresis	Total	1	2	9	1,533	,465
	Subtotal	0	1	11		
Supervivencia					1,149	,563

Tabla 49. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de PKCz.

		PKCz				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión		
Sexo	Mujeres	9	0	1	0	3,634	,304
	Hombres	11	1	0	2		
Edad	<63	12	1	1	1	4,952	1,00
	>63	8	0	0	1		
Tratamiento	R+Q	6	0	1	0	4,766	,574
	R	6	0	0	1		
	No	8	1	0	1		
Hemisferio	Izquierdo	6	0	0	2	8,100	,231
	Derecho	7	0	1	0		
	Otro	7	1	0	0		
Localización	Frontal	6	0	0	0	11,500	,243
	Temporal	3	0	1	2		
	Parietal	3	0	0	0		
	Otra	7	1	0	0		
Exéresis	Total	8	1	1	2	4,800	,187
	Subtotal	12	0	0	0		
Supervivencia					2,182	,536	

Tabla 50. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de PI3KCA.

		PI3KCA			Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Sin expresión		
Sexo	Mujeres	9	0	1	1,768	,413
	Hombres	10	2	2		
Edad	<63	13	0	2	7,425	,964
	>63	6	2	1		
Tratamiento	R+Q	4	1	2	4,415	,353
	R	6	1	0		
	No	9	0	1		
Hemisferio	Izquierdo	7	1	0	7,421	,115
	Derecho	5	0	3		
	Otro	7	1	0		
Localización	Frontal	5	0	2	3,505	,743
	Temporal	4	1	1		
	Parietal	3	0	0		
	Otra	7	1	0		
Exéresis	Total	9	1	2	,386	,824
	Subtotal	10	1	1		
Supervivencia					2,182	,536

Tabla 51. Relación de resultados no significativos en ABG respecto a la expresión de TRAF6.

		TRAF6			Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sin expresión			
Sexo	Mujeres	10	0	,745	,388	
	Hombres	13	1			
Edad	<63	14	1	1,739	,988	
	>63	9	0			
Tratamiento	R+Q	6	1	2,534	,282	
	R	7	0			
	No	10	0			
Hemisferio	Izquierdo	8	0	2,087	,352	
	Derecho	7	1			
	Otro	8	0			
Localización	Frontal	6	0	-	-	
	Temporal	6	0			
	Parietal	3	0			
	Otra	8	0			
Exéresis	Total	12	0	1,043	,307	
	Subtotal	11	1			
Supervivencia					1,573	,455

Tabla 52. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto al estado de la autofagia.

		Estado de la autofagia		Chi-cuadrado	Sig.
		A	C		
Estado de la autofagia	GBM	22	46	4,174	,041
	ABG	3	23		
	GBM			2,053	,152
	ABG			1,700	,192

Tabla 53. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de p62.

		P62			Chi-cuadrado	Sig.
		Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal		
Tipo	ABG	9	5	12	29,120	,000
	GBM	54	11	2		

Tabla 54. Relación de resultados no significativos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de mTOR.

		mTOR				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión		
Tipo	ABG	18	1	5	2	4,074	,254
	GBM	33	7	24	4		

Tabla 55. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de LC3B-I.

		LC3B-I				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión		
Tipo	ABG	26	0	0	0	25,486	,000
	GBM	29	34	4	1		

Tabla 56. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de LC3B-II.

		LC3B-II			Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sin expresión	Baja expresión		
Tipo	ABG	23	0	3	7,373	,025
	GBM	46	16	6		

Tabla 57. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de Beclin1.

		Beclin1				Chi-cuadrado	Sig.
		Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal	Sobreexpresión		
Tipo	ABG	1	3	22	0	9,475	,024
	GBM	15	14	32	2		

Tabla 58. Relación de resultados no significativos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de PKCz.

		PKCz				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Baja expresión	Sin expresión	Sobreexpresión		
Tipo	ABG	20	1	1	4	6,779	,079
	GBM	38	18	1	7		

Tabla 59. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de PI3KCA.

		PI3KCA				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión		
Tipo	ABG	21	2	0	3	13,868	,003
	GBM	26	4	8	26		

Tabla 60. Relación de resultados estadísticos en la comparación de astrocitomas de alto y bajo grado respecto a la expresión de TRAF6.

		TRAF6				Chi-cuadrado	Sig.
		Expresión normal	Sobreexpresión	Baja expresión	Sin expresión		
Tipo	ABG	25	0	0	1	21,078	,000
	GBM	30	6	11	21		

Tabla 61. Relación de resultados no significativos respecto a la comparación de la expresión de proteínas de autofagia y la clasificación molecular de los tumores analizados.

		Clasificación molecular				Estadístico de Fisher	Sig.
		Mesenquimal	Clásico	Proneural			
p62	Ausente	6	10	3	,657	1,000	
	Presente	1	2	1			
mTOR	Ausente	2	6	1	,917	,623	
	Presente	5	7	3			
LC3-II	Ausente	1	6	1	2,070	,439	
	Presente	6	7	3			
Beclin1	Ausente	2	3	2	1,450	,667	
	Presente	5	6	1			
PKCz	Ausente	0	2	2	4,799	,073	
	Presente	7	8	1			
PI3KCA	Ausente	4	6	2	,313	1,000	
	Presente	3	4	1			
TRAF6	Ausente	1	3	2	1,786	,561	
	Presente	6	10	2			