



Universitat de Lleida

Implicació dels canals de calci de tipus T en la regulació de l'autofàgia en la en el glioblastoma multiforme

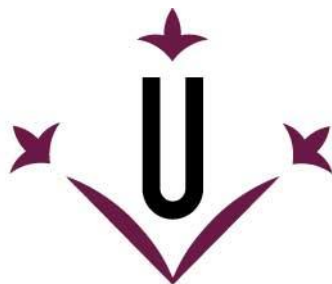
Marta Crespí Sallán

<http://hdl.handle.net/10803/460804>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Implicació dels canals de calci de tipus T en la regulació de l'autofàgia en el glioblastoma multiforme

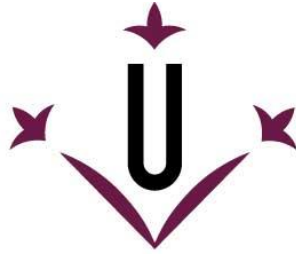
Marta Crespí Sallán

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Director/a
Carles Cantí Nicolás
Judit Herreros Danés

Tutor/a
Carles Cantí Nicolás

2017



Universitat de Lleida

Carles Cantí Nicolás i Judit Herreros Danés, Doctors en Ciències Biològiques, investigadors i professors agregats del Departament de Medicina Experimental i de Ciències Mèdiques Bàsiques, respectivament, de la Universitat de Lleida, com a directors de la present tesi,

Fem constar que,

La llicenciada en Biologia i Bioquímica per la Universitat de les Illes Balears, **Marta Crespí Sallán**, ha realitzat sota la nostra direcció i supervisió dins del grup de Senyalització per calci, el treball experimental titulat “**Implicació dels canals de calci de tipus T en la regulació de l'autofàgia en glioblastoma multiforme**”.

El treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s'escau, obtenir el grau de **Doctora** per la Universitat de Lleida.

I perquè així consti i als efectes oportuns signo el present document a Lleida, 16 de novembre de 2017

Dra. Judit Herreros Danés

Dr. Carles Cantí Nicolás

A mun pares i sa meva germana

Yayos, Milagros i Marisilla

A n'Oscar

RESUMS

RESUM

La present tesi estudia el paper dels canals de calci de tipus T (TT-CC) en la modulació de l'autofàgia en línies cel·lulars de glioblastoma (GBM), línies cel·lulars de GBM quimioresistent generades al nostre laboratori i, biòpsies de pacients (GBM primaris i recurrències). Els TT-CC van ser identificats en la dècada dels 70. No obstant, en els últims anys han adquirit importància en el camp de la investigació bàsica del càncer degut a que regulen la capacitat proliferativa i la supervivència cel·lular, motiu pel qual destaquen com a potencials dianes (de noves molècules o en la reutilització de medicaments orfes) per al tractament de tumors sòlids, com el GBM.

El GBM és un tipus de tumor cerebral astrocitari (grau IV de malignitat segons la OMS) de mal pronòstic, caracteritzat per un ràpid creixement i amb un patró histopatològic comú a tots els tumors d'aquesta índole que revela àrees necròtiques, zones d'elevada densitat cel·lular (zones de pseudopaliçada-hipòxiques) seguides d'extensions cel·lulars properes a vasos (riques en oxigen i nutrients).

Els nostres resultats demostren que en condicions normòxiques les cèl·lules de GBM expressen de forma predominant la isoforma Cav3.1, mentre que en condicions hipòxiques és Cav3.2 qui adquireix tot el protagonisme. A més, hem observat una tendència a l'increment de l'expressió dels TT-CC en biòpsies de GBM recurrent comparat a les de GBM primari, que es confirma en un model cel·lular *in vitro* de GBM quimioresistent.

Addicionalment, hem trobat que la aplicació *in vitro* dels bloquejants de TT-CC, Mibefradil (medicament orfe) i NNC-55-0396 (derivat de Mibefradil), inhibeixen la proliferació, desregulen la macroautofàgia i finalment indueixen mort cel·lular per apoptosi. De forma interessant, hem observat una sensibilitat major de les cèl·lules de GBM als bloquejants de TT-CC en condicions hipòxiques tan en cultius 2D com 3D (càmeres microfluídiques). Finalment hem demostrat, a través del silenciament gènic, que cadascuna de les isoformes exerceix un efecte diferencial sobre l'autofàgia en GBM relacionant positivament l'expressió de Cav3.1 amb la proteïna pro-autofàgica p62, encarregada de reclutar el *cargo* a degradar dins de l'autofagosoma. Per tant, suggerim un mecanisme d'acció en el que Cav3.1 podria actuar com a regulador transcripcional de p62, situant-lo en una posició estratègica en la regulació de l'autofàgia.

Conjuntament, els resultats obtinguts apunten als TT-CC com a possibles marcadors pronòstics i/o dianes terapèutiques en GBM, més enllà de la implicació en proliferació cel·lular.

RESUMEN

La presente tesis estudia el papel de los canales de calcio de tipo T (TT-CC) en la modulación de la autofagia en líneas celulares de glioblastoma, biopsias de pacientes (GBM primarios y recurrencias) y líneas celulares quimioresistentes generadas en nuestro laboratorio. Los TT-CC fueron identificados en la década de los 70. No obstante, en los últimos años han cobrado importancia en el campo de la investigación básica del cáncer puesto que regulan la capacidad proliferativa y la supervivencia celular. Esto ha motivado su propuesta como potenciales dianas (en el diseño de nuevas moléculas o la reutilización de medicamentos huérfanos) para el tratamiento tumores sólidos, como el GBM.

El GBM es un tipo de tumor cerebral astrocitario (grado IV de malignidad según las OMS) de mal pronóstico caracterizado por un rápido crecimiento y con un patrón histopatológico común a todos los tumores de esta índole que revela áreas necróticas, zonas de elevada densidad celular (zonas de pseudopalizada-hipóxicas), seguidas de extensiones celulares cercanas a vasos (ricas en oxígeno y nutrientes).

Nuestros resultados demuestran que en condiciones normóxicas las células de GBM expresan de forma predominante la isoforma Cav3.1, mientras que en condiciones hipóxicas es la isoforma Cav3.2 quien adquiere el protagonismo. Además, hemos observado una tendencia hacia el incremento de la expresión de los TT-CC en biopsias de GBM recurrente comparado a las de GBM primario, resultado que se confirma en un modelo celular de GBM quimioresistente.

Adicionalmente, hemos observado que la aplicación *in vitro* de los bloqueantes de TT-CC, Mibefradil (un medicamento huérfano) y NNC-55-0369 (un derivado del Mibefradil), inhiben la proliferación, desregulan la macroautofagia y finalmente inducen la muerte celular. De forma interesante, hemos observado una sensibilidad celular mayor a los bloqueantes de TT-CC en condiciones hipóxicas, tanto en cultivos 2D como 3D (cámaras microfluídicas). Finalmente hemos demostrado, a través del silenciamiento génico, que cada una de las isoformas ejerce un efecto diferencial sobre el proceso de la autofagia en GBM, relacionando positivamente la expresión de Cav3.1 con la proteína autofágica p62, encargada de reclutar el *cargo* a degradar dentro del autofagosoma. Así, sugerimos un modelo en el que Cav3.1 podría actuar como regulador transcripcional de p62, situándolo en una posición estratégica en la regulación de la autofagia.

En conjunto, los resultados obtenidos apuntan a los TT-CC como posibles marcadores pronósticos y/o dianas terapéuticas en GBM, más allá de su implicación en proliferación celular.

SUMMARY

The focus of this doctoral thesis has been to study the role of the T-type calcium channels (TT-CC) in the modulation of autophagy in glioblastoma cell lines, biopsies from patients (primary GBM and recurrences) and chemoresistant cell lines generated in our laboratory. TT-CC were identified in the 70s. However, in recent years they have gained importance in the field of cancer research because of their capability to regulate cell proliferation and survival. Thus, they could be potential targets for the treatment of solid tumors, as GBM.

GBM is an astrocytic brain tumor (grade IV of malignancy, according to WHO) with poor prognosis. GBM is characterized by fast growth and a histopathological pattern including necrotic areas, hyper-cellularized (hypoxic) zones, surrounded by cells in the proximity of blood vessels (oxygen and nutrient rich).

Our results show that in normoxic conditions GBM cells predominantly express the isoform Cav3.1, whereas Cav3.2 plays a leading role under hypoxic conditions. Moreover, we have observed a trend indicating that the expression of TT-CC increases in recurrent GBM compared to primary GBM biopsies, also confirmed in a chemoresistant GBM cellular model.

Additionally, we have found that TT-CC blockers, Mibefradil (an orphan medicine) and NNC-55-0396 (a compound derived from Mibefradil), inhibit cell proliferation, dysregulate autophagy and lead to cell death in GBM. Interestingly, we have observed a higher sensitivity to TT-CC blockers in hypoxic conditions in 2D cell cultures and also in 3D cell cultures (microfluidic chambers). Finally, we have demonstrated through TT-CC gene silencing a differential role of the TT-CC isoforms in the autophagic process in GBM. These results link Cav3.1 with the expression of the pro-autophagic protein p62, which acts as a cargo receptor in the autophagosome. Therefore, we suggest a possible mechanism by which Cav3.1 could act as a transcriptional regulator of p62, placing Cav3.1 in a strategic position as an autophagic regulator.

Altogether, the results attained in this doctoral thesis point to T-type Ca^{2+} channels as putative prognosis markers and therapeutic targets in GBM.

ABREVIATURES

Abreviatures

A		eIF2 α	Factor eucariòtic d'Iniciació 2 α
AECC	Associació Espanyola Contra el Càncer	EMT	Transició Epiteli- Mesènquima
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	ERAD	<i>Endoplasmic Reticle Associated Degradation</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor-6</i>	F	
Atgs	<i>Autophagy related genes</i>	FAM	<i>Green fluorescent fluorophore 6- carboxyfluorescein</i>
ATP	Adenosina Trifosfat	FBS	Sèrum Fetal Boví
B		FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
BHE	Barrera Hematoencefàlica	FIP200	<i>Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa</i>
BNIP3	<i>BCL2 Interacting Protein 3</i>	G	
BSA	Albúmina de Serum Boví	GABRA1	<i>Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1</i>
C		GAPDH	Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa
Ca ²⁺	Calci	GBM	Glioblastoma
CA9	Anhidrasa Carbònica 9	GICs	Cèl·lules iniciadores de glioma
CAMKK β	<i>Calcium/calmodulin- dependent protein kinase kinase β</i>	Grp78	<i>Glucose-regulated protein</i>
CaM	Calmodulina	H	
CCBs	<i>Calcium Channels Blockers</i>	HIFs	Factors Induïts per Hipòxia
CDK	Ciclins Dependents de Kinases	HUAV	Hospital Universitari Arnau de Vilanova
CRE	<i>AMP response element</i>		
Ct	<i>Cycle threshold</i>		
D			
DMSO	Dimetil Sulfoxid		
E			
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>		

Abreviatures

HVACC	<i>High Voltage Gated Calcium Channels</i>	NIC	<i>National Cancer Institute of Canada</i>
		NRB1	<i>Neurabin-1</i>
I			
ICQ	Immunocitoquímica	O	
IDH1	<i>Isocitrate Dehydrogenase 1</i>	OLIG2	<i>Oligodendrocyte Transcription Factor 2</i>
IgE	Inmunoglobulina E	OMS	Organització Mundial de la Salut
IP3-R	<i>Inositol trisphosphate receptor</i>		
IRE1	<i>Inositol-Requiring Enzyme 1</i>		
L			
LB	Luria-Bertani	PBS	Tampó Fosfat Salí
LC3	<i>Autophagic mamífer ATG8 protein</i>	PDGFRA	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>
LKB	<i>Liver kinase B1</i>	PDK	<i>Phosphatidylinositol dependent kinase</i>
LVACC	<i>Low Voltage Activated Calcium Channels</i>	PERK	<i>Pancreatic ER kinase</i>
M			
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>	PH	<i>Pleckstrin-homology</i>
MGMT	O6-metilguanina-DNA-metiltransferasa	PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
MTIC	<i>imidazole-4-carboxamide</i>	PIP2	Fosfatidilinositol-3,4,5-difosfat
mTORC1	<i>mammalian Target of Rapamycin Complex-1</i>	PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
MTT	<i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>	PS	Fosfatidilserina
N			
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>	PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
NEAA	Aminoàcids No Essencials	R	
NEFL	<i>Neurofilament Light</i>	RC1	<i>Resistant Cell line 1</i>
NF1	<i>Neurofibromin 1</i>	RC2	<i>Resistant Cell line 2</i>
		RE	Reticle Endoplasmàtic
		REDD1	<i>Regulated in development and DNA damage response 1</i>
		REL	RE Llis
		RER	RE Rugós

Abreviatures

RM	Ressonància Magnètica	TMZ	Temozolomida
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
RT	Radioteràpia	TPR	<i>Transient Receptor Potential</i>
RT	Transcripció Reversa	TRAF6	Factor de Necrosi Tumoral Associat al Receptor
RT-qPCR	PCR quantitativa en Temps Real	TT-CC	<i>T-Type Calcium Channels</i>
RyRs	<i>Ryanodine receptors</i>		
S		U	
SLC12A5	<i>Solute Carrier Family 12 Member 5</i>	ULK 1/2	<i>Unc-51-like kinase 1/2</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>	UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
SNC	Sistema Nerviós Central	V	
SOCE	<i>Store-operated Ca²⁺ entry</i>	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
SQSTM1	<i>Sequestome-1</i>	VGCC	<i>Voltage Gated Calcium Channels</i>
STX17	<i>Syntaxina-17</i>		
SYT1	<i>Synaptotagmin 1</i>	W	
T		WB	<i>Western Blot</i>
TAC	Tomografia Axial Computeritzada	X	
TFEB	Factor de Transcripció EB	XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>		
TICs	Cèl·lules iniciadores de tumor cerebral		

ÍNDEX

ÍNDEX

RESUMS	XIII
ABREVIATURES	XXI
INTRODUCCIÓ.....	1
1. TUMORS CEREBRALS	3
1.1 Classificació dels tumors astrocítics	3
1.2 Epidemiologia del GBM	7
1.3 Origen del glioblastoma	9
1.4. Biologia del glioblastoma	10
1.5 Tractament	13
2. AUTOFÀGIA.....	15
2.1 Homeostasi cel·lular	15
2.2 Estrés de Reticle	16
2.3 Macroautofàgia	20
2.4 Autofàgia en càncer.....	26
3. CANALS DE CALCI DE TIPUS T	33
3.1 Homeostasi del calci i la seva rellevància en càncer	33
3.2 Canals de calci de tipus T (TT-CC)	34
3.3 Implicació dels TT-CC en l'estrés de RE i l'autofàgia	40
HIPÒTESI I OBJECTIUS	45
MATERIALS I MÈTODES	49
1. Cultius cel·lulars 2 dimensions (2D)	51
2. Cultius cel·lulars en 3 dimensions (3D)	54
3. Tècniques de DNA recombinant	57
4. Anàlisi de l'expressió gènica	59
5. Anàlisi de l'expressió de proteïnes	60
6. Assaigs de proliferació i de viabilitat cel·lular	62
7. Tècniques d'imatge.....	65
8. Altres tècniques.....	66
9. Materials.....	67
RESULTATS	71
1.1 Els TT-CC es troben expressats en Astrocitomes, GBM primari i GBM recurrent	73
1.2 Establiment i validació de les línies resistents a TMZ generades a partir de la línia de GBM A172.....	78
1.3 L'expressió de TT-CC en GBM es regula per normòxia/hipòxia	82

1.4 Els TT-CC són indispensables per a la supervivència de les cèl·lules de GBM	84
1.5 El silenciament gènic dels TT-CC desregula el flux autofàgic en GBM.....	90
1.6 El silenciament dels TT-CC implica les vies AMPK i mTOR	95
1.7 Els bloquejants farmacològics de TT-CC condueixen a la desregulació de l'autofàgia....	96
1.8 El bloqueig dels TT-CC condueix a l'elevació dels nivells de calci citoplasmàtics afectant les vies AMPK/mTOR/ AKT i produint en última instància la translocació nuclear de TFEB..	97
1.9 La combinació de NNC-55-0396 i cloroquina disminueix la viabilitat cel·lular a concentracions baixes de NNC-55-0396	102
1.10 La hipòxia induïx l'autofàgia i afavoreix la translocació nuclear de TFEB.....	103
1.11 El bloqueig dels TT-CC en condicions d'hipòxia produeix la degradació de HIF 1 α	104
1.12 Els cultius tridimensionals organitzats en càmeres microfluídiques revelen que les cèl·lules de GBM en les zones hipòxiques són més sensibles al bloqueig dels TT-CC	105
DISCUSSIÓ	109
CONCLUSIONS	121
BIBLIOGRAFIA.....	127
ANNEX I.....	147

INTRODUCCIÓ

1. TUMORS CEREBRALS

El sistema nerviós central (SNC) consta de neurones i cèl·lules neurogials (astròcits, oligodendròcits, cèl·lules endodimais i la microglía).

Les cèl·lules neurogials o glia s'han descrit com a cèl·lules de sosteniment de les neurones. Encara que les cèl·lules de la glia no participen directament en la transmissió de senyals elèctrics a llarga distància, actuen aportant nutrients, suport mecànic, orientació en el desenvolupament neuronal, a més tenen un rol important en la immunologia del teixit i l'eliminació de residus per les neurones (Silverthorn et al., 2008). Des de començament del segle XXI és acceptat que les cèl·lules gials funcionen associades amb les neurones en processos complexos com la transducció de senyals (Gourine et al., 2010) i la neurotransmissió (Wolosker et al., 2008).

Tot i que les neoplàsies poden sorgir de components tant neuronals com gials del SNC, els tumors de la glia (o gliomes) són molt més importants tant en termes de freqüència com de malignitat.

Els tumors gials es classifiquen en tres grups: astrocitomes, oligodendrogliomes i endinomes segons la similaritat morfològica amb els astròcits, oligodendròcits i les cèl·lules endodimais, respectivament. Addicionalment, hi ha un quart grup anomenat "glioma mixte": tumors que contenen més d'un tipus de cèl·lula morfològicament distingible (Ballester et al., 2017; Louis et al., 2016). D'uns anys ençà, no obstant, ha pres força la hipòtesi que els gliomes s'origen en cèl·lules mare neurals que comparteixen antígens astrocitaris (Alcantara-Llaguno et al., 2016).

1.1 Classificació dels tumors astrocítics

Fins ara la Organització Mundial de la Salut (OMS) ha classificat els tumors astrocítics basant-se només en el diagnòstic histopatològic. A partir de l'any 2016 es van incorporar a aquesta classificació algunes alteracions genètiques proporcionant més informació per al diagnòstic i coneixement més ampli del desenvolupament de la malaltia (Ballester et al., 2017).

Introducció

1.1.1 Classificació histopatològica

La OMS classifica els astrocitomes segons el grau de malignitat del tumor (I a IV en ordre de malignitat creixent) (Louis et al., 2016; Ballester et al., 2017). El grau de malignitat ve determinat pel grau de diferenciació del tumor, la cel·lularitat, nuclis atípics, activitat mitòtica, proliferació microvascular, alteracions genètiques i presència de necrosi (Louis et al., 2016).

Astrocitomes de grau I o pilocítics: tumors benignes, de baix potencial proliferatiu amb àmplies garanties d'èxit després de la resecció quirúrgica.

Astrocitomes de grau II o difusos: inclouen lesions infiltrants amb cèl·lules amb baixa activitat mitòtica. Tot i que el pronòstic no és fatal, el grau d'infiltració que presenten, tot i que discret, fa impossible la resecció quirúrgica completa.

Astrocitomes de grau III o anaplàsics: presenten lesions amb evidències histològiques de malignitat com són atípia nuclear i augment de l'activitat mitòtica acompanyat d'un procés anaplàsic i alta capacitat d'infiltració en el teixit adjacent.

Astrocitomes grau IV o glioblastomes multiformes (GBMs): exhibeixen característiques més avançades de malignitat que inclouen la proliferació vascular i àrees necròtiques amb nuclis atípics i elevada activitat mitòtica (Louis et al., 2016).

Els GBMs poden ésser subdividits en dos subtipus GBM primari, que apareix *de novo* sense cap lesió prèvia i GBMs *secundaris* que evolucionen des de tumors astrocítics (fins arribar a grau IV). Aquesta distinció dels GBMs només pot fer-se a nivell genètic ja que presenten les mateixes característiques histopatològiques (Wesseling et al., 2015).

1.1.2 Classificació molecular del GBM

L'expansió de l'anàlisi genòmica ha permès realitzar una classificació dels GBM basada en criteris moleculars, que permet conèixer quina resposta tindrà el pacient front a la teràpia i el llinatge neural a partir del qual s'ha desenvolupat el tumor. També distingir entre un GBM *de novo* i un GBM *secundari*; així doncs aberracions en l'expressió dels gens *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), *Neurofibromin 1* (NF1) i *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha* (PDGFRA) i *Isocitrate Dehydrogenase* (IDH1) defineixen diferents subtipus de glioblastoma (neural, proneural, classic i mesenquimal) (**Fig 1**) (Ford et al., 2010).

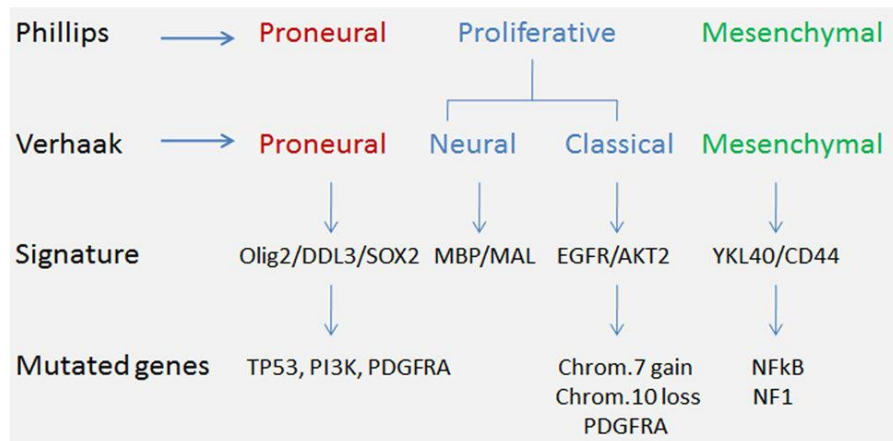


Figura 1. Subtipus de GBM basats en les classificacions de Phillips i Berhaak. La classificació molecular inclou quatre subtipus de GBM, es basa en els perfils d'expressió gènica diferencial (Verhaak et al., 2010).

Neural: el subtipus neural va ser catalogat per l'expressió de marcadors neuronals com *Neurofilament Light* (NEFL), *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha* (GABRA1), *Synaptotagmin 1* (SYT1) i *Solute Carrier Family 12 Member 5* (SLC12A5) (Wesseling, van den Bent, and Perry 2015).

Proneural: presenta amplifícacions i mutacions en el gen PDGFRA, mutacions puntuals en el gen IDH1 (Noble et al., 2004), mutacions i pèrdua de heterozigositat en Tp53, un increment en l'expressió de *Oligodendrocyte Transcription Factor 2* (OLIG2) que s'ha descrit com un regulador negatiu del supressor tumoral p21 (CDKN1A) i per tant adquirint un major potencial proliferatiu (Ligon et al., 2007). El llinatge proneural també presenta expressió de gens de desenvolupament proneural com són SOX i TCF4 (Verhaak et al., 2010).

Clàssic: presenta elevats nivells d'amplificació del gen EGFRVIII i mutacions al gen Tp53 éssent aquest el gen més mutat en GBM, coexistent amb aberracions d'altres components de la ruta Retinoblastoma (RB), com ara RB1, CDK4 i CCDN2. Les vies de senyalització de precursors neuronals i de les cèl·lules mare neuronals així com elements de les vies de senyalització de Notch (NOTCH3, JAG1, LFNG) i Sonic Hedgehog (SMO, GAS1, GLI2) es troben sobreexpressades en aquest subtipus (Verhaak et al., 2010).

Mesenquimal: es caracteritza per presentar delecions en NF1 i baixos nivells d'expressió de la proteïna NF1 que juntament amb mutacions a PTEN (Phosphatase and tensin homolog) provoquen interferències a la via AKT. Trobem marcadors astrocítics i mesenquimals (CD44, MERTK) (Thiery et al., 2002). Gens de la família del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) es troben especialment

Introducció

sobreexpressats (TRADD, RELB, TNFRSF1A) obtenint en general una major necrosi i infiltrats inflamatoris (Verhaak et al., 2010).

L'associació clínica més consistent per aquesta classificació basada en la genètica del tumor és l'edat del pacient; els classificats com a proneurals eren majoritàriament associats a pacients més joves (Murat et al., 2008).

L'únic marcador molecular predictiu que s'ha associat amb una millor resposta al tractament amb l'agent alquilant (utilitzat com a quimioterapeuic temozolomida (TMZ)) és la hipermetilació del promotor de l'enzim associat al silenciament transcripcional del gen MGMT (Wesseling, van den Bent, and Perry 2015) capaç de reparar el dany induït per TMZ. Malgrat això, s'allarga la supervivència en pocs mesos.

Per altra banda, mutacions en el gen que codifica per IDH1 permeten distingir entre GBM *de novo*, habitualment IDH1 *wild type*, i GBM secundari on normalment el trobem mutat i és alhora indicatiu de pronòstic favorable ja que els pacients presenten una major taxa de supervivència (Liu et al., 2016). Mutacions als gens EGFRVIII, Tp53, CDKN2A presenten patrons diferencials entre el GBM *de novo* i secundari (**Taula1**).

Mutació	GBM <i>de novo</i>	GBM secundari
TP53	Wild type	Mutat
EGFR	Amplificat	No amplificat
PTEN	Mutat	Wild type
Cromosoma 10	Pèrdua total	Wild type
19q	Wild type	Pèrdua
CDK2NA	Del.leció bial.lèlica	Wild type
IDH1	Wild type	Mutat

Taula 1. Relació del tipus de GBM i gens alterats. Extret de Liu et al., (2016).

S'observa un patró genètic diferencial entre els glioblastomes que apareixen *de novo* dels que esdevenen a partir d'un astrocitoma de baix grau o GBM secundaris (Ohgaki and Kleihues 2013), indicant que es desenvolupen a través de vies genètiques diferents (Ohgaki et al., 2004; Ohgaki and Kleihues 2007).

1.2 Epidemiologia del GBM

Encara que el GBM és un tumor que presenta una baixa freqüència (la incidència global és de 10 malalts per cada 100.000 habitants), és el tumor cerebral més comú. El seu pronòstic és fatal, amb una taxa mitjana de supervivència de 14.5 mesos (Hanif et al., 2017) (**Fig 2**).

S'observa un increment de l'incidència dels gliomes amb l'edat; les raons biològiques són a dia d'avui desconegudes, essent el pic màxim d'aparició entre els 55-60 anys. L'observació reflexa també que els GBM secundaris es desenvolupen en pacients més joves, amb una mitjana d'edat de 45 anys i són més comuns en homes amb un ratio home/dona que varia entre 1.28 i 1.32 (Ohgaki and Kleihues 2013).

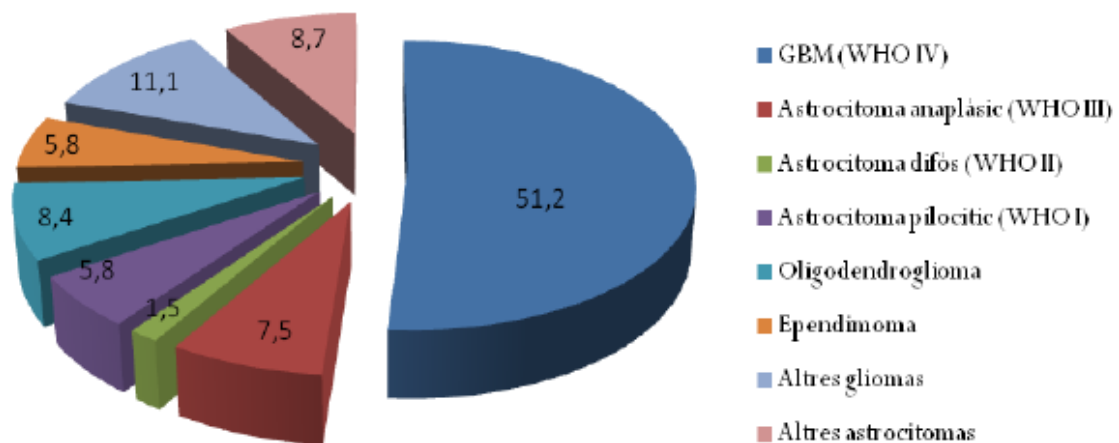


Figura 2. Incidència dels diferents tumors cerebrals. Extret de Wesseling et al., (2015).

La incidència de tumors cerebrals en els Estats Units d'Amèrica entre 2007 i 2011 va ésser de 21 persones cada 100.000 habitants; d'aquestes la meitat van ésser diagnosticades amb GBM. Si es compara amb la incidència de tumors cerebrals al Japó s'observa que és menys de la meitat que als Estats Units i Europa (Weller et al., 2015). A Espanya, la Associació Espanyola Contra el Càncer (AECC) presenta xifres de 7.5 malalts per cada 100.000 habitants, que suposa al voltant d'un 2% de la població adulta. No hi ha dades conclouents que facin sospitar que pugui haver augmentat la incidència dels tumors cerebrals en les últimes dècades (Fuentes-Raspall et al., 2017).

Introducció

1.2.1 Factors de risc

Els coneixements sobre els factors ambientals que afavoririen el desenvolupament d'una neoplasia cerebral són limitats; només s'ha demostrat l'exposició a elevades dosis de radiació ionitzant com a factor de risc (Hanif et al., 2017). Altres factors com al·lèrgia i l'increment de immunoglobulina E (IgE), la infecció per citomegalovirus, síndromes familiars com la Neurofibromatosi tipus 1 que s'associa a astrocitomes pilocítics i Neurofibromatosi tipus 2 relacionada amb ependimomas i astrocitomes subependimals de cèl·lules gegants, s'han suggerit com a probables factors, tot i que no s'ha demostrat una associació. Pacients diagnosticats amb síndroms de Fraumeni o Turcot, ambdues malalties hereditàries que es caracteritzen per presentar mutacions en gens supressors tumorals, TP53 en el cas del síndrom de Fraumeni i APC en el síndrom de Turcot, característica que fa a aquests pacients més propensos a desenvolupar gliomes, meduloblastomes i càncer de colon (Weller et al., 2015).

1.2.2 Clínica

Els signes i símptomes més comuns als pacients amb GBM són mals de cap progressius i símptomes derivats de la pressió intracranial que pot produir somnolència, a mesura que el tumor augmenta de tamany. Més específicament i depenent de la localització poden aparèixer dificultats per parlar, dèficit de camp visual, pèrdua de força i convulsions (Kanu et al., 2009).

Detecció

Si es sospita que el pacient pot estar desenvolupant un tumor cerebral es procedeix a la realització d'una ressonància magnètica (RM) amb l'objectiu de determinar la localització, extensió i relació amb estructures properes de la massa tumoral.

El GBM apareix com una massa amb una millora del contrast a causa de la interrupció parcial de la barrera hematoencefàlica; a més s'observa un contorn irregular que envolta un centre necròtic més fosc i un àrea peritumoral hipodensa (Vanden Berghe et al., 2010)(**Fig 3**).

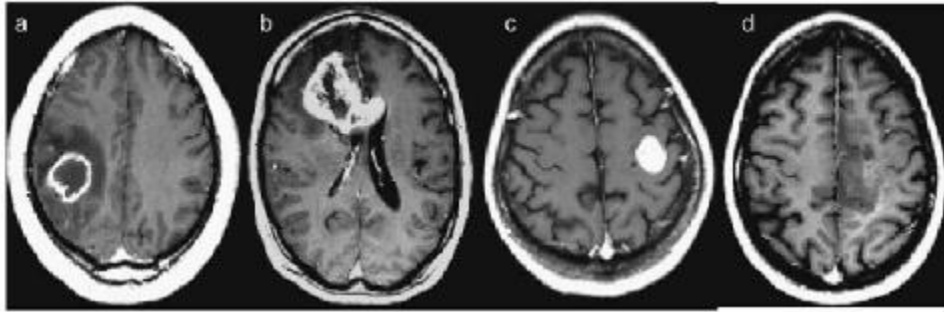


Figura 3. Heterogeneïtat i diversitat anatòmica de lesions per GBM. Es poden observar imatges de resonància magnètica del cervell de quatre pacients amb GBM. a) Massa amb necrosi central al lòbul parietal dret amb edema al voltant. b) Massa irregular que travessa el cos callós amb un centre necròtic. c) Massa circumscrita homogeniament al lòbul dret i sense edema. d) Massa infiltrativa no definida en el lòbul frontal esquerre sense necrosi apreciable (Hanif et al., 2017).

Localització

Els GBM es poden trobar arreu del SNC, incloent el cerebel, tronc cerebral i medulla espinal; trobant-se en major freqüència en el lòbul frontal o bé al lòbul temporal (Kanu et al., 2009). S'ha trobat una preferència pel lòbul frontal de l'astrocitoma de grau II que porta la mutació IDH1/2, que pot evolucionar cap a GBM o tumors oligodendroglials (Stockhammer et al., 2012). Aquestes observacions suggereixen que els oligodendrogliomes, astrocitomes i GBMs poden originar-se preferentment a partir de cèl·lules precursor localitzades o bé migrades cap al lòbul frontal (Ohgaki and Kleihues 2013).

1.3 Origen del glioblastoma

La manca d'informació sobre la gènesi cel·lular d'aquests tumors impossibilita fer una predicció sobre la seva evolució i tractament.

El conflicte amb les cèl·lules iniciadores del tumor radica en que mai s'ha arribat a provar adequadament el mecanisme de gliomagènesi a partir de glia diferenciada, a més el concepte de desdiferenciació de glia madura és molt qüestionable i sobretot i més important, no és capaç d'explicar l'origen d'alguns tipus de glioma, sí els astrocitomes de graus I i II que amb els anys evolucionen cap astrocitomes de grau III o IV però no el GBM *de novo* (Sanai, Alvarez-Buylla, and Berger 2005).

Introducció

Des que l'any 1994 Singh et al., (2004) aïllessin cèl·lules mare canceroses (CSC, de l'anglès Cancer Stem Cells) de leucèmia mieloide aguda, un major nombre d'investigacions indiquen que només una petita població de cèl·lules gials malignes tenen potencial tumorogènic. Es creu que aquesta població cel·lular anomenada cèl·lules iniciadores de glioma (GICs), cèl·lules iniciadores de tumor cerebral (TICs) o cèl·lules mare de glioma són les causants de la iniciació, propagació i recurrència dels tumors. Les seves característiques són capacitat de regenerar el tumor, proliferació mantinguda i elevat potencial oncogènic gràcies a la seva capacitat de resistència als tractaments (Zhuang et al., 2011).

S'ha trobat a biòpsies de GBM derivats de pacients cultivats *in vitro*, cèl·lules que expressen marcadors de cèl·lules mare o progenitors (CD133, Sox2, Musashi, Nestin). Per tant dins la heterogènia població cel·lular que conforma el GMB, trobem cèl·lules mare que han sofert mutacions a gens com ara Nf1 i Trp53 que els han proporcionat característiques diferents a les cèl·lules progenitores neurals (Morokoff et al., 2015; Ricci-Vitiani et al., 2008).

Un altre punt a tenir en compte és l'ambient hipervascularitzat que rodeja les GICs, el qual s'ha descrit com imprescindible per al manteniment de les característiques d'aquesta població cel·lular. A més aquesta hipervascularització és distintiva a nivell histopatològic del GBM; Rooset al., (2017) va evidenciar la relació funcional entre la vascularització tumoral i les funcions de les GICs mostrant que nivells elevats de producció de *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) per cèl·lules de GBM CD133⁺ contribuïen a la capacitat d'iniciar el tumor. A més utilitzant cèl·lules GBM CD133⁺ però no GBM CD133⁻ van ésser capaces de crear un tumor altament vascularitzat i hemorràgic en cervells de ratolins immunodeprimits, donant valor a la hipòtesi de les GIC com a iniciadores del tumor, a més de reforçar la idea de que el nínxol perivascular els ajuda a mantenir les seves característiques (Gilbertson & Rich et al., 2007; Singh et al., 2004).

1.4. Biologia del glioblastoma

1.4.1 Hipòxia i angiogènesi

Els GBM presenten un alt grau d'angiogènesi, proliferació microvascular, vasos pleomòrfics, resistència a l'apoptosi i necrosi a la pseudopaliçada, àrea que es caracteritza per tenir una elevada densitat cel·lular típicament rodejada de cèl·lules necròtiques, a més es sap que les cèl·lules que componen aquesta estructura tan comú del GBM secreten elevats nivells de factors proangiogènics que promouen el creixement del tumor (Brat et al., 2004). Aquesta morfologia es dona per l'existència de regions hipòxiques que contribueixen a aquest fenotip altament proliferatiu i

maligne. Les cèl·lules que es troben a les regions hipòxiques han estat descrites com les causants de la resistència a la quimio i radioteràpia ja que estan també protegides per la vasculatura desenvolupada potenciada per l'ambient hipòxic (Huang et al., 2016).

En els GBM trobem una elevada expressió de VEGF, enzims glicolítics, *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) i una àmplia varietat de gens de resposta a la hipòxia essencials per a la homeòstasi i creixement del tumor. En GBM la hipòxia i els Factors Induïts per Hipòxia (HIFs) ajuden a la resistència als agents quimioterapèutics i radioteràpia facilitant la metastasi, recurrència tumoral i el manteniment de la població de GIC (Yang et al., 2012).

L'angiogènesi és necessària per al creixement del tumor; a nivell molecular l'èxit d'aquest procés està relacionat amb una sobreexpressió de VEGF que està regulat pels nivells d'oxigen tant en cèl·lules normals com tumorals. El principal factor de transcripció en la sobreexpressió de VEGF és HIF1α implicat en la inducció d'angiogènesi i resistència als tractaments en GBM. El ràpid creixement del tumor requereix d'un aport d'oxigen que es tradueix en un major grau d'hipòxia afavorint l'angiogènesi per proveir d'oxigen a les cèl·lules la seva supervivència i creixement (Fischer et al., 2005).

S'ha descrit una major expressió dels factor HIF1α en les cèl·lules que conformen la pseudopaliçada al voltant de les àrees necròtiques i en zones d'infiltració en teixit cerebral sa. Aquest factor de transcripció sobreregula l'enzim anhidrasa carbònica 9 (CA9) en GBM que resulta en una acidificació del microambient tumoral conduint a l'adquisició de potencial invasiu. A més la hipòxia condueix a la transcripció de gens com Notch1, un increment en l'activació de calcineurina i NFAT que ajuden al GBM a esdevenir més proliferatiu i agressiu (Chigurupati et al., 2010; Yang et al., 2012).

1.4.2 Recurrència en el GBM

La resistència pot ser intrínseca al tumor o bé adquirida en el decurs de la malaltia com a conseqüència de la selecció que exerceixen els tractaments quimioterapèutics. Són varis els mecanismes que participen en la resistència dels GBMs als diferents tractaments entre els que tenim, (1) alteració del transport i disminució de la retenció cel·lular del fàrmac, (2) bloqueig de vies de senyalització inductores d'apoptosi, i (3) heterogeneïtat cel·lular.

Introducció

Alteració del transport i disminució de la retenció del fàrmac

La barrera hematoencefàlica (BHE) és un mecanisme selectiu que s'oposa al pas de a majoria de molècules grans al teixit cerebral. Permet el pas de substàncies com la glucosa, ions, oxigen i molècules lipofíliques de baix pes molecular; aquest aïllament del teixit cerebral és el factor responsable de que molts quimioterapèutics siguin poc efectius per al GBM tot i que s'ha demostrat que la BHE pot trobar-se alterada en processos patològics (Dauchy et al., 2008).

Malgrat molt fàrmacs antineoplàstics compleixen els requisits de poder travessar la BHE, les pròpies cèl·lules canceroses sobreexpressen transportadors del tipus ABC, que contribueixen en gran mesura a l'adquisició d'un fenotip resistent mitjançant l'extrusió d'aquestes molècules, resultant la disminució de la concentració intracel·lular del fàrmac (Lu and Shervington 2008).

Bloqueig de vies de senyalització inductores d'apoptosi

Una altre de les vies involucrades en el mecanisme de resistència al tractament és resistència a l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi. Un dels mecanismes és a través del segrest en el citoplasma de la proteïna PUMA, no poguent translocar al mitocondri on activaria la cascada de senyalització per iniciar l'apoptosi (Zhu et al., 2010). També són freqüents les mutacions en proteïnes de la via p53, impossibilitant l'activació d'aquesta ruta i evitant d'aquesta manera l'apoptosi (Li et al., 2017).

Heterogeneïtat cel·lular

Les GICs constitueixen una petita població dins la heterogeneïtat que presenta el GBM. Degut a les seves característiques han estat considerades com a responsables de la reaparició del tumor després del tractament de primera línia i, per tant, de la recurrència. La incapacitat de les teràpies actuals per eliminar subpoblacions de GICs és considerada com un factor important per al desenvolupament de recurrència en pacients amb GBM (Auffinger et al., 2015).

Les GICs poden resistir la radiació gràcies a l'activació del control de dany al DNA, resposta que incrementa la capacitat de reparació del DNA i que es troba hiperactivada en cèl·lules CD133⁺ en comparació a les GBM CD133⁻. A més la radiació gamma induïx autofàgia en les cèl·lules de glioma contribuint l'activació d'aquesta via a la radioresistència tumoral del GBM (Liu et al., 2017). Les GIC també han estat relacionades amb la capacitat del tumor de migrar. (Chen et al., 2017).

1.5 Tractament

1.5.1 Tractaments de primera línia

Cirurgia

El tractament inicial del GBM és la cirurgia que permet obtenir material per al diagnòstic histològic i aconseguir alhora una descompressió immediata del cervell. L'objectiu és realitzar la màxima resecció respectant la funció neurològica. En el cas que no es pugui efectuar la resecció es realitza una biòpsia (Lacroix et al., 2001; McGirt et al., 2009).

Radioteràpia

Segons l'estàndard d'actuació en els GBM és recomanable la radioteràpia (RT) aproximadament entre la segona i la quarta setmana després de la cirurgia. Les dosis són de 60 Gy sobre un volum i àrea del tumor (amb un marge de 2 cm) determinat per ressonància magnètica (RM) i TAC (tomografia axial computeritzada). Només les zones on la irradiació suposi un risc de disfunció, com pot ésser al quiasma òptic o estructures oculars, la dosi s'administra en fraccions de 1.8-2.0 Gy cinc vegades a la setmana.

La irradiació post-operatòria ha estat fins avui l'opció escollida després de demostrar un increment de la supervivència dels pacients d'entre 6 i 8 mesos (Stupp et al., 2005).

Quimioteràpia

Els estudis amb quimioterapèutics en el tractament inicial dels gliomes s'iniciaren en la dècada de 1970. L'any 2005 es va publicar el primer estudi amb temozolomida (TMZ) que ha definit l'estàndard de tractament per al GBM (Mason and Cairncross 2005). La TMZ, agent alquilant que s'absorbeix ràpidament per via oral i s'hidrolitza espontàniament al seu metabolit actiu, *imidazole-4-carboxamide* (MTIC). Els estudis de Hegi et al., (2008) demostren un benefici en la supervivència que s'associa amb una millora en la qualitat de vida d'aquests pacients. L'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) i el National Cancer Institute of Canada (NIC) varen fer públic un estudi en fase III amb pacients amb GBM on es comparava el tractament post-quirúrgic només amb RT i amb RT i TMZ. La mitjana de supervivència global va ser d'entre 12.1 i 14.6 mesos, respectivament.

És important destacar l'estudi en el que es va comparar els resultats amb els pacients amb tumors que presentaven metilació en el gen *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase* (MGMT) front els

Introducció

que no la presentaven. Per al subgrup amb metilació al promotor MGMT la supervivència global va ésser de 21.7 mesos amb RT i TMZ. En el subgrup que no presentava metilació de MGMT, la diferència de supervivència entre el grup RT i TMZ front RT no va arribar a la significació estadística (Hegi et al., 2008). Per tant, el tractament amb el quimioterapèutic TMZ només s'ha demostrat eficaç, incrementat l'esperança de vida, als pacients amb metilació al promotor de l'enzim MGMT.

1.5.2 Tractaments a la recurrència

Malgrat la cirurgia, la radioteràpia i la quimioteràpia, la major part dels pacients finalment recurreixen amb l'aparició d'un nou tumor, ja sigui en les proximitats d'on es va trobar el primer tumor o en altres àrees del cervell. A dia d'avui establir el millor tractament per un GBM recurrent representa un repte a nivell clínic, ja que la literatura científica actual ens aporta informació incompleta alhora que controvertida sobre la supervivència dels pacients en funció de la decisió clínica i el tractament atorgat (Clarke et al., 2011).

Segons les guies sobre pràctiques clíniques en oncologia del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) s'ha de considerar entre les opcions en el tractament de la recurrència del GBM la segona resecció quirúrgica. Aquest procediment pot alleujar alguns símptomes derivats de l'elevada pressió intracraneal (Nishikawa et al., 2010), no obstant no es pot confirmar que aquest procediment allargui significativament la vida dels pacients (Kaloshi et al., 2017). A més també està permès el tractament amb quimioteràpia amb els composts de la **taula 2** si l'estat del pacient ho permet.

Taula 2. *Tractaments amb quimioteràpia després de la recurrència o d'una mala resposta al tractaments de primera línia segons les guies de la NCCN (Nishikawa et al., 2010).*

Bevacizumab amb o sense quimioteràpia

Temozolomida

Nitrosurees o PCV

Ciclofosfamida

PCV: Procarbazina, lomustina i vincristina.

2. AUTOFÀGIA

2.1 Homeostasi cel·lular

L'homeòstasi cel·lular és el balanç adequat i correcte entre la síntesi i la degradació dels components cel·lulars (Ohsumi et al., 2014).

El terme homeòstasi fa referència al conjunt d'accions cel·lulars que permeten el manteniment de l'equilibri en presència d'agents o estímuls estresors que poden interrompre la homeostasi proteica o proteòstasi i que resulta en el malplegament i agregació de proteïnes (Frakes and Dillin 2017). La proteòstasi és essencial per mantenir la viabilitat cel·lular gràcies a la regulació coordinada entre la traducció, plegament, tràfic i degradació de les proteïnes cel·lulars (López-otín et al., 2013).

Al llarg de la seva vida les cèl·lules s'enfronten de manera contínua a estímuls estresors a més de demandes fisiològiques que poden afectar la proteòstasi. Aquest fet està especialment potenciat en cèl·lules canceroses les quals necessiten ajustar dinàmicament la producció de proteïnes secretades en resposta a factors ambientals i a la disponibilitat de nutrients. En resposta a aquests efectes i quan la càrrega de proteïnes sintetitzades *de novo*, i l'existència de proteïnes malplegades o no plegades sobrepassa les capacitats de la maquinària del Reticle Endoplasmàtic (RE), la cèl·lula activa la via Unfolded Protein Response (UPR) del RE amb la finalitat de restaurar l'homeòstasi (Wang and Kaufman 2016).

Per alleujar l'estrès de reticle i orquestrar la recuperació de la funció d'aquest orgànul, les cèl·lules tenen un sistema de senyalització integrat que consisteix per una part en l'activació de la UPR i per altre en l'estimulació de la ruta de degradació associada a RE (ERAD, *Endoplasmic Reticle Associated Degradation*), la qual consisteix en l'activació de la via ubiquitina-proteasoma i la via autofàgica-lisosomal (Schröder and Kaufman 2005).

La via ubiquitina-proteasomal degrada principalment proteïnes de vida mitjana curta (Mrschtik and Ryan 2015), mentre que l'autofàgia s'encarrega de la degradació i reciclatge de components citosòlics, incloent proteïnes mal plegades, proteïnes de llarga vida mitja i orgànuls danyats amb la finalitat de mantenir la homeòstasi cel·lular (Kim et al., 2011) (**Fig 4**).

La paraula autofàgia deriva del grec “auto” (propi) i “fàgia” (phagos, menjar); es refereix al procés catabòlic pel qual el material marcat per a la ruta de degradació es transportat fins als lisosomes on es degraden en molècules més simples per un procés de reciclatge cel·lular (Xie and Klionsky 2007).

Introducció

L'elucidació dels mecanismes de la degradació proteica fou possible al descobriment del lisosoma per Christian Duve. Gràcies a l'observació d'activitat fosfatasa en diferents fraccions cel·lulars en homogeneïtzats de fetge de rata. S'anomena així seu paper com orgànul amb funció lítica. Gràcies al descobriment del lisosoma, la descripció de les seves funcions físiques, i el mecanisme pel qual exerceix aquestes funcions Christian Duve va ser guardonat amb el Premi Nobel en Medicina i Fisiologia l'any 1974 (Duve et al., 1955).

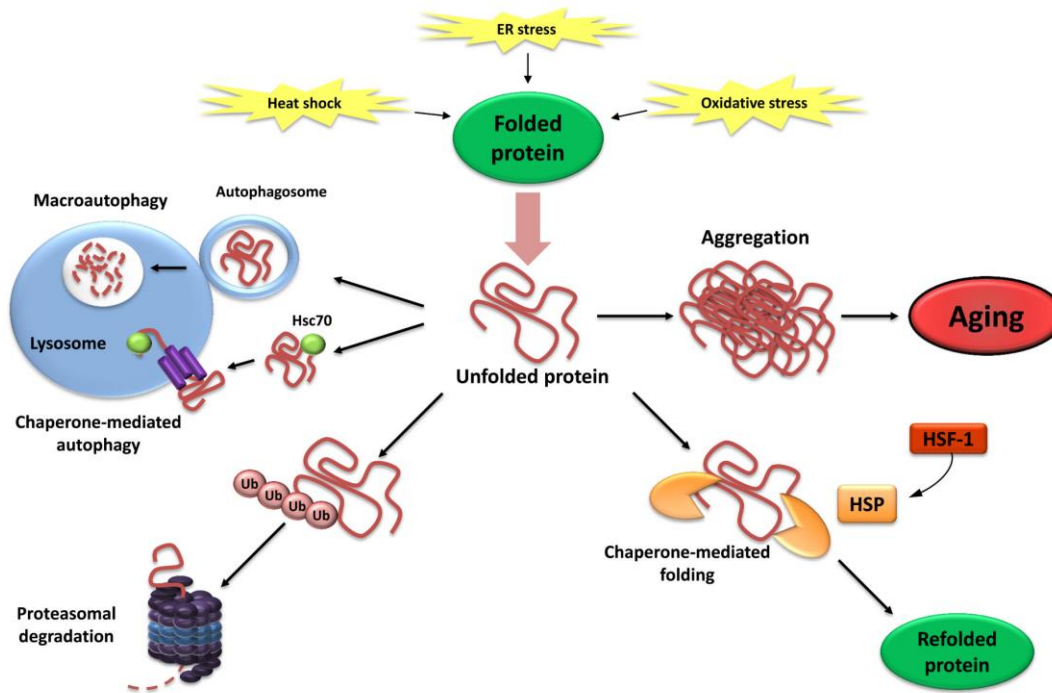


Figura 4. Relació estrès de reticle i degradació proteica per al reestabliment de la homeòstasi cel·lular. Diferents estímuls provoquen la manca de funcionalitat alhora de plegar de les proteïnes al RE, aquesta disfunció desemboca en l'agregació de proteïnes mal plegades que han d'esser o bé degradades, per via autofàgica-lisosomal i/o proteasomal, o bé replagades de nou per mitjà de proteïnes xaperones, reestablint-se de nou la homeostasi cel·lular. Adaptat de López-Otín et al., (2013)

2.2 Estrés de Reticle

El RE és un orgànul cel·lular imprescindible en les cèl·lules eucariotes pel seu paper fonamental en la síntesi, maduració i plegament de les proteïnes que segueixen la ruta secretora (Braakman and Bulleid 2011). Hi ha dos tipus de reticle endoplasmàtic: RE rugós (RER) i RE llis (REL) (English et al., 2012). El RER té ribosomes adherits i el seu paper principal és la producció, plegament i

control de qualitat de les proteïnes (English, Zurek, and Voeltz 2012) mentre que el REL participa en la producció i el metabolisme de greixos i hormones esteroidees (Shibata et al., 2006). El RE requereix d'uns nivells adequats d'adenosina trifosfat (ATP), calci (Ca^{2+}) i un ambient oxidant per dur a terme les modificacions post-traduccionals adients. (Bottomley et al., 2001; Galluzzi et al., 2014; Hetz et al., 2011). Es troba adjacent a l'embolcall nuclear i associat l'aparell de Golgi, així les proteïnes poden ser transportades directament entre orgànuls mitjançant vesícules secretores a través del citoplasma (Voeltz et al., 2002).

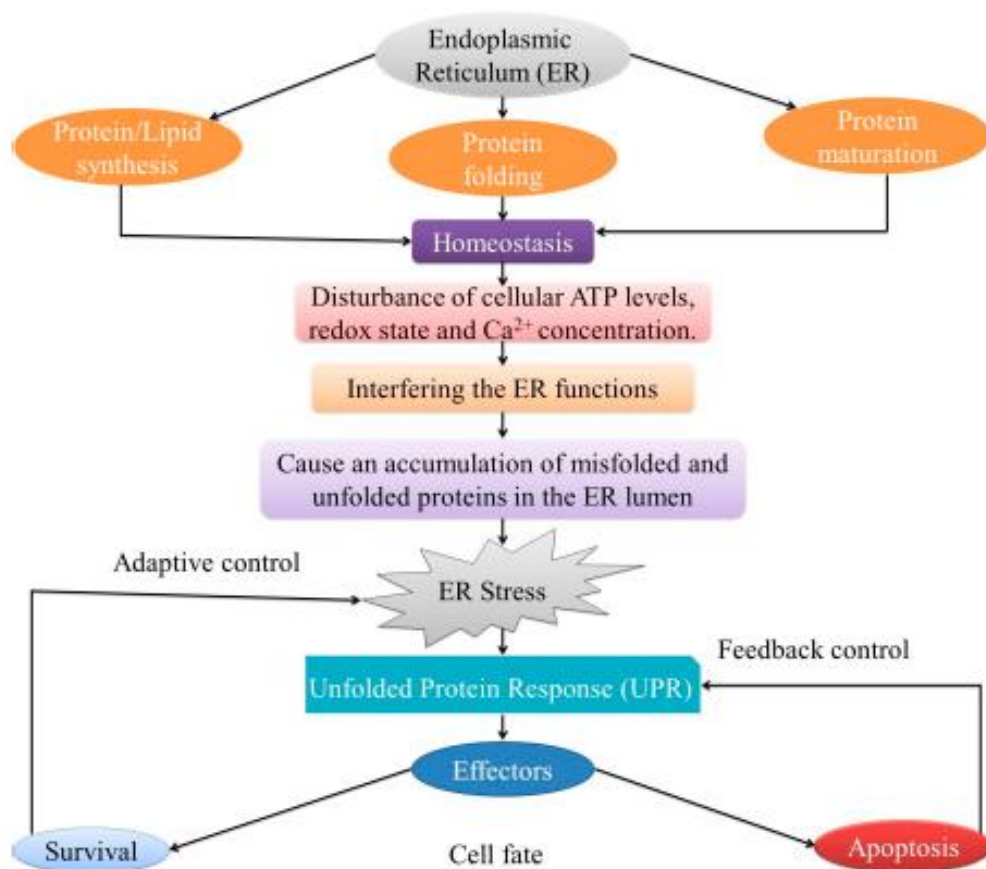


Figura 5. El RE s'encarega de mantenir l'homeòstasi a través de la síntesi de lípids, plegament correcte i maduració de proteïnes però per portar a terme aquestes funcions els nivells de ATP/ADP han d'esser els adequats així com l'estat d'oxidació-reducció i concentració de Ca^{2+} dins d'aquest orgànul; quan aquestes condicions es veuen alterades fins al punt d'interferir en les funcions del RE es produeix una acumulació de proteïnes malplegades o no-plegades en el lumen del RE esdevenint estrès de reticle i desencadenant una resposta adaptativa front aquest tipus de situacions anomenada Unfolded Protein Response (UPR) i que s'empra com a ruta per al reestabliment de l'homeòstasi Extret de Bahar et al.,(2016).

El RE es el primer orgànul involucrat en la transducció de senyals relacionades amb canvis en la

Introducció

homeòstasi cel·lular proporcionant un *feedback* a altres orgànuls. L'estrès de reticle es defineix com aquell esdeveniment en el que hi ha una reducció en la capacitat de plegament de les proteïnes que resulta en la seva l'acumulació i agregació; aquest procés d'estrès pot ésser detectat de diverses maneres: pertorbament dels ràtio ATP/ADP, concentració de Ca^{2+} o l'estat d'oxidació-reducció i/o l'excés de tràfic proteic (Bahar et al., 2016) (**Fig 5**) i pot conduir a supervivència o mort cel·lular.

L'estrès de reticle condueix a la UPR, mecanisme adaptatiu activat davant la necessitat de respondre i reestablir la homeòstasi cel·lular (Kozutsumi et al., 1988), on es veuen implicades les proteïnes transmembrana IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*), PERK (*Pancreatic ER kinase*) i ATF6 (*Activating Transcription Factor-6*), que defineixen les tres branques de senyalització de la UPR (**Fig 6**). Mentre la cèl·lula no està sotmesa a cap estrès i es mantenen les condicions fisiològiques, els dominis exposats a la part luminal del RE d'aquestes tres proteïnes es troben unides a la xaperona Grp78 (*Glucose-regulated protein 75kDa*, també coneguda com BIP) romanent així inactivades; en situacions d'estrès de RE aquestes proteïnes es dissocien de Grp78 activant vies de senyalització que produiran l'activació de diferents senyals i conduiran a la supervivència o mort cel·lular en funció de si són capaces o no de reestablir l'equilibri cel·lular (Yadav et al., 2014). La UPR té un paper dual depenent de l'estatus cel·lular, podent ser citoprotectiva o citotòxica. Si l'estrès de RE es manté al llarg del temps i la UPR és incapaç de reestablir la homeòstasi, la cèl·lula activa vies per conduir a la mort cel·lular programada (apoptosi); no obstant, la UPR també pot protegir a la cèl·lula d'aquest desenllaç restaurant la homeòstasi cel·lular afavorint la supervivència (Yadav et al., 2014).

Mecanismes d'activació de la UPR

Durant l'estrès de RE, la proteïna Grp78/ BIP s'uneix a les proteïnes mal plegades activant IRE1, ATF6 i PERK les quals poden detectar el nivell de proteïnes mal plegades en el lumen del RE i transferir el senyal al citoplasma i nucli (Patil et al., 2001)(**Fig 6**).

PERK s'activa per dimerització i autofosforilació i pot fosforilar al Factor eucariòtic d'Iniciació eIF2 α , activant el factor de transcripció ATF4 que indueix la transcripció de gens relacionats amb el transport d'aminoàcids, antioxidants i xaperones (Szegezdi et al., 2006), a més d'inhibir la síntesi proteica i induir l'autofàgia (Kania et al., 2015).

IRE1, proteïna que té activitat RNasa produeix l'*splicing* de *X-box binding protein 1* (XBP1), permetent la seva entrada a nucli, on afavoreix la transcripció de gens relacionats amb la síntesi de lípids i xaperones (Acosta-Alvear et al., 2007). ATF6 es transloca des del RE a l'aparell de Golgi, on es proteolitza formant un fragment, que un cop al nucli que activa la transcripció de gens associats que codifiquen per xaperones i *Endoplasmic reticulum associated protein degradation*

(ERAD) (Yadav et al., 2014) (Fig 6).

A més, l'estrès condueix també a la sortida de Ca^{2+} des del RE al citosol, produint l'activació de nombroses kinases i proteases involucrades en l'activació de l'autofàgia (Høyer-Hansen et al., 2007).

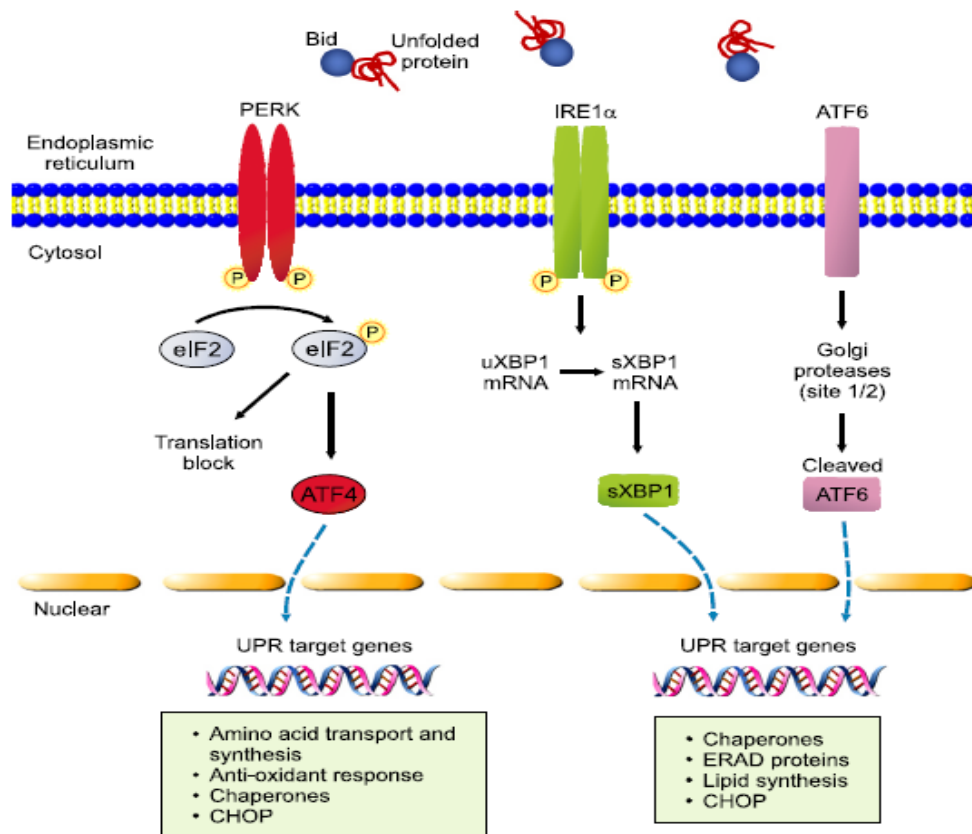


Figura 6. Esquema de les vies de senyalització en l'activació de la UPR. Extret de Yadav et al., (2014).

Importància de la UPR en càncer

Una de les principals característiques dels tumors sòlids és el seu creixement descontrolat, que exposa a les cèl·lules a continus canvis en la capacitat de captació de nutrients i oxigen degut a la vascularització insuficient, obligant-les a una adaptació constant (Meister et al., 2007).

L'activació de l'eix PERK-eIF2 α -ATF4 és crític en l'adaptació de les cèl·lules al microambient tumoral, demostrant-se que en línies de carcinoma colorectal la deficiència de PERK condueix a uns majors nivells d'apoptosi en condicions d'hipòxia, una menor taxa de proliferació i d'angiogènesi (Blais et al., 2006).

S'ha demostrat que també la senyalització per la via IRE1 contribueix en l'angiogènesi i creixement tumoral a través de la inducció de VEGF-A. Drogat et al., (2007) descriu que ratolins amb tumors deficients per IRE1 presenten menor capacitat angiogènica i proliferativa que els ratolins *wild type*. Per tant, es demostra que la resposta del RE és important perquè les cèl·lules canceroses puguin proliferar en situacions d'estrès, obrint una via d'estudi interessant per combatre diferents tipus de càncer.

2.3 Macroautofàgia

Autofàgia es el nom global que reben la microautofàgia, autofàgia mediada per xaperones i macroautofàgia, processos amb una mateixa funció de reciclatge de components cel·lulars, que es produeixen mitjançant diferents vies i mecanismes. No obstant, la major part de les vegades utilitzem el terme autofàgia per referir-nos a macroautofàgia. La degradació de materials intracel·lulars és l'objectiu comú als tres processos gràcies al pas final en el qual intervé el lisosoma. Així en cada una d'elles, els senyals que condueixen a la seva inducció són diferents, així com el tipus de *cargo* a degradar, el mecanisme de segrest del *cargo* i la seva entrega al lisosoma (Itakura et al., 2010; Noda et al., 2000; Parzych et al., 2014). En aquest estudi ens hem centrat en aquells aspectes referents a macroautofàgia.

Com ja s'ha comentat, l'autofàgia és el procés degradatiu de proteïnes mal plegades i orgànuls danyats amb la finalitat de reciclar-los obtenint energia i nutrients. El procés comença amb la formació de vesícules de doble membrana, autofagosomes, que inclouen en el seu interior porcions de citoplasma, proteïnes i/o orgànuls marcats per a la seva degradació. Aquests autofagosomes es fusionaran amb els lisosomes i com a resultat d'aquesta fusió es degradaran els components inclosos en els autofagosomes. Es tracta d'una ruta que s'indueix sota condicions d'estrès, com pot esser la privació de nutrients, per a la eliminació d'agregats proteics citoplasmàtics o patògens, encara que també pot trobar-se activada basalment per eliminar components citoplasmàtics redundants o envellits (Itakura et al., 2010; Ravikumar et al., 2010).

Tot i que l'origen de la membrana que conforma l'autofagosoma no és del tot clar, s'han proposat contribucions del RE, mitocondris, Aparell de Golgi i membrana plasmàtica (Axe et al., 2008; Hailey et al., 2010; Hayashi-Nishino et al., 2009; Moreau et al., 2011).

Les proteïnes implicades en el desenvolupament del procés autofàgic van ésser descobertes en *S. cerevisiae*, on es van identificar al voltant d'un 30 gens relacionats amb autofàgia (anomenats ATGs) (Xie et al., 2007). Aproximadament la meitat d'aquests gens tenen el seu homòleg en cèl·lules de mamífer. Es tracta d'un procés altament conservat on molts aspectes centrals en organismes més complexos són pràcticament iguals que en *S. cerevisiae* (Ravikumar et al., 2009). A dia d'avui un dels aspectes fonamentals en el camp de l'autofàgia es entendre a nivell molecular què succeeix exactament durant la biogènesi de l'autofagosoma, així com les rutes que la regulen amb la finalitat de poder modular-la com a estratègia de supervivència cel·lular (Yin et al., 2016).

L'autofàgia es pot dividir en tres fases: (1) iniciació i nucleació, (2) expansió i maduració de l'autofagosoma, i (3) tancament i fusió amb el lisosoma. En cadascuna de les fases intervien diferents proteïnes, convertint-lo en un procés altament regulat (**Fig 7**).

(1) La **iniciació** comença amb el procés de senyalització que convergeix en el complex mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin Complex-1*), una cinasa Ser/Thr reguladora central del procés autofàgic, que controla l'estat d'activació de mTORC1 mitjançant la seva dissociació del complex unc-51-like kinase 1/2 (ULK 1/2) format per ULK1/2 juntament amb Atg13, Atg101 i focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa (FIP200). D'aquesta manera, ULK1/2 fosforila Atg13 i FIP200 i s'inicia la formació de l'autofagosoma. Per contra, quan mTOR està actiu, aquesta cinasa fosforila ULK1/2, inhibint-la (**Fig 6**).

El complex ULK1/2 recluta el complex de PI3K de classe III que conté Beclin-1 (Atg6), Vps34, p150 i Atg14 a l'estructura pre-autofagosomal. PI3K-Vps34 fosforila fosfatidilinositols (PI) a la membrana de l'autofagosoma per generar PI3P. Atg9A és la única proteïna transmembrana identificada a l'autofagosoma (Noda et al., 2000).

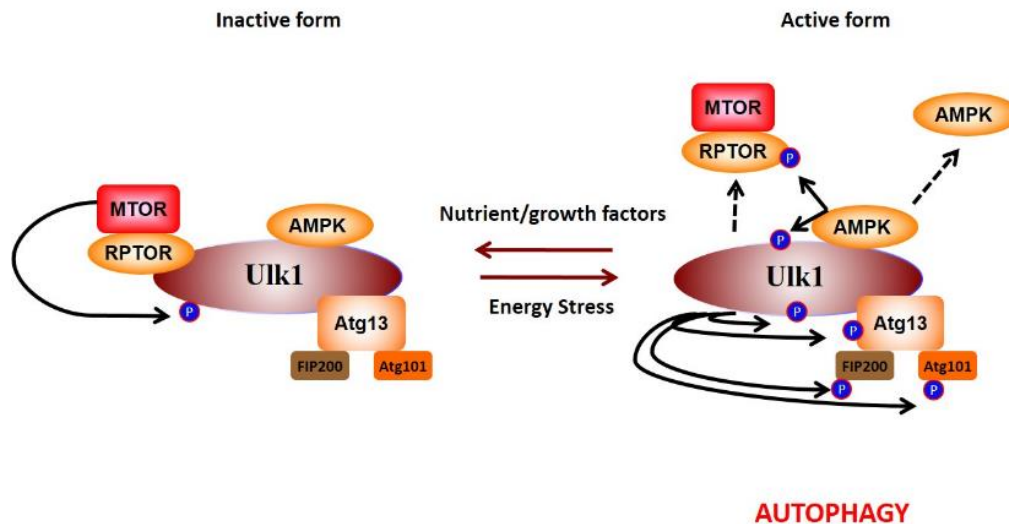


Figura 6. Regulació del complex ULK1. En condicions basals, mTOR/raptor interacciona amb ULK1 i el fosforila inhibint la seva activitat quinasa i la seva capacitat per fosforilar la proteïna d'autofàgia Atg13 i FIP200; en aquest complex AMPK també interacciona amb ULK1. En moments d'estress cel·lular, AMPK fosforila mTOR/raptor conduint a la dissociació de ULK1 i fosforilant-lo. Conseqüentment ULK1 es activa i autofosforila, fosforilant també Atg13 i FIP200. Extret de Sanchez et al., (2012).

- (2) En l'**expansió i maduració** de l'autofagosoma són necessaris dos complexos de conjugació. El primer, el complex Atg16L involucra la proteïna Atg12 conjugant-la amb Atg5. En el segon complex s'aconsegueix la lipidació de LC3-A/B (proteïna associada a microtúbuls, *autophagic mamifer ATG8 protein*). Atg4 és la encarregada d'escindir pro-LC3-I i conjugarla amb fosfatidiletanolamina (PE) via Atg3-Atg7 i Atg5-Atg12, formant el que s'anomena LC3-II lipidat. Aquest procés permet l'associació de LC3-II a la membrana autofagosomal, a més de facilitar el reclutament del *cargo* dins de l'autofagosoma (Kabeya et al., 2000).

- (3) El **tancament de l'autofagoma i fusió** amb el lisosoma és el procés menys conegut (Coutts et al., 2016) però es sap que involucra un conjunt de proteïnes SNARE (SNAP-Receptors), incloent la Sintaxina-17 (STX17), SNAP29 i VAMP8, implicades en la fusió amb el lisosoma. Una vegada s'ha produït la fusió amb el lisosoma, l'entitat resultant s'anomena autofagolisosoma, i el seu contingut es degrada per les hidrolases àcides d'aquest compartiment (Anding et al., 2017) (**Figura 7**).

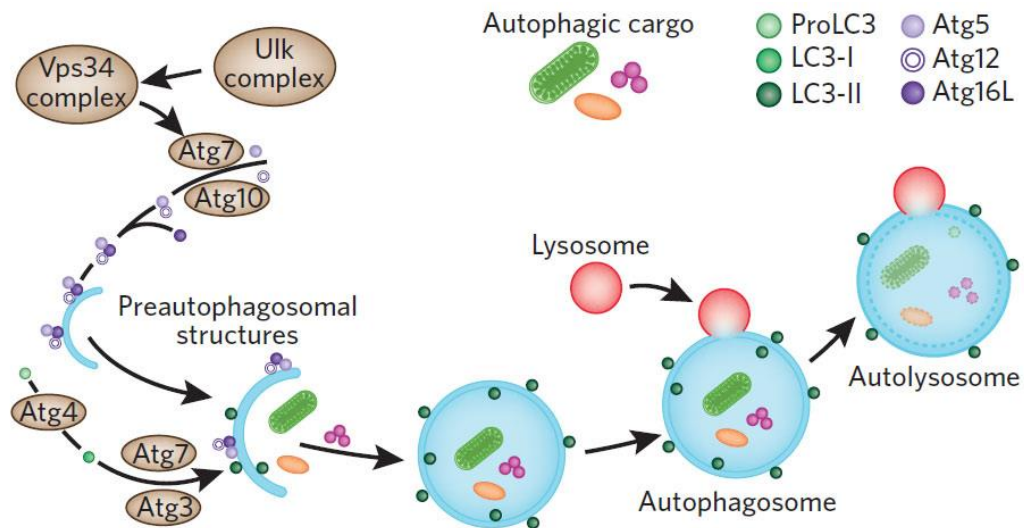


Figura 7. Activació de l'autòfagia, iniciació i implicació de les proteïnes Atg i fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma. Extret de Fleming et al., (2011).

Selectivitat de l'autòfagia

Inicialment l'autòfagia va ser considerada com un procés no selectiu (Kopitz et al., 1990). No obstant, estudis recents revelen que la membrana de l'autofagosoma pot reconèixer de forma selectiva proteïnes específiques i òrgànuls a degradar (Kraft et al., 2010). En cèl·lules de mamífer, el substrat autòfagic millor conegut és la proteïna p62/SQSTM1 (**Fig 8**). Les funcions d'aquesta proteïna són múltiples, entre les que trobem la tumorigènesi, ja que l'acumulació d'aquesta proteïna al citoplasma de cèl·lules hepàtiques ha demostrat ser citotòxica (Pankiv et al., 2007). També s'ha vist que realitza una funció de proteïna receptora de proteïnes ubiquitinitzades, òrgànuls cel·lulars i bacteris (Dupont et al., 2009; Kirkin et al., 2009; Komatsu et al., 2007).

Altres proteïnes implicades en aquest procés d'inclusió del *cargo* a l'autofagosoma amb finalitat de degradació selectiva són NRB1 (Neurabin-1), Atg19 i Atg32, totes elles presenten a la seva estructura dominis d'interacció amb LC3 (WXXL/I) anomenats seqüències de reconeixement de LC3 (LRS). No obstant això, està per descobrir quin és el mecanisme precís pel qual els substrats i els receptors del *cargo* s'inclouen selectivament dins l'autofagosoma per ésser degradats (**Figura 8**). L'idea és que el *cargo* s'inclou dins l'autofagosoma en el procés d'elongació de la membrana de manera LC3 dependent (Itakura et al., 2016).

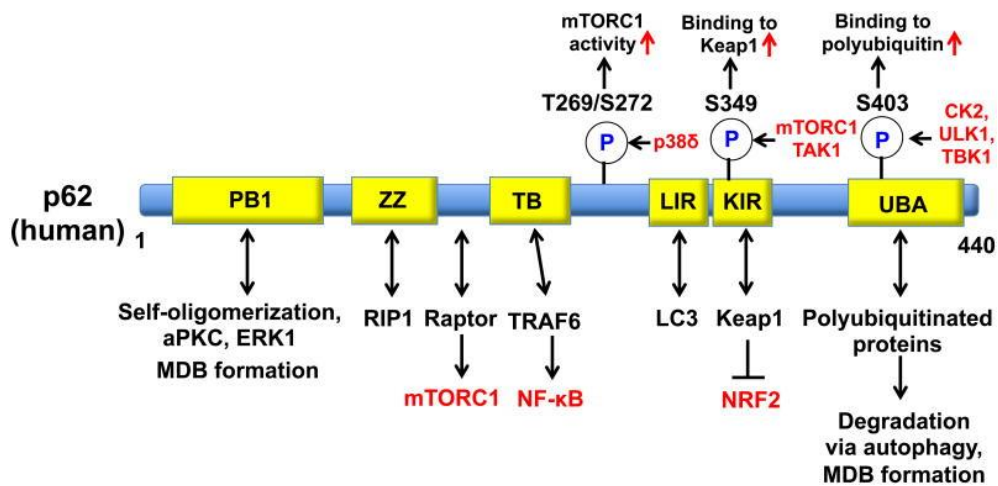


Figura 8. Estructura de la proteïna adaptadora p62/SQSTM1. Aquesta proteïna alberga múltiples motius funcionals enstre els que s'inclouen un domini N-terminal Phox1 i Bem1p (PB1), un dit de zinc (ZZ), un factor de necrosi tumoral associat al receptor (TRAF6) i d'unió a un motiu TB, una regió d'interacció associada a microtúbuls (LC3) que interacciona amb una regió LIR, una regió KIR que interacciona amb la proteïna Keap1 i finalment un domini C-terminal associat a domini ubiquitina (UBA). Extret de Taniguchi et al., (2016).

Vies de senyalització que regulen l'autofàgia

En condicions fisiològiques l'activitat autofàgica es troba en estat basal. No obstant quan els nutrients minven l'activitat autofàgica s'incrementa. Aquest increment d'autofàgia està mediat per l'activació de diverses vies de senyalització que ajuden a modificar la conducta autofàgica en el moment precís.

Via mTOR

Mammalian target of rapamycin (mTOR) es una proteïna cinasa de serina/treonina de la família de PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) que controla el creixement i metabolisme cel·lular regulant funcions tant catabòliques com anabòliques. Aquesta proteïna va ser inicialment identificada i purificada a *S. cerevisiae*.

mTOR conté 2549 aminoàcids i consta de varis dominis estructurals desde l'extrem N-terminal, on es troben 20 repeticions en tàndem HEAT, fins a l'extrem C-terminal que conté el domini cinasa. mTOR és la subunitat catalítica de dos complexos proteics diferents que són mTORC1 i mTORC2 (Kaur et al., 2017).

Aquesta proteïna està implicada en moltes rutes i es pot activar per aminoàcids, insulina, factors de creixement. mTOR regula positivament el creixement cel·lular, la proliferació, la supervivència i la síntesi proteica, entre d'altres processos. En canvi és inhibït per senyals d'estrès com la manca de nutrients i la hipòxia (Saxton et al., 2017), resultant en la inducció de l'autofàgia.

En presència de nutrients, mTOR fosforila ULK i l'inactiva, inhibint l'autofàgia. En condicions de manca de nutrients, mTORC1 inactiu deixa de fosforilar ULK1 i s'activa l'inicia l'autofàgia (**Figura 6**). La inhibició de mTORC1 induïx l'autofàgia via ULK.

mTOR també és capaç d'inhibir l'autofàgia, evitant la translocació al nucli del Factor de Transcripció EB (TFEB), que activa la transcripció de gens implicats en la biogènesi lisosomal i en autofàgia (Martina et al., 2012; Settembre et al., 2012).

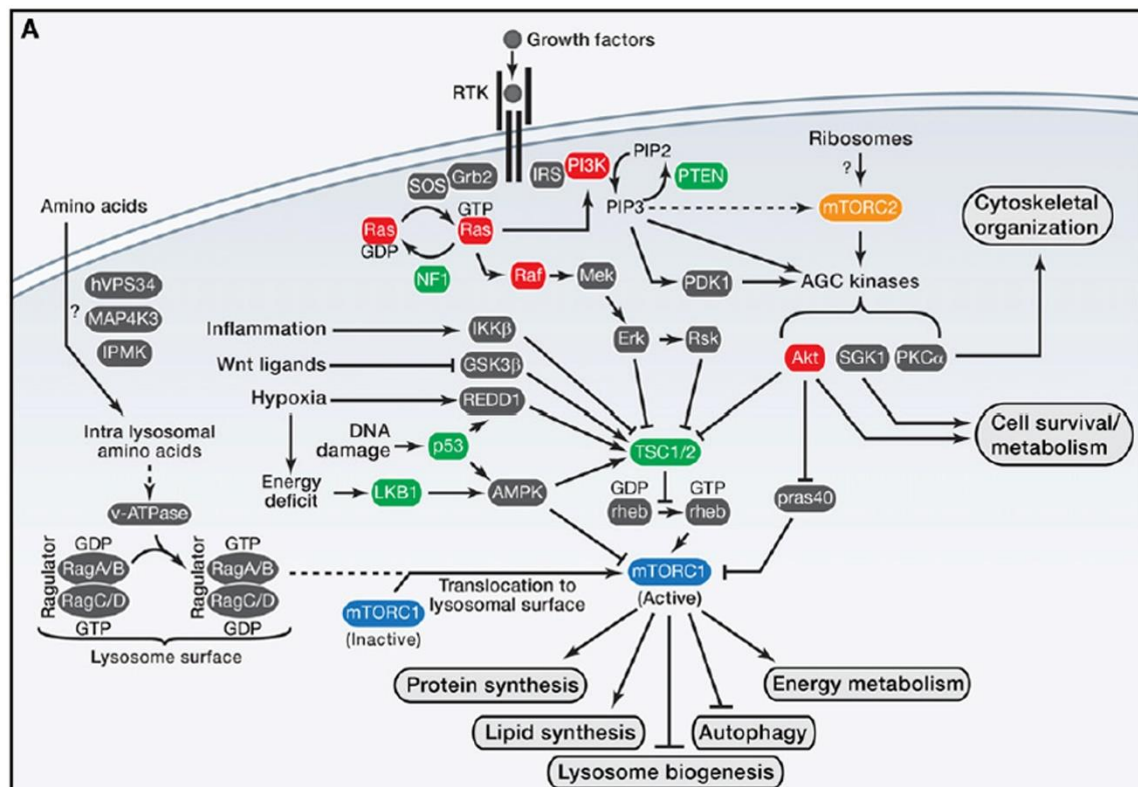


Figura 9. Via de senyalització mTOR. L'autofàgia es negativament regulada per mTOR, que integra processos anabòlics i catabòlics. mTOR inhibida induïx l'autofàgia. Extret de Saxton et al., (2017).

Via AMPK

AMPK (AMP-activated protein kinase) és sensible a la baixa disponibilitat de nutrients i als canvis

Introducció

en la ràtio AMP/ATP i ADP/ATP. Presenta un domini catalític amb una subunitat α , β i δ , aquesta última d'unió a AMP, que motiva la fosforilació de la Treonina 172 del complex LKB1-STRAD-MO25.

Una vegada s'activa la via AMPK per un augment de la ràtio AMP/ATP, el resultat és una major eficiència en la captació de glucosa i la inducció de l'autofàgia, mentre que s'inhibeix la síntesi biogènica de proteïnes. Les vies AMPK i mTOR han d'estar perfectament coordinades per una eficient regulació i execució de l'autofàgia (Carroll et al., 2017).

AMPK inhibeix mTORC1 fosforilant directament el component Raptor del complex (serines 722 i 792). Aquest pas permet la unió de la proteïna 14-3-3 a Raptor i la inhibició de la senyalització produïda per mTORC1. A més, AMPK es pot coordinar amb el complex iniciador d'autofàgia ULK1 per tal de regular-la positivament afavorint la seva iniciació. Cal destacar que ULK1 també és capaç de fosforilar tres subunitats d'AMPK inhibint la seva activitat (Löffler et al. 2011).

Evidències recents indiquen que AMPK també participa en l'activació de l'autofàgia en condicions d'hipòxia reduïnt l'expressió de mTOR. LKB (Liver kinase B1) i CAMKK β (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β) juguen un paper important en la fosforilació i activació de AMPK (Crino et al., 2016; Ravikumar et al., 2010).

Via PI3K

La via PI3K és la principal via de senyalització que controla a mTOR. El factors de creixement o la insulina són senyals que l'activen. PI3K activa converteix el lípid de membrana plasmàtica fosfatidilinositol-3,4,5-difosfat (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) que recluta proteïnes amb dominis plekstrina (PH), que són serina/treonina quinases com ara la proteïna quinasa dependent de fosfatilinositols (PDK) i AKT/PKB a la membrana plasmàtica. AKT es activada per fosforilació en dos residus diferents. AKT és capaç de modular l'activitat autofàgica cel·lular regulada per la via PI3K. S'ha vist que mutacions en AKT, tant per suprimir-la com per activar-la, produeixen l'activació i/o supressió de la ruta autofàgica, convertint-la en una proteïna efectora directe de la ruta PI3K (Ravikumar et al., 2010).

2.4 Autofàgia en càncer

L'autofàgia pot portar a terme una funció dual, pro-supervivència o pro-mort, en cèl·lules metabòlicament molt actives com les cèl·lules canceroses. El rol de l'autofàgia en el context

tumoral depèn del seu estadi (inici, progressió, metastasi i/o desenvolupament de resistència al tractament), el teixit implicat i del balanç dels canvis genètics en pro-oncogens o gens supressors tumorals, així com l'ordre d'aparició o desaparició d'aquests (Lozy et al., 2012).

Tot i que l'autofàgia es troba suprimida o a nivells basals en els primers estadis de formació del tumor, sembla que durant la progressió les cèl·lules que el conformen esdevenen més dependents d'aquest procés que ofereix una resposta adaptativa a situacions de deficiència d'oxigen, nutrients i estressos, aconseguint mantenir la proliferació i supervivència cel·lulars. A mesura que el tumor es desenvolupa, les cèl·lules de la perifèria que estan en contacte amb vasos sanguinis proliferen mantenint les vies anabòliques actives, i les que queden més allunyades d'aquesta zona i dels vasos sanguinis recorren a la inducció de l'autofàgia per tal de sobreviure en condicions adverses (Kondo et al., 2005).

L'autofàgia com a supressor tumoral

Hi ha nombroses evidències i possibles explicacions sobre com l'autofàgia pot actuar com a supressor tumoral, adquirint un paper rellevant en processos com la senescència, mort cel·lular i gestió de l'estrès metabòlic (Panda et al., 2015).

L'activació de l'autofàgia en la senescència induïda per oncogens fa pensar que aquesta via té un paper important a la hora de limitar processos tumorogènics (Johnson et al., 2012). Es sap que les cèl·lules que es troben senescentes tenen nivells més alts d'autofàgia, un increment del tamany cel·lular, nombre d'òrgànuls i de secreció de senyals pro-inflamatòries que les mateixes cèl·lules amb un fenotip no senescent (Carroll et al., 2017). L'activació de l'autofàgia durant la senescència ve acompanyada d'una retroalimentació negativa de la via PI3K/mTOR, a més d'una sobreexpressió de gens d'autofàgia. D'altra banda, la inhibició de gens d'autofàgia retarda el fenotip de senescència així com el perfil de secreció de senyals, indicant que l'autofàgia es un procés necessari per l'adquisició del fenotip senescent (Young et al., 2009).

L'autofàgia segons els estímuls que rep també es capaç d'activar mecanismes que condueixen a la mort cel·lular prevenint la transformació maligna. Els mecanismes en els què se l'ha implicat són l'apoptosi, la necrosi i la mort per autofàgia. (Sharma et al., 2014) varen proposar tres criteris per definir la mort per autofàgia: és independent d'apoptosi (activació de caspases), hi ha un increment del flux autofàgic previ a la mort cel·lular i la supressió gènica o farmacològica del procés autofàgic és capaç de prevenir la mort cel·lular.

Les evidències genètiques que relacionen l'autofàgia i el càncer son innegables (**Taula 3**). Beclin1

Introducció

fou la primera proteïna autofàgica implicada en tumorigènesi. Es va evidenciar que es presentava monoal·lèlica al voltant del 50% dels casos de càncer de fetge, ovari, cervell, pit, pròstata, colon i glioma, suggerint que la pèrdua d'un al·lel podria relacionar-se amb el desenvolupament del tumor, on actuaria com a supressor tumoral afavorint l'autofàgia en heterozigosi (Aita et al. 1999). Estudis en ratolins van demostrar que la pèrdua bial·lèlica de Beclin1 és letal a nivell embrionari; els ratolins que mantingueren una còpia de Beclin1 van néixer però presentaven una major incidència de limfomes, i carcinomes de pulmó i fetge a mes d'hiperplàsies mamàries. Karantza et al., (2007) van reintroduir Beclin1 dins la línia cel·lular de càncer de mama MCF7 restaurant la capacitat autofàgica i inhibint el seu potencial tumorigènic.

Gen	Fenotip	Referència
Gen k.o. a la línia germinal		
Atg4c ^{-/-}	Apareixen defectes autofàgics al diafragma reduint l'activitat motora durant la innació. Major susceptibilitat a desenvolupar fibrosarcomes davant un estrès químic.	(Panda et al. 2015)
Beclin 1 ^{+/-}	S'ha detectat una elevada freqüència de lesions neoplàsiques mamàries, ovàriques, pròstata, colon.	(Aita et al. 1999)
Bif 1 ^{-/-}	Increment de la freqüència de limfomes, sarcomes i carcinomes.	
Atg5 ^{-/-}	Neixen però moren en deprivació de nutrients durant l'etapa post-natal.	(White et al., 2009)
Atg7 ^{-/-}	Neixen però moren en deprivació de nutrients durant l'etapa post-natal.	(Lozy et al., 2012) (Rosenfeldt et al., 2009)
Mutacions a la línia somàtica		
Beclin 1 (mutació monoal·lèlica)	Relacionat amb càncer de mama, ovaris, pròstata, glioma. Possiblement per la inestabilitat genòmica i un creixement no regulat. Autofàgia defectiva.	(Aita et al., 1999)
UVRAG (mutació monoal·lèlica)	Carcinoma colorrectal i menor activació de l'autofàgia.	(Rosenfeld et al., 2009)
Atg2B, Atg5, Atg9B, Atg12	La mutació d'alguna d'aquestes proteïnes està associat a una major incidència (28%) en càncer colorectal.	(Panda et al., 2015)

Taula 3. Efecte de les delecions bial·lèliques i mutacions en gens relacionats amb autofàgia i el seu efecte sobre el fenotip del ratolí knockout.

Normalment la depleció d'un gen codificant per proteïnes autofàgiques produeix un fenotip oncogènic possiblement degut, a que la inhibició de l'autofàgia induïx dany genètic, acumulació de proteïnes ubiquitinitzades, excés de peroxisomes i increment d'espècies reactives d'oxigen

(ROS) (Karantza et al., 2007). Per altra banda, si s'inhibeix gènica o farmacològicament la via autofàgica en cèl·lules tumorals ja establertes aquestes es tornen més sensibles als estressos ambientals i metabòlics, mostrant de nou el paper dual de l'autofàgia.

L'autofàgia en l'oncogènesi

Durant la gènesi del càncer, les cèl·lules tumorals experimenten canvis intracel·lulars i estrès iniciat des del medi extracel·lular. Aquesta situació hostil provoca danys a les proteïnes, producció de ROS i la proliferació de cèl·lules amb dany al DNA. Per tant, les cèl·lules tumorals han d'utilitzar mecanismes homeostàtics per aconseguir mantenir la integritat i obtenir l'energia suficient per sobreviure. Es a aquest punt on l'autofàgia juga un paper important ja que permetria suportar aquest tipus de demandes a través de la degradació lisosomal de proteïnes i d'òrgànuls; això no només serveix per eliminar components de rebuig, sinó també per proporcionar intermediaris catabòlics per a la producció intracel·lular d'ATP quan les reserves energètiques exògenes són limitades (Rosenfeldt and Ryan 2009).

En el context tumoral trobem cèl·lules que per la seva localització es troben mancades de nutrients i d'oxigen; aquests dos potents senyals inductors de l'autofàgia activen aleshores el procés amb la finalitat de lluitar per la supervivència cel·lular i el reestabliment l'ordre homeostàtic, mantenint el metabolisme i creixement tumoral (Panda et al., 2015; Karantza-wadsworth et al., 2007).

Les cèl·lules senescents tumorals encara que no es trobin també tenen una autofàgia basal molt elevada i són capaces de tolerar agents quimioterapèutics gràcies a l'alliberament d'un ampli espectre de citoquines proinflamatòries al microambient del tumor (López-otín et al., 2013).

Nombroses investigacions en diferents tipus de càncer demostren que si s'aïllen cèl·lules de tumors (cultius primaris) i s'inhibeix la ruta autofàgica (farmacològica o genèticament) aquestes cèl·lules esdevenen més sensibles als estímuls externs com els agents quimioterapèutics o la radiació, indicant que són cèl·lules que depenen d'aquesta via per a la supervivència en l'entorn tumoral (Qiu et al., 2015; Sharma et al., 2014).

Microambient tumoral i autofàgia

En molts tipus de càncers, les cèl·lules tumorals ja presenten una elevada autofàgia basal que no s'incrementa en excés davant estímuls que l'afavoreixin (Johnson et al., 2012). La reprogramació metabòlica d'aquestes cèl·lules es va anomenar "efecte de Warburg", es refereix a la característica única de les cèl·lules canceroses que en detriment de l'eficiència en la producció d'energia, disminuint l'activitat mitocondrial, incrementen la velocitat de proliferació gràcies a la regulació positiva de la glucòlisi aeròbica (DeBerardinis et al., 2007; DeBerardinis et al., 2008; Lum et al.,

Introducció

2007). Així mateix s'ha descrit el que s'anomena "efecte Warburg invers" que consisteix en que les cèl·lules tumorogèniques desencadenen estrès oxidatiu a les cèl·lules del voltant (fibroblasts, cèl·lules de l'estroma) que incrementen la seva autofàgia basal i creen un microambient adient per la proliferació tumoral (Panda et al., 2015).

Per aquest motiu, en els darrers anys molts estudis s'han focalitzat en la relació entre tumor i l'estroma, el qual juga un paper fonamental en cada etapa de la progressió tumoral, des de la gènesi fins a la metastasi, passant per la resistència als quimioterapèutics. La producció elevada de ROS degut al metabolisme de la cèl·lula cancerosa, causa estrès oxidatiu als fibroblasts i les cèl·lules estromals que l'envolten, provocant un increment de l'autofàgia, pèrdua de funció mitocondrial, mitofàgia i un increment de la glicòlisi aeròbia per part dels fibroblasts i cèl·lules de l'estroma, alliberant nutrients com lactat i cetones que utilitzen les cèl·lules canceroses com nutrients per a la biogènesi mitocondrial i fosforilació oxidativa aconseguint d'aquesta manera perpetuar el desenvolupament del tumor. A més, s'ha postulat que el ROS generat pel tumor i l'estrès oxidatiu causa dany al DNA, inestabilitat genòmica i aneuploidies en les cèl·lules canceroses promovent fenotips encara més agressius que els del tumor primari (Poillet-Perez et al., 2015).

La hipòxia també indueix la producció de ROS i al mateix temps l'autofàgia s'encarrega d'eliminar els mitocondris danyats, que produirien encara més ROS si quedessin romanents al citoplasma cel·lular (Lozy et al., 2012). A nivell molecular, la hipòxia afavoreix l'estabilització del factor de transcripció HIF 1 α que suprimeix la via mTOR a través de l'activació de REDD1 (*regulated in development and DNA damage response 1*) estimulando l'autofàgia (Brugarolas et al., 2004). A més, la hipòxia estimula l'autofàgia de manera independent de ROS i de HIF1 α . L'estrès de RE que provoca la pròpia hipòxia afavoreix l'activació de la via PERK, que té com a resultat la sobre regulació de gens autofàgics com Atg5 i LC3 (Rashid et al., 2015); a més, HIF 1 α actua com a regulador positiu de BNIP3 (*BCL2 Interacting Protein 3*) induint l'eliminació de mitocondris danyats per autofàgia (mitofàgia) evitant així la producció de ROS (Azad et al., 2009).

Regulació genètica de l'autofàgia en càncer

El control de l'autofàgia és clarament multifactorial. Fins al dia d'avui es sap que molts efectes oncogènics i supressors de tumors estan relacionats amb la via mTOR, Beclin1 i hVps34 (type III phosphatidylinositol 3-kinase, és una cinasa de lípids regulada per nutrients i necessaria per a l'activació de p70S6 cinasa).

Moltes mutacions que involucren les vies de senyalització Ras o AKT activen l'efecte Warburg incrementant la captació de glucosa mitjançant la transcripció d'enzims involucrats en el

metabolisme de la glucosa i la ràtio de glicòlisi (Elstrom et al., 2004). A més una àmplia varietat d'oncogens s'han relacionat amb la inhibició de la autofàgia, potencialment a través de l'activació de mTOR, donant suport a la hipòtesi que els processos catabòlics són sovint suprimits en tumors per facilitar el creixement de la massa tumoral (Lozy et al., 2012).

2.4.1 Autofàgia en el GBM primari i recurrent

L'autofàgia, com ja s'ha comentat anteriorment, presenta una funció dual en càncer que sembla, a dia d'avui, contradictòria (White et al., 2009). En estadis primerencs de la tumorigènesi l'autofàgia estaria limitant la progressió tumoral; a mesura que el tamany del tumor s'incrementa i l'aportació de nutrients minva l'activació de l'autofàgia i promou la supervivència cel·lular en aquest context advers (Jawhari et al., 2016).

A nivell molecular les proteïnes d'autofàgia Beclin1 i LC3 han estat les més estudiades en GBM, suggerint-se que elevats nivells citoplasmàtics d'ambdues proteïnes, en pacients amb mal pronòstic, s'associen a un increment de la seva supervivència (Kaza et al., 2012). Aquestes dades corroboren el mal pronòstic amb que s'associen del·lecions en el gen que codifica per a la proteïna Beclin1, demostrant alhora que es un componen crític en GBM i que juga un paper clau en la supressió tumoral (Yue et al., 2003).

No obstant, s'han descrit aspectes contradictoris en GBM, tals com que l'autofàgia pot regular positiva i negativament la invasió al teixit sa i la resistència als quimioterapèutics, ambdues característiques de l'agressivitat del GBM (Kaza, Kohli, and Roth 2012). Catalano et al., (2015) demostrà que les cèl.lules de GBM després de la inducció de l'autofàgia eren incapaces de migrar i invair altres teixits. També Palumbo et al., (2014) van descriure el mateix efecte però sota la inhibició autofàgica, especialment exacerbat quan alhora s'inhibia EGFR, destacant la importància d'aquesta via de senyalització.

Com s'ha comentat en apartats anteriors, la temozolomida (TMZ) és el quimioterapèutic més utilitzat per al tractament del GBM, que indueix l'autofàgia tant en línies com en cultius primaris de GBM, proposant-se l'activació d'aquesta ruta com a possible mecanisme d'acció en les resistències en el GBM. El mecanisme d'acció de la TMZ per a l'activació de l'autofàgia seria a través de la inhibició de l'eix AKT/mTOR, que produeix l'activació transitòria de l'autofàgia conduint a la resistència en la teràpia anti-tumoral (Jawhari, Ratinaud, and Verdier 2016; Yan et al., 2016).

2.4.2 Autofàgia com a diana terapèutica en GBM

L'autofàgia juga un paper en la supervivència del tumor i la seva progressió, també en la resposta a les teràpies supressores tumorals. Aquest paper rellevant en la supervivència permet hipotetitzar que la modulació de l'autofàgia pot ésser una via interessant a desenvolupar com a opció terapèutica, sola o ajudant a millorar la eficàcia d'altres quimioterapèutics (Ozpolat et al., 2015).

Molts estudis han confirmat que les cèl·lules de GBM són resistents a l'apoptosi després d'exposicions a radiació ionitzant. La pèrdua de gens com el supressor tumoral PTEN està involucrat en aquest fenomen (Koukourakis et al., 2016).

L'estudi realitzat per Yao et al., (2003) mostra com la irradiació en cèl·lules de GBM resulta en un increment de l'autofàgia però no un increment de l'apoptosi. Finalment Ito et al., (2005) descriuen que les línies cel·lulars de GBM irradiades recurreixen a la parada en cicle i mort per autofàgia com a mecanisme de mort cel·lular.

L'experiència clínica amb agents que manipulen l'autofàgia en el tractament del GBM és molt limitada. La cloroquina, fàrmac aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) per al tractament contra tres espècies de *Plasmodium*, és l'únic inhibidor estudiat en aquest tipus de càncer. Es troba actualment en assaig clínic de fase II. S'administra en forma d'hidroxi-cloroquina conjuntament amb l'estàndard de tractament pel GBM (TMZ i radioteràpia) que condueix a una activitat anti-autofàgica. La toxicitat produïda per aquest tractament (600 mg/dia) combinat el fa clarament inacceptable, perquè en termes de supervivència la millora no es significativa (Rosenfeld et al., 2014).

Les vies reguladores de l'autofàgia també han estat objecte d'estudi com a possibles punts per abordar la inhibició de l'autofàgia. Els inhibidors de mTOR tenen múltiples activitats biològiques, entre les que s'inclou la inducció de l'autofàgia (Chagin et al., 2016). Temsirolimus, medicament aprovat per la FDA l'any 2007 per al tractament del carcinoma renal va ésser testat en pacients amb GBM recurrent mostrant eficàcia clínica en una tercera part dels pacients (Galanis et al., 2005). Everolimus també pertany a la família d'inhibidors de mTOR i va ésser provat en combinació amb l'estàndard de tractament per a pacients amb GBM, amb nuls efectes en la supervivència del pacient (Ma et al. 2015). En combinació amb Bevacizumab (anticòs monoclonal anti-angiogènica) va mostrar millors resultats que l'anterior combinació (Koukourakis, Mitrakas, and Giatromanolaki 2016).

3. CANALS DE CALCI DE TIPUS T

3.1 Homeostasi del calci i la seva rellevància en càncer

El naixement de la idea que el calci (Ca^{2+}) pogués ésser una molècula senyalitzadora aparegué amb el clínic Sydney Ringer, qui va observar que cors aïllats només es podien contraure si el Ca^{2+} estava present en el medi de perfusió (Ringer et al., 1883). A partir d'aquest moment es començà a investigar el paper d'aquest ió en tots els tipus cel·lulars i la seva importància en la senyalització cel·lular.

En condicions de repòs, les cèl·lules mantenen una concentració intracel·lular de Ca^{2+} d'aproximadament 100 nM, mentre que les concentracions extracel·lulars varien entre 1 i 2 mM (Clapham et al., 2007). Els increments en el Ca^{2+} citosòlic lliure poden ser transitoris o sostinguts i ser decodificats per la cèl·lula regulant diferents processos (Stewart et al., 2015).

El Ca^{2+} és un segon missatger que juga un paper fonamental en la senyalització cel·lular, controlant diferents processos com proliferació, diferenciació, creixement i mort cel·lular. Es per aquest motiu que alteracions en la senyalització per Ca^{2+} poden causar defectes diversos, que afecten als processos anteriorment anomenats, així com la invasió i migració, fenòmens íntimament associats a processos tumorals (Santoni et al., 2012).

La distribució del Ca^{2+} als espais intra i extracel·lulars és el resultat del seu transport actiu a càrrec d'ATPases i cotransportadors específics. Les elevacions de la concentració de Ca^{2+} al citosol són localitzades, i la seva magnitud i duració determinen els efectes en la seva senyalització cel·lular. Hi ha quatre compartiments que de manera primària participen en la senyalització de Ca^{2+} : espai extracel·lular, citoplasma, RE i mitocondris. Aquests compartiments estan separats per membranes amb transportadors i canals específics de Ca^{2+} (Prevarskaya et al., 2013).

La transformació de cèl·lula normal a cèl·lula tumoral està associada a canvis en l'homeòstasi de Ca^{2+} intracel·lular que implica canvis d'expressió i/o funció de transportadors i canals permeables al Ca^{2+} , conduïnt a la formació i manteniment d'un fenotip maligne (Déliot et al., 2015; Prevarskaya et al., 2013). A més, la relació entre la senyalització per Ca^{2+} i carcinogènesi es manifesta en que moltes mutacions que condueixen la formació d'oncogens es donen en gens que codifiquen per a proteïnes quinases dependents de calci (Déliot et al., 2015).

Cada tipus cel·lular expressa un únic conjunt de components de senyalització per Ca^{2+} que aporta a la cèl·lula característiques úniques en la senyalització espai-temporal per aquest ió (Berridge et al.,

2003).

Motiani et al., (2013) va descriure que un increment en l'expressió del transportador SOCE (*Store-operated Ca²⁺ entry*) i del Ca²⁺ intracel·lular en línies cel·lulars i cultius primaris de GBM afavoria la invasió cel·lular. Davis et al., (2014) per la seva part va descriure que la senyalització per Ca²⁺ mitjançant diferents transportadors i canals juga un paper important en processos de transició epiteli-mesènquima (EMT) en cèl·lules de càncer de mama adquirint un fenotip més invasiu. A més, estudis recents mostren com la senyalització per canals de Ca²⁺ controla una àmplia varietat de funcions, proliferació i migració també en GICs (Morrone et al., 2016).

Existeixen diverses classes de canals permeables al Ca²⁺ que es troben expressats diferencialment en cèl·lules tumorals i estan involucrats en la seva malignitat (Stewart, Yapa, and Monteith 2015). Els principals canals descrits són els de Ca²⁺ voltatge dependents (VGCC), els receptors purinèrgics i la família de canals TPR (*Transient Receptor Potential*) (Leanza et al., 2015).

3.2 Canals de calci de tipus T (TT-CC)

Al teixit nerviós s'hi expressen diferents tipus de canals de Ca²⁺ activats per voltatge (VGCC) amb una distribució cel·lular i subcel·lular única i específica segons les funcions fisiològiques. L'evolució ha afavorit l'aparició d'una àmplia família de diferents classes de canals de Ca²⁺ i una quantitat addicional de variants obtingudes per *splicing* que presenten propietats biofísiques diferents (Hering et al., 2000).

Els canals de Ca²⁺ es classifiquen en dues categories segons les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques: canals de Ca²⁺ activats per baix voltatge (*Low Voltage-activated*, LVA) i els activats per alt voltatge (*High Voltage-activated*, HVA) (Khosravani et al., 2006). Recentment s'han classificat pel percentatge de identitat en la seqüència d'aminoàcids que componen la subunitat $\alpha 1$ (**Fig 10**). L'aliniament de la seqüència aminoacídica suggereix que la duplicació gènica i la divergència d'un gen ancestral de canal de Ca²⁺ va donar lloc a les subfamílies de LVA i HVA (Perez-reyes et al., 2003).

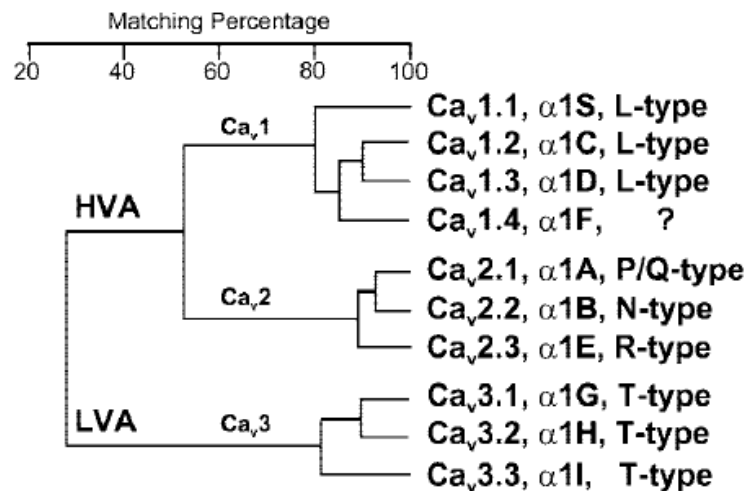


Figura 10. Dendrograma de la classificació dels VGCC basat en la homologia de seqüència i propietats funcionals de la subunitat $\alpha 1$. Extret de Catterall et al., (2005).

Al genoma dels mamífers hi ha deu gens que codifiquen per subunitats formadores de porus ($\alpha 1$) i que es classifiquen en tres famílies per criteri d'homologia de seqüència: Cav1 (originalment anomenada tipus L), Cav2 (tipus N, P/Q i R), Cav3 (tipus T, o TT-CC). La família Cav3 és la més diversa i compren tres isoformes, Cav3.1, Cav3.2 i Cav3.3 que es diferencien per les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques.

Els TT-CC es troben expressats en molts tipus cel·lulars, tant en cèlules excitablement com no excitablement, on estan implicats en processos fisiològics importants i diversos com per exemple la promoció de la secreció hormonal als òrgans endocrins, la regulació de la contracció al múscul llis, la fusió dels mioblastes al múscul esquelètic, o la maduració dels oòcits durant la fertilització (Perez-reyes et al., 2003).

3.2.1 Estructura i funció dels TT-CC

Els TT-CC només contenen la subunitat $\alpha 1$ i no s'ha identificat cap altre subunitat accessòria que es pugui associar a ella. Tot i així, algunes investigacions suggereixen que les subunitats β , μ i δ podrien modular la seva expressió (Dolphin et al., 1999).

La subunitat $\alpha 1$ comprèn quatre dominis transmembrana i dominis intracel·lulars N-terminal i C-terminal (**Fig 11**). Cada domini consisteix en sis hèlix transmembrana (S1-S6). El quart domini transmembrana (S4) conté aminoàcids carregats positivament i residus de lisina cada tres o quatre aminoàcids, conformant aquesta regió el sensor de voltatge i la regió medidora per a l'obertura del canal.

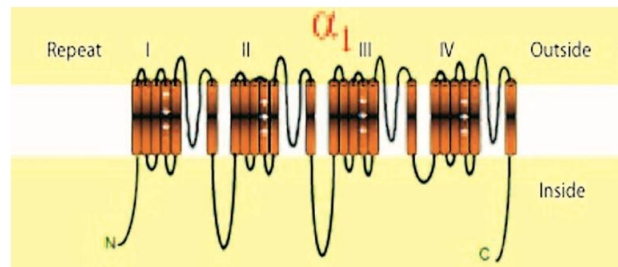


Figura 11. Subunitat $\alpha 1$ del VGCCs. Presenta 4 dominis repetits. Cada domini està format per 6 segments transmembrana (S1-S6). El segment 4 (S4) conté aminoàcids carregats positivament (Lys+ o Arg+), que regulen l'obertura del porus del canal i els segments transmembrana S5 i S6 formen el porus del canal. Modificat d' Iftinca et al.,(2011).

Els segments S5 i S6 són els que conformen el porus del canal que permet el pas dels ions Ca^{2+} . Aquests segments contenen quatre residus de àcid glutàmic formant l'anell de càrrega negativa que contribueixen vers la selectivitat per cations divalents (Ca^{2+} selectivament).

La inactivació dependent de voltatge és una característica important d'aquests canals, i es regulada pels dominis citoplasmàtics que uneixen els dominis de transmembrana I i II (Iftinca et al., 2011). Finalment, les regions citoplasmàtiques de la subunitat $\alpha 1$ del canal de Ca^{2+} formen llocs d'interacció per a proteïnes reguladores que poden ésser substrats per a fosforilacions.

3.2.2 Inhibidors farmacològics dels TT-CC

Els antagonistes dels canals de calci dependents de voltatge (*Calcium Channels Blockers*, CCBs) s'utilitzen principalment com a fàrmacs antihipertensius. Els CCBs són particularment eficaços contra la gran rigidesa dels vasos, una de les causes comunes de l'elevada pressió sistòlica en els pacients d'edat avançada. Els CCBs també s'utilitzen per alterar la freqüència cardíaca, per prevenir el vasoespasme cerebral, i per reduir el dolor al pit causat per l'angina de pit. Els VGCCs de tipus N, tipus L i tipus T són presents a la zona glomerular de la glàndula suprarenal humana, i els CCBs poden influir directament en la biosíntesi d'aldosterona en les cèl·lules de l'escorça suprarenal, amb el conseqüent impacte en el tractament clínic de la hipertensió (Chen et al., 2010). A més, s'ha descrit que els CCBs poden tenir un rol antiproliferatiu, podent ser futurs agents antineoplàsics (Lijnen et al., 1999).

Diversos CCB poden afectar els TT-CCs amb diferents graus d'especificitat. El Mibefradil, es distingeix d'altres antagonistes dels VGCC, degut a la seva major afinitat (10 a 20 vegades superior) pels LVA (tipus T) (Mishra et al., 1994). El Mibefradil es va introduir el 1997 clínicament com a fàrmac per a l'angina de pit i antihipertensiu, però va ser retirat del mercat un any després del seu

llançament a causa d'interaccions adverses amb β -bloquejants i agents hipolipemians (Mullins et al. 1998). No obstant això, en els últims anys s'ha tornat a introduir en la pràctica clínica amb la condició de medicament orfe, per al tractament de càncers de pàncrees, GBM i càncer d'ovari per la FDA (clinicaltrials.gov, n.d.). El Mibefradil ha estat reconegut com un inhibidor de la proliferació en molts tipus de línies cel·lulars diferents, incloent cel·lules mononuclears de la sang (Lijnen, Fagard, and Petrov 1999), cel·lules de múscul llis de rata (Schmitt et al., 1995), GBM (Chemin et al., 2001) i retinoblastoma (Hirooka et al., 2002). A part de les seves propietats anti-proliferatives, el Mibefradil ha demostrat que pot afectar a la motilitat cel·lular i les propietats invasives del fibrosarcoma HT1080 (Huang et al., 2004). Els efectes antitumorals del Mibefradil també s'han investigat en cel·lules tumorals *in vivo*. Taylor et al., (2008) van observar que la injecció local de Mibefradil induïx la mort de cel·lules de carcinoma de mama humana implantades en el teixit adipós subcutani de ratolí (Taylor et al., 2008).

Per altra banda s'ha desenvolupat un anàleg del Mibefradil anomenat NNC 55-0396 que inhibeix els TT-CC i alhora també els HVA però amb una elevada selectivitat per als TT-CC; la principal diferència amb el Mibefradil és que els efectes d'aquest últim són deguts principalment al metabòlit secundari que es genera quan s'hidrolitza causant una inhibició molt més potent als HVA; mentre que l'NNC 55-0396 fins a dosi de 100 μM no produeix aquesta inhibició sobre HVA així doncs els efectes que veiem són deguts única i exclusivament al bloqueig selectiu dels TT-CC (Li et al., 2005).

El fàrmac antipsicòtic Pimozide també és un potent inhibidor dels TT-CCs i del tipus L, però amb menys selectivitat que el Mibefradil (Galizi et al., 1986). En les cel·lules de la glàndula pituitària i del cor, el Pimozide va demostrar inhibir l'activitat dels canals de tipus L, mentre que en les cel·lules de la glàndula glomerular i espermatozous immadurs, el Pimozide impedia el flux de Ca^{2+} mitjançant el bloqueig dels TT-CCs (Arnoult et al., 1998). El Pimozide també s'ha observat que inhibeix la proliferació de cel·lules de càncer de mama (Strobl et al., 1998) i astrocitoma (Lee et al., 1985). El Pimozide s'ha introduït en assajos clínics de pacients amb melanoma, però els seus efectes beneficiosos s'atribueixen al bloqueig de receptors de dopamina (Neifeld et al., 1983).

En un estudi posterior a la caracterització dels canals en línies de melanoma es va descriure que inhibidors farmacològics de TT-CCs induïxen una parada del cicle cel·lular en fase G_1 i, addicionalment, desencadenen una mort apoptòtica de les cel·lules de melanoma que depèn parcialment de l'activació de les caspases mitocondrials (Das et al., 2013). Un anàlisi en profunditat del procés, va revelar que l'apoptosi era precedida per una activació d'estress de RE i la posterior inhibició del flux autofàgic, que és actiu de forma constitutiva en les cel·lules de melanoma. Aquests mateixos efectes es van observar amb els silenciaments gènics de Cav3.1 i Cav3.2, permetent així la identificació dels TT-CCs com a noves dianes que desregulen l'autofàgia i permeten induir

l'apoptosi en cèl·lules de melanoma (Das et al., 2013; Macià et al., 2015).

3.2.3 Implicació dels TT-CC en la transformació i progressió del càncer

Part de la transformació neoplàsica al cervell pot estar associada a les alteracions en la regulació dels canals de calci. La transformació d'una cèl·lula normal a una cèl·lula tumoral pot estar relacionada amb les oscil·lacions de Ca^{2+} , i el desequilibri de l'homeostasi pot definir el fenotip maligne, incloent un increment de la proliferació, increment de la migració, invasió i mort cel·lular anormal (Morrone et al., 2016).

En la **figura 12** es pot observar una hipotètica remodelació de la senyalització per Ca^{2+} en una cèl·lula normal front una cèl·lula tumoral i les seves possibles conseqüències en proliferació, resistència a l'apoptosi i activació transcripcional.

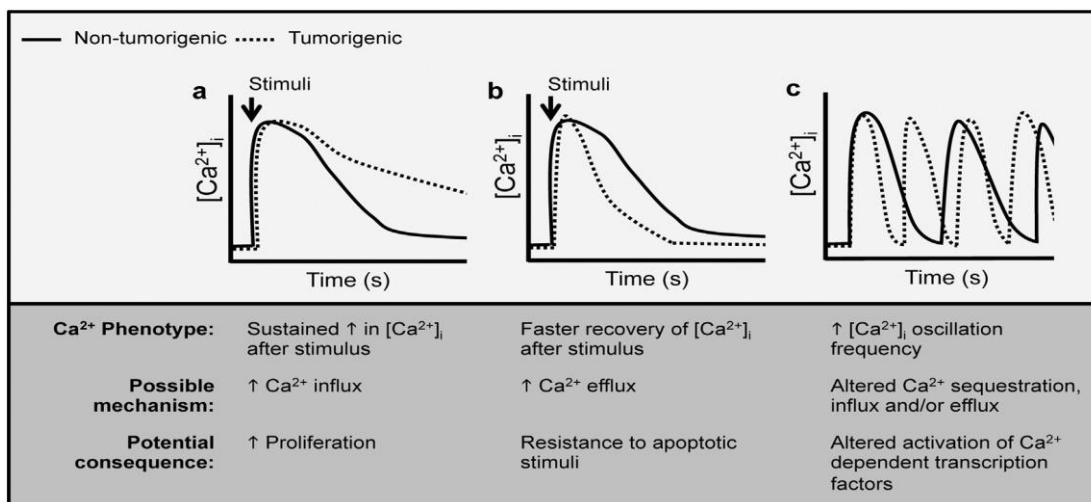


Figura 12. Possible remodelació del senyal de Ca^{2+} . a) Rutes alterades per entrada de Ca^{2+} ; b) vies alterades per sortida de Ca^{2+} en cèl·lules tumorigèniques; c) oscil·lacions en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} .

Els TT-CC es troben diferencialment expressats en cèl·lules normals i tumorals i, per tant, aquests canals jugarien un paper clau en la regulació de processos tumorals (Monteith et al., 2012; Stewart et al., 2015). Degut a això s'han convertit en els darrers anys en una diana atractiva per al seu ús en teràpies contra el càncer (Dziegielewska et al., 2014).

S'ha descrit que la proliferació en cèl·lules de glioma implica l'increment de Ca^{2+} intracel·lular (Pinto et al., 2015). Els TT-CC semblen especialment adients per promoure la progressió de cicle cel·lular gràcies a la seva ràpida activació i despolarització dèbil. Aquesta característica permet

augmentos transitoris de Ca^{2+} citosòlic en cèl·lules no excitable afavorint la progressió mitòtica a través de la unió directa de Ca^{2+} a efectors intracel·lulars com es la calmodulina (CaM) (Kahl et al., 2003). Els canvis en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} es relacionen amb una major taxa de transcripció de gens responsables en la regulació del cicle cel·lular entre els que destaquen c-fos, c-jun, Cyclic AMP response element (CRE), ciclines D, E, A i B, ciclines dependents de kinases (CDK) i proteïnes responsables del pas de la cèl·lula de G_0 a G_1 (Panner et al., 2005) (**Fig 12**).

Zhang et al., (2012) demostrà que els TT-CC tenen un paper fonamental en la progressió del GBM, ja que al bloquejar selectivament els TT-CC en línies cel·lulars de GBM aquestes presentaven una disminució en la proliferació i migració cel·lulars.

Valerie et al., (2013) va afegir que aquest efecte es trobava mediat per una disrupció en la senyalització de la ruta Akt, que conduïa a la mort per apoptosi en cèl·lules de GBM (**Fig 13**). En models murins l'efecte del bloqueig farmacològic dels TT-CC va produir una disminució del creixement del tumor degut a una parada en cicle en fase G_1/S , a més d'una potenciació de l'efecte de la TMZ (Keir et al., 2013).

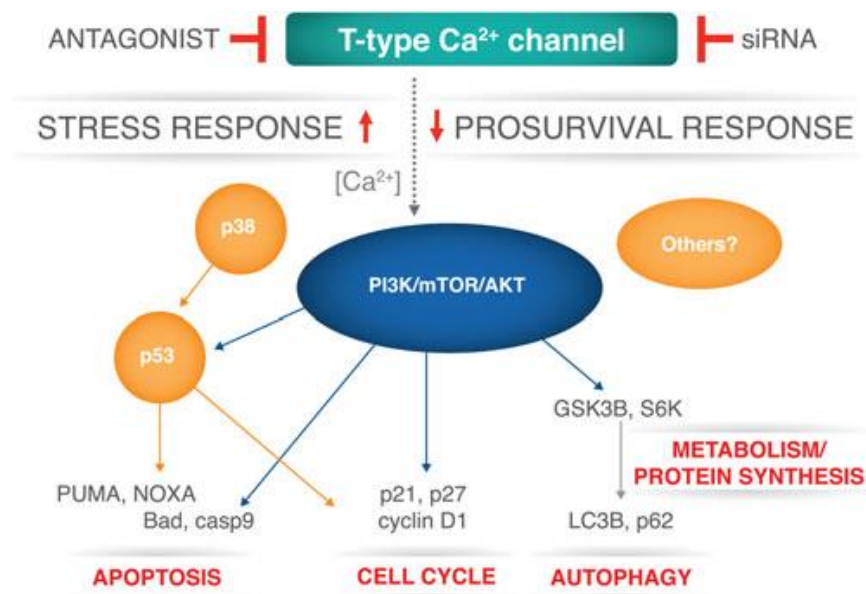


Figura 13. Rutes de senyalització rellevants per a la proliferació cel·lular i la seva relació amb els TT-CC. Extret de Valerie et al.,(2013).

La hipòxia dirigeix el GBM cap un fenotip més maligne i agressiu (Chigurupati et al., 2010). La senyalització per Ca^{2+} , a més de l'activació de PKC estimula la transcripció de HIF1 α durant events hipòxics que inhibeix l'activitat de mTOR, activant l'autofàgia (Hui et al., 2006). El bloqueig farmacològic amb un derivat de Mibefradil (NNC-55-0396), així com el silenciament gènic de TT-

Introducció

CC condueix a la supressió de HIF 1 α en condicions hipòxiques i subsequentment a la mort cel·lular (Leanza et al., 2015).

Maiques et al., (2017) van descriure una major expressió de la isoforma Cav3.2 en melanoma metastàtic respecte melanoma primari, associant l'increment de Cav3.2 amb una major expressió de marcadors proliferatius i hipòxics. Aquests resultats relacionen l'expressió de Cav3.2 amb el grau de malignitat del tumor, convertint aquest canal en un marcador de pronòstic a tenir en compte en la progressió tumoral. Estudis recents realitzats per Zhang et al., (2017) corroboren que Cav3.2 es troba sobreexpressat en GBM i en GICs i que aquesta sobreexpressió està lligada a un pitjor pronòstic dels pacients (Niklasson et al., 2017).

No obstant, en alguns tipus de càncer els gens que codifiquen per TT-CC mostren una baixa expressió en comparació amb el teixit normal corresponent, suggerint que podrien tenir un paper com a supressors tumorals (Phan et al., 2017; Sallán et al., 2017).

3.3 Implicació dels TT-CC en l'estrés de RE i l'autofàgia

En la cèl·lula existeixen una gran diversitat de transportadors específics, canals i proteïnes d'unió al Ca²⁺ que són utilitzats per les cèl·lules per expulsar Ca²⁺ a través de la membrana plasmàtica, així com transportar-ho als reservoris intracel·lulars i regular la seva concentració citoplasmàtica. L'entrada de Ca²⁺ pot obrir canals de Ca²⁺ presents al RE, resultant en elevacions localitzades d'aquest ió que són decodificades a través d'una àmplia varietat de efectors dependents de Ca²⁺ (Macià et al., 2015).

La modulació, tant de l'expressió com de la funció dels canals de Ca²⁺ afecta a les concentracions intracel·lulars de Ca²⁺ i conseqüentment als processos dependents d'ell, com són la proliferació, autofàgia i apoptosi (Vandenbergh et al., 2010). A més, defectes en l'expressió i/o funció d'aquests canals estan involucrats en un gran nombre de patologies, incloent la tumorigènesi, ja que un increment de l'expressió i/o funció d'aquests canals pot conduir a una elevada concentració de Ca²⁺ intracel·lular i a l'activació de rutes proliferatives dependents d'ells (Kondratskyi et al., 2013).

Implicació dels TT-CC en l'estrés de RE

El RE és el principal reservori de Ca²⁺ de la cèl·lula. Mentre la concentració de Ca²⁺ citosòlic en estat basal es de 100 nM, al RE pot arribar a tenir una concentració de fins a 1mM, dependent del

tipus cel·lular. Aquestes elevades concentracions son essencials per mantenir funcionals les xaperones que ajuden al correcte plegament de les proteïnes (Kania et al., 2015).

La depleció de Ca^{2+} , la deprivació de glucosa (que limita la capacitat de glicosilació proteica) o events hipòxics durant els quals la formació de ponts disulfur es veu reduïda, esdevé en un malplegament de les proteïnes i l'activació de la cascada coneguda com UPR, la qual impulsa la sortida de Ca^{2+} des del RE al citoplasma activant nombroses quinases i proteases que resultarien en l'activació de l'autofàgia o de la mort cel·lular (Høyer-Hansen et al., 2007; Johnson et al., 2014).

Front determinats estímuls fisiològics, el Ca^{2+} surt del RE, estimulant alhora l'influxe de Ca^{2+} des de la membrana plasmàtica. Aquest ràpid increment sostingut de Ca^{2+} en el citoplasma regula proteïnes efectores depenents de Ca^{2+} (calpaines, quinases, fosfatases, canals iònics). Finalment el Ca^{2+} es bombejat un altre cop dins el RE i el citoplasma normalitza la seva concentració (Raffaello et al., 2016).

La sortida de Ca^{2+} des del RE no només resulta en un increment de la concentració d'aquest ió en el citoplasma, sinó també en el mitocondri i en els lisosomes. Això es deu a que existeixen punts de contacte entre el RE i aquests dos orgànuls (Kania et al., 2017). Els receptor *Inositol trisphosphate receptor* (IP3-R) és un dels encarregats de donar sortida als ions de Ca^{2+} des del RE (Rizzuto et al., 2016) (**Fig 14**). Nivells elevats d'IP3-R i/o la seva activitat desregulada en càncer de mama o GMB esdevenen en una proliferació cel·lular descontrolada, major agressivitat del tumor i resistència a fàrmacs (Kang et al., 2010; Szatkowski et al., 2010).

La sortida de Ca^{2+} des del RE al citoplasma també pot donar-se a través dels *Ryanodine receptors* (RyRs), una família de canals de calci que s'activen per despolarització de la membrana del RE. L'activació sostinguda d'aquests canals aconseguix deplecionar les reserves intracel·lulars de Ca^{2+} del RE produïnt una sobrecàrrega de Ca^{2+} en el citoplasma, disfunció mitocondrial, estrés de RE i mort cel·lular per apoptosi (Bahar, Kim, and Yoon 2016). L'entrada de Ca^{2+} des del citoplasma al RE es produeix mitjançant el procés conegut com *Store Operated Ca^{2+} Entry* (SOCE) que permeten aturar l'entrada de Ca^{2+} des de l'espai extracel·lular i restaurar l'homeostasi del RE. El mecanisme de SOCE està mediat per dues proteïnes (STIM2 i ORAI). Durant la depleció de Ca^{2+} la proteïna STIM interacciona amb ORAI, que és una proteïna de membrana plasmàtica que forma un porus conductor de Ca^{2+} , incrementant el fluxe de Ca^{2+} des de l'espai extracel·lular al RE (Hogan et al., 2015).

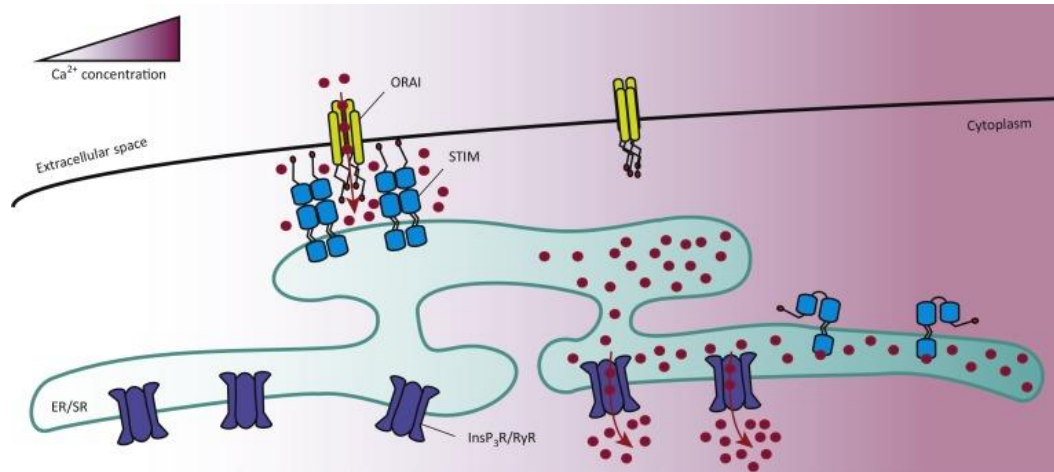


Figura 14. Entrada i sortida de Ca^{2+} al RE a través de SOCE (ORAI i STIM) i IP_3R localitzats ambdós a la membrana del RE (Raffaello et al., 2016).

Implicació dels TT-CC en l'autofàgia

El Ca^{2+} es capaç de regular diferents etapes del procés autofàgic. Aquest pot entrar al citosol, on activa o inactiva proteïnes reguladores, enzims, factors de transcripció o xaperones moleculars (Kania et al., 2015) des de l'exterior a través de la membrana plasmàtica, des del RE i lisosoma a través de diferents canals de Ca^{2+} (Berridge, Bootman, and Roderick 2003).

A la següent taula (**Taula 4**) es mostren els òrgànuls i estructures on trobem canals de Ca^{2+} associats que permeten increments d'aquest ió al citoplasma, on pot regular d'aquesta manera diferents passos en l'autofàgia.

Òrgànul/ estructura cel·lular d'on prové el Ca^{2+}	Canal de Ca^{2+} pel qual passa al citoplasma	Referència
Exterior a través de la membrana plasmàtica	TPR- Family	(Morrone et al., 2016)
	VGCC	
RE	IP_3R	(Raffaello et al., 2016)
	RyR	
Lisosomes	MCOLN	(Medina et al., 2015)
	TPC	
Mitocondri	MCU	(Petrungaro et al., 2015)

Taula 4. Òrgànuls i canals de Ca^{2+} associats que permeten canvis en la concentració d'aquest ió al citoplasma, que poden regular diferents passos de l'autofàgia.

Un dels mecanismes més investigats d'inducció d'autofàgia que involucra l'activitat de canals de

Ca²⁺-IP3R-es la via IP3-R-Beclin 1-Bcl2. Aquesta via s'activa en resposta a l'estrés de RE i l'activació de la UPR, resultant en la inhibició del complex mTOR i l'activació de l'autofàgia. La funció del receptor IP3-R és dual, per una banda regula la senyalització que condueix a esdeveniments apoptòtics i per altre condueix a la inducció de l'autofàgia (Vicencio et al. 2009)(Fig 15).

Altres mecanismes que esdevenen en una inducció de l'autofàgia en els primers estadis de formació de l'autofagosoma i que involucren el Ca²⁺ són els que comprometen la transferència de Ca²⁺ des del RE al mitocondri, que condueix a una disfunció d'aquest orgànul disminuint la ratio ATP/AMP que activa AMPK, inhibeix mTOR i activa l'autofàgia (Filippi-Chiela et al. 2016) (Fig 15).

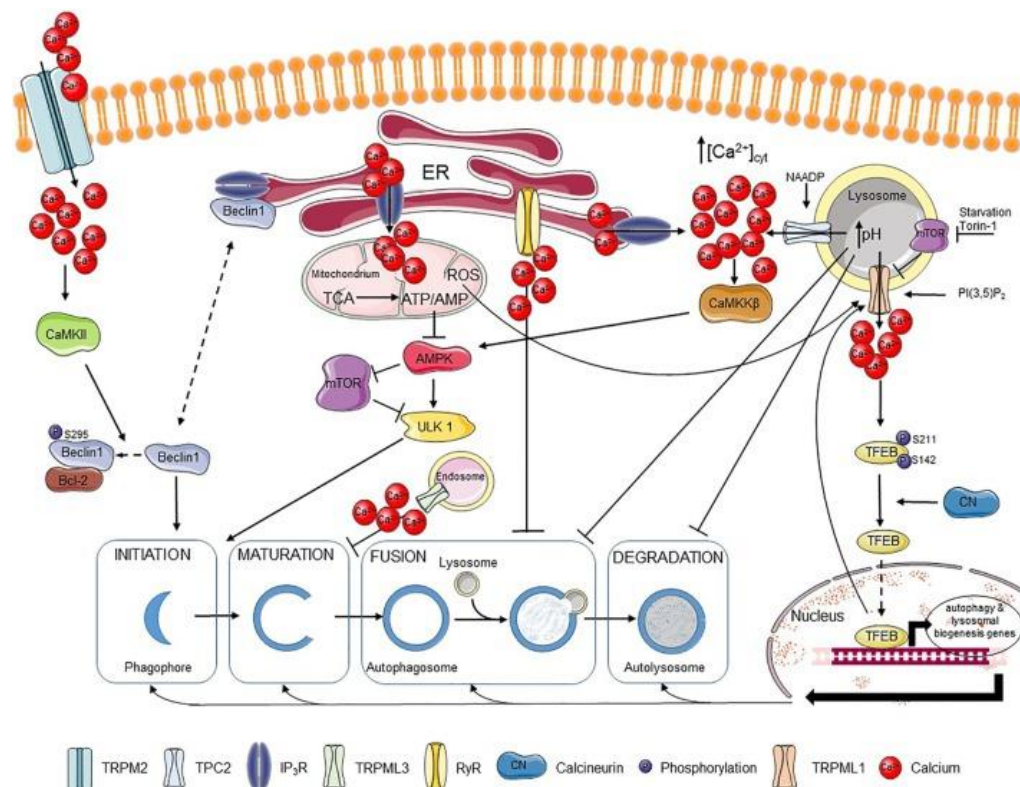


Figura 15. Il·lustració de les rutes principals en les quals el Ca²⁺ s'ha proposat com a regulador i promotor de l'autofàgia. S'il·lustren aspectes de la via canònica de l'autofàgia i el procesament dels autofagosmes, indicant els llocs en els quals la regulació per Ca²⁺ pot estar succeint (Kania et al., 2017).

L'altre relació fonamental entre el Ca²⁺ i l'autofàgia és la sortida de Ca²⁺ des dels lisosomes a través de canals iònics com poden ser CIC7 o MCOLN1. Aquest procés alcalinitza l'interior d'aquest orgànul, impedit la fusió de l'autofagosoma madur amb el lisosoma i bloquejant d'aquesta manera el fluxe autofàgic (Morgan et al. 2013). Noves evidències demostren que el lisosoma és capaç d'actuar com un orgànul senyalitzador que sense la disponibilitat de nutrients i genera respostes adaptatives per tal de tornar a l'estat homeostàtic cel·lular. Medina et al., (2015) van descobrir que

Introducció

a través de la sortida de calci del lisosoma aquest orgànul activa TFEB via la fosfatasa calcineurina que coordina la transcripció de gens involucrats en la biogènesi lisosomals i autofàgia (**Fig 15**).

Es va associar l'expressió de Cav3.1 amb marcadors d'autofàgia en cèl·lules de melanoma (Maiques et al., 2017). També que la seva inhibició/ silenciament gènic s'associen amb un bloqueig de l'autofàgia (Das et al., 2013). Malgrat tot, sembla que la relació entre els TT-CC i l'autofàgia és de doble cara, perquè Rim et al., (2014) varen demostrar que el bloqueig TT-CC provoca una inducció de l'autofàgia i de l'apoptosi a través de la generació de ROS, basat en la inhibició de la captació de glucosa provocant un efecte citotòxic en un model d'adenocarcinoma pulmonar. Per altra banda el bloqueig dels VGCC, tant els de tipus L com de tipus T són capaços d'inhibir l'autofàgia i promoure l'apoptosi en cèl·lules de melanoma (Das et al., 2013). Consistentment amb els resultats obtinguts en melanoma Valerie et al., (2013) descriu la mort per apoptosi en cèl·lules de GBM.

El bloqueig farmacològic d'aquests canals condueix inexorablement a una disrupció en la senyalització per Ca^{2+} que té conseqüències diverses sobre l'autofàgia degut a la capacitat de cada cèl·lula de compensar el procés.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I CONTEXT

La nostra hipòtesi de partida és que els TT-CC estan implicats directa o indirectament amb el procés autofàgic, promovent la supervivència de les cèl·lules de GBM.

Prèviament, treballs pioners en melanoma van mostrar com la inhibició/silenciament dels TT-CC desregulaven l'autofàgia i portaven a la mort cel·lular (Das et al., 2013). Per altra banda, altres autors van mostrar que el silenciament o la inhibició farmacològica (amb Mibefradil) dels TT-CC també resulta en la mort de cèl·lules de GBM (Valerie et al., 2013). Treballs recents han apuntat a que la inhibició de TT-CC i el silenciament de Cav3.2 porten a la mort cel·lular de les cèl·lules mare de glioma (Niklasson et al., 2017; Zhang et al., 2017). No obstant, la relació entre autofàgia i TT-CC no ha estat estudiada en aquests treballs.

Els objectius concrets que ens hem plantejat han estat:

- 1- Analitzar l'expressió de TT-CC en línies cel·lulars de GBM, línies resistents al fàrmac TMZ, cultius primaris derivats de pacients i biòpsies de GBM primari i recurrent, així com en condicions d'hipòxia moderada/fisiològica (2% O₂).
- 2- Estudiar la UPR i l'autofàgia en tractaments aguts i crònics de TMZ en cèl·lules de GBM.
- 3- Investigar la relació entre els TT-CC i l'autofàgia en línies cel·lulars de GBM i resistent a TMZ: estudiar l'efecte del bloqueig farmacològic i la inhibició gènica dels TT-CC sobre l'autofàgia i la viabilitat cel·lular.
- 4- Analitzar l'impacte dels bloquejants de TT-CC sobre la viabilitat cel·lular en condicions d'hipòxia i en cultius 3D en càmeres microfluídiques.

L'assoliment d'aquests objectius podria contribuir a identificar els TT-CC com a possibles dianes terapèutiques en el GBM, tumor de fatal pronòstic.

MATERIALS I MÈTODES

1. Cultius cel·lulars 2 dimensions (2D)

1.1 Línies cel·lulars i el seu cultiu

Les línies cel·lulars amb les quals s'ha treballat són les línies de GBM, A172, U87-MG i U251-MG les quals es van obtenir de la *American Type Culture Collection* (ATCC). La línia resistent al fàrmac Temozolomida es va generar *de novo* al nostre laboratori. Els cultius cel·lulars primaris derivats de biòpsies de pacients varen ésser establerts al nostre laboratori a partir de teixit obtingut per neurocirurgia a l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV).

Les línies cel·lulars A172, U87-MG i U251-MG van ésser cultivades en medi MEM (*Minimal Essential Medium*, Lonza[®]) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS; Thermo Scientific[®]) prèviament inactivat per calor; 2 mM L-Glutamina (Thermo Scientific[®]); aminoàcids no essencials (NEAA; Invitrogen[®]) i 20 U/ml penicil·lina (Thermo Scientific[®]) i 20 µg/ml estreptomicina (Thermo Scientific[®]), anomenat MEM complet. Els stocks de cèl·lules es varen sembrar en plaques de cultiu estàndard de 100 mm. Es tracta de línies cel·lulars que creixen en adherència. Pel seu desenganxament de la placa es va fer servir tripsina-EDTA 1X (Invitrogen[®]). Aquestes línies creixen en incubadors de CO₂ (Thermo Scientific[®]) a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂. Les cèl·lules es testen periòdicament per a descartar la presència de micoplasma. Els cultius cel·lulars emprats per a l'elaboració dels experiments d'aquesta tesi van ésser negatius per contaminació per micoplasma.

En el cas de les cèl·lules cultivades en hipòxia (2% O₂, 93% N₂, 5% CO₂), varen ésser sembrades en normòxia i 24 hores després, quan ja estan adherides a la placa es traslladaren a la cambra hipòxica In Vivo2 (Ruskin Technologies[®], Leeds, UK).

1.1.1 Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T

La línia humana HEK 293T de ronyó embrionari és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes. És una variant de la línia cel·lular humana de l'epiteli renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. És una línia cel·lular que creix molt ràpid i que es transfecta molt fàcilment, és per aquesta raó que en aquest treball s'utilitzen les HEK 293T per a la producció de virus. Aquestes cèl·lules creixen en medi DMEM suplementades amb 10% FBS, 1 mM de sodi piruvat, NEAA i 20 U/ml de penicil·lina i 20 µg/ml estreptomicina a 37°C i 5% CO₂.

Materials i Mètodes

1.1.2 Cultius primaris

Els cultius primaris de gliomes van ésser establerts a partir de biòpsies de pacients obtingudes de pacients de la Unitat de Neurocirurgia de l'HUAV, prèvia obtenció d'un consentiment informat dels pacients.

De la peça de tumor extreta pels neurocirurgians, es va conservar una part per a la posterior extracció de DNA (congelant-la immediatament en nitrogen líquid), una altra part per l'extracció de RNA (cobrint la mostra amb Trizol (Invitrogen®) i conservant-la a -80°C). Una darrera part de la biòpsia s'utilitzà pel cultiu *in vitro*, processant-se en menys de 2 hores de la seva extracció. Tot el protocol i el posterior cultiu de les mostres es realitzen en una campana de bioseguretat Bio2A.

Durant el procediment, el teixit es renta dos cops amb tampó fosfat salí (PBS 1x) i els coàguls i les zones necròtiques s'eliminen per tal de no interferir amb el cultiu. El teixit es fragmenta en trossos d'uns 5 mm² i cada tros es col·loca en un eppendorf amb 1 ml de PBS 1x que conté col·lagenasa al 0,025 % (Worthington®) i DNasa (Sigma-Aldrich®) a 4800 U/ml durant 2 hores a 37°C i en agitació. Un cop passat aquest temps, el cultiu es filtra amb filtres de nilon de 70 µm (BD®) per tal d'eliminar el teixit que no s'ha digerit. A continuació, el cultiu es centrifuga i el pellet es renta dues vegades amb PBS 1x (Bruna et al. 2007). Finalment, el pellet es sembra en medi DMEM suplementat amb 10% FBS i 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomicina. Al dia següent, es realitza un canvi de medi i es permet que les cèl·lules creixin fins a un 90% de confluència i després es divideixen 1:2.

1.1.3 Generació i cultiu de la línia cel·lular resistent al fàrmac Temozolomida

Es va crear una línia resistent al fàrmac TMZ, amb la intenció d'establir un model de resistència a aquesta droga àmpliament utilitzada en el tractament del GBM (Robin et al.,2017). Aquesta línia cel·lular resistent (RC, Resistant Cell line) va ser creada a partir de la línia A172 aplicant dosis creixents i constants de TMZ, partint d'una concentració inicial de 20 µM en una placa de cultiu de 60 mm. Quan les cèl·lules arribaven a confluència es dividien 1:2 en dues plaques de 60 mm; una placa es mantenia amb la concentració de TMZ de la que provenia i en l'altra s'incrementava la seva concentració en 10 µM; les cèl·lules exposades que suportaven la dosi superior administrada i eren capaces de créixer fins a confluència i es procedia a fer una nova dilució 1:2, es continuava amb aquest stock de dosi superior fins arribar a una concentració de 200 µM com a dosi de resistència. S'anomenen clons (RC1, RC2) perquè a la concentració de 80 µM va haver una mort massiva i només sobrevisqueren dues cèl·lules a la placa que van ésser les úniques capaces de proliferar a aquesta concentració i suportar els següents increments de dosi de TMZ, així doncs es

van separar aquestes dues poblacions resistents i sorgides a partir d'una única cèl·lula i es van anomenar RC1 i RC2.

Aquestes cèl·lules han estat mantingudes en medi MEM complet amb 200 µM de TMZ en cultiu en incubadors (Thermo Scientific®) en una atmòsfera humida a 37°C, 5% de CO₂ i 21% O₂. Després de la descongelació, TMZ s'afegeix al dia següent de la descongelació i es mantenen constantment amb 200 µM de TMZ durant el seu cultiu.

1.1.4 Generació de U251-MG amb transfecció estable amb GFP

La línia cel·lular U251-MG-GFP va ésser obtinguda del laboratori I3A de la Universitat de Saragossa. Aquesta línia va ser transfectada de manera estable utilitzant el vector lentiviral GFP, cedit amablement per el Dr. Prats de la Universitat Paul Sabatier, Toulouse, França.

Per a la incorporació del GFP es van sembrar 5x10⁴ cèl·lules per pouet. El medi de cultiu va ser substituït després de 24 hores per Protamine supplemented-OptiMEM (5 µg/ml, Sigma-Aldrich, P4020) mesclat amb una suspensió lentiviral en una ràtio 1:1. Després de 24 hores de transfecció el medi va ser reemplaçat per medi de cultiu fresc i les cèl·lules van ser cultivades de manera habitual en 2D durant dues setmanes.

L'eficàcia de la transfecció va ésser verificada mitjançant microscòpia de fluorescència i citometria de flux (BD, FACSAria®) amb més d'un 90% de cèl·lules positives per a GFP.

1.1.5 Descongelació, manteniment i congelació

Alíquotes tant de les línies cel·lulars com els cultius primaris són guardades en nitrogen líquid per emmagatzemar-les durant molts anys. Per tal de descongelar les cèl·lules d'una manera adequada, s'extrauen els criotubs del nitrogen líquid i directament es passen a un bany a 37°C, donat que per una descongelació òptima és necessari que aquesta sigui molt ràpida. Una vegada descongelats els tubs, el contingut es transfereix a un tub amb 10 ml amb medi complet i es centrifuga 5 minuts a 1000 rpm, s'elimina el sobrenedant per eliminar el dimetil sulfòxid (DMSO; Sigma Aldrich®) i el pellet es sembra amb medi complet. Al dia següent es canvia el medi per eliminar possibles cèl·lules mortes que puguin interferir en el cultiu.

Una vegada aquestes cèl·lules arriben a la confluència, és necessari "dividir-les". Breument, les cèl·lules es renten amb PBS 1x, i s'incuben amb tripsina-EDTA (Invitrogen®) a 37°C durant 3

Materials i Mètodes

minuts. Quan les cèl·lules estan desenganxades es transfereixen a un tub que conté medi complet, de manera que el sèrum inactivarà la tripsina. Es centrifuguen 5 min a 1000 rpm i s'elimina el sobrenedant. El pellet es resuspén en medi i la quantitat corresponent depenent de la dilució es sembra en una nova placa que contengui medi complet. Per regla general, en les línies cel·lulars de GBM (A172, U251-MG i U87-MG) apliquem una dilució 1:3, per les HEK 293T una dilució 1:10, mentre que per als cultius primaris una dilució 1:2. Les línies cel·lulars es passen dos cops per setmana, mentre que els primaris degut a la seva baixa velocitat de creixement es passaran quan arribin a confluència, però en el cas dels primaris es canvia el medi dos cops per setmana.

Finalment, per congelar alíquotes de cèl·lules en nitrogen líquid, aproximadament un milió de cèl·lules són resuspeses en 850 µl de FBS i transferides a un criotub on gota a gota afegirem 150 µl de DMSO. Per a una congelació òptima, les cèl·lules s'han d'anar refredant poc a poc, idealment, a un grau per hora. En el nostre cas, transferim els criotubs a un tanc de congelació a -80°C que conté isopropanol, fent que l'intercanvi de fred sigui lent durant 24 hores. Després d'aquest període les cèl·lules són transferides al nitrogen líquid on poden romandre durant anys.

2. Cultius cel·lulars en 3 dimensions (3D)

2.1 Cultiu en càmbres microfluídiques (Be-Gradient) 3D

Descripció dels microdispositius Be-Gradient

El material del qual estan fets aquests dispositius és el poliestirè. La geometria del dispositiu inclou una cambra central de 2000 µm d'amplitud flanquejada per dues microcambres laterals de 700 µm d'amplitud. La profunditat de la cambra és de 250 µm el que permet el cultiu en 3D. La microcambra central està delimitada per pilars que connecten les microcambres laterals amb la central i per les quals afegim el medi de cultiu.

La microcambra central es confina amb les cèl·lules mesclades amb hidrogel creant el cultiu en 3D i a través de les microcambres laterals arriben els nutrients i l'oxigen a les cèl·lules situades en la microcambra central (**Fig 16**).

Els microdispositius Be-gradient venen degudament empaquetats de forma individual i esterilitzats, *ready to use*. Aquests microdispositius han estat generats per la empresa Beonchip®.

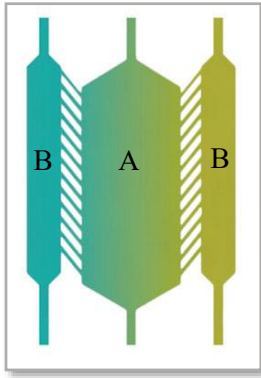


Figura 16. Representació esquemàtica del microdispositiu Be-Gradient de l'empresa Beonchip®. (A) Microcambra central, lloc de disposició de la mescla de hidrogel de col·lagen i cèl·lules. (B) Microcambres laterals preparades per l'adició de medi de cultiu o estímul.

Cultiu 3D al dispositiu Be-Gradient

Per a la preparació del cultiu tridimensional vàrem fer servir cèl·lules U251-MG-GFP en hidrogel de col·lagen. Tots els reactius van ser mantinguts en gel fins al moment de confinar el xip. Es varen tripsinitzar i comptar les cèl·lules per tal d'obtenir una quantitat de 80×10^6 cèl·lules/ml. La relació d'hidrogel de col·lagen i cèl·lules va ésser 1:1. Per 200 μl de cèl·lules i hidrogel de col·lagen es varen necessitar 58.54 μl de col·lagen tipus I (4.01 mg/ml, Corning 354236); 1.46 μl de NaOH 1N (Sigma 655104); 20 μl de DMEM 5x (Sigma D5523), 100 μl de cèl·lules en suspensió i 20 μl d' H_2O estèril. D'aquesta mescla (hidrogel i cèl·lules) es van agafar 10 μl i van ésser injectats a la microcambra central amb la finalitat de confinar-ho mitjançant la micropipeta. És recomanable depositar una gota sobre l'*inlet* d'entrada per evitar la evaporació durant la manipulació del xip. Una vegada acabat aquest procés els dispositius es giren durant uns minuts a temperatura ambient i després s'introdueixen a l'incubador (37°C i 5% CO_2) durant 15 minuts per permetre la polimerització del hidrogel de col·lagen.

Posteriorment, es va introduir medi complet DMEM en cadascun dels canals laterals per abastir les cèl·lules d'oxigen i nutrients que difondran al llarg de la cambra central. També es va afegir 4 ml de medi de cultiu a la placa Petri on estan els xips adherits.

A la **figura 17** es mostra el procediment de confinament de xip Be-Gradient. (A) Per aconseguir confinar el xip és imprescindible que aquest es trobi eixut en la seva totalitat. (B) Agafem 10 μl de la mescla d'hidrogel de col·lagen i cèl·lules situant la punta de la micropipeta sobre l'inlet central pressionant molt lentament per tal d'injectar el líquid dins el xip. (C i D) Quan el líquid arriba a l'entrada de la microcambra s'ha de pressionar fins que entri dins ella. (E i F) Quan el front de la mescla està ja dins la microcambra, no és necessari continuar pressionant ja que si es deposita líquid sobre l'inlet el sistema s'omplirà espontàniament. (G) Una vegada ple el dispositiu és molt important no pressionar ni injectar més líquid o es provocarà la pèrdua de confinament o invasió de les microcambres laterals.

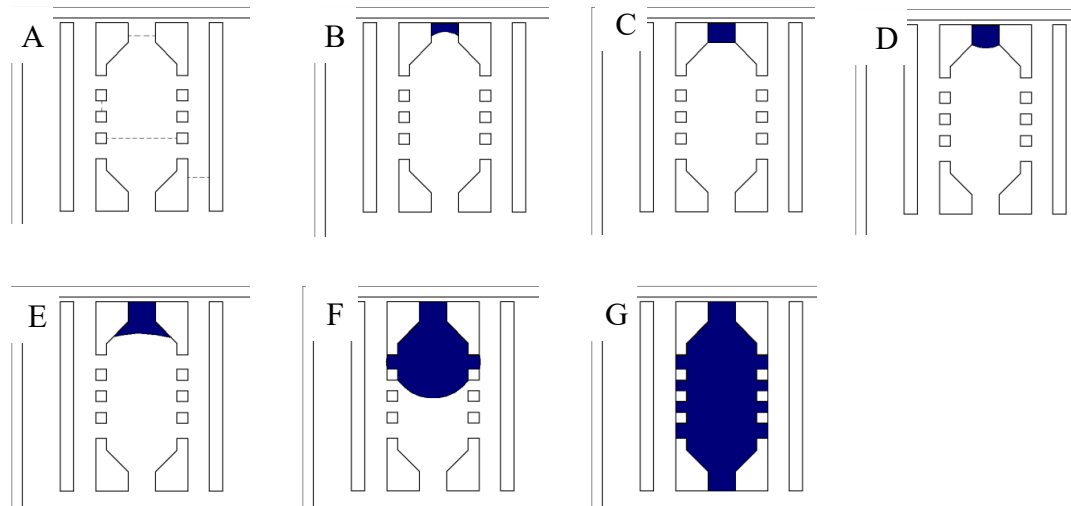


Figura 17. Confinament del xip Be-Gradient, indicant en blau l'ompliment de la càmera.

Les cèl·lules es varen mantenir en cultiu 3D durant 72 hores. Les primeres 48 hores varen servir per formar cadascuna de les parts que simulen el GBM amb la zona necròtica central, hipòxica (o pseudopaliçada) i normòxica, com es pot veure a la **figura 18**. En les darreres 24 hores es realitzen els canvis de medi amb o sense drogues al llarg de les dues microcambres laterals de cada xip, així com la placa que conté els xips.

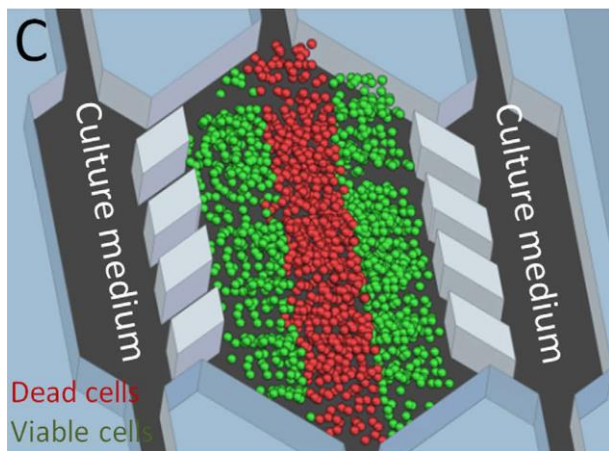


Figura 18. Representació de la situació a les 48 hores després de la sembra de U251-MG-GFP en el xip Be-Gradient. Extret de Ayuso et al., (2016).

3. Tècniques de DNA recombinant

3.1 Cultiu bacterià en medi LB

Per a la producció d'ADN plasmídic recombinant es van utilitzar cultius de *E.coli*. Tots els plàsmids amplificats van ser d'alt nombre de còpies.

Es va inocular un volum de 6 ml de LB (Luria-Bertani) 1x amb ampicil·lina (1:1000) (*miniprep*) amb un raspall de superfície de *glycerol-stock*. Els bacteris es van deixar créixer a 37°C en tubs de polipropilè no tancats hermèticament per tal de permetre l'intercanvi gasos en agitació vigorosa (entre 120 i 140 rpm) entre 6 i 8 hores. La *miniprep* va ser directament transferida a un volum de 250 ml de LB 1x amb ampicil·lina (LB1:1000) (*maxiprep*) i cultivat en agitació durant 18 hores.

3.2 Congelació (glycerol-stock)

El medi LB 1x que conté *E.coli* expressant les diferents construccions d'interès van ser mantingudes indefinidament després de mesclar 500 µl de la *maxiprep* amb 500 µl solució de glicerol 50% estèril (v/v). Els *stocks* van ser criopreservats a -80°C. Per recuperar les construccions es va raspar la superfície del *glycerol-stock* amb una punta de 20 a 200 µl estèril sense arribar a descongelar-ho i es deixà créixer en *minipreps*.

3.3 Purificació de plàsmids

Els plàsmids van ser purificats de cultius bacterians pel mètode de la lisis alcalina (Bimboim and Doly 1979). Vàrem utilitzar el kit de purificació de DNA de Macherey-Nagel® seguint les instruccions del fabricant i utilitzant les solucions incloses en ell i el DNA obtingut es va preservar a -20°C.

3.4 Transfecció amb el plàsmid ptfLC3

El tàndem ptfLC3 és una construcció plasmídica cedida pel Dr. Tamotsu Yoshimori (Universitat de Tòquio, Japó). Aquest plàsmid conté un promotor, DNA codificant de la proteïna LC3 i dues proteïnes fluorescents pEGFP-LC3 (que atorga fluorescència verda) i mRFP-LC3 (fluorescència vermella). Es van sembrar 7×10^4 cèl·lules en plaques de 4 pous en medi MEM complet i 24 hores després de la seva sembra, les cèl·lules es van transfectar amb 100 µL de medi OptiMEM® que

Materials i Mètodes

contenia 1 µg/100 µl de plàsmid i 1,5 µL/100 µl de Lipofectamida 2000 (Invitrogen®). Després de 4 hores, el medi es va reemplaçar per medi MEM complet. Les cèl·lules es mantingueren a l'incubador a 37°C i després de 48 hores de transfecció van ser observades i fotografiades al microscopi de fluorescència per l'avaluació del flux autofàgic a partir de la col·localització de pEGFP-LC3 i mRFP-LC3.

3.5 Producció de partícules lentivirals

3.5.1 Producció de lentivirus en línia cel·lular HEK 293T

Es va utilitzar un sistema de producció de lentivirus que requereix l'expressió transitòria de tres plàsmids que a més compta amb una seqüència LTR 3' auto-inactivable en el vector pLKO.1 que fa que la generació de virus replicants competents sigui virtualment impossible.

Els lentivirus es van produir utilitzant cèl·lules HEK 293T que van ser sembrades en una confluència del 25% en una placa de 100 mm (P100). Al dia següent, es van transfectar amb polietilenamina (PEI; Sigma-Aldrich®) mesclant 5 µl de PEI 1x (10µM) per cada µg de DNA en 4 volums de solució estèril de NaCl 150 mM utilitzant els següents vectors i quantitats: 20 µg de pLKO.1-shARN, 14 µg de #627 (codifica per a les proteïnes funcionals del virus) i 7 µg de #628 (codifica per a les proteïnes de l'embolcall). Després de 3 hores es va canviar el medi DMEM complet i 72 hores més tard es recollí el sobrenedant, centrifugant-lo durant 5 minuts a 2500 rpm per precipitar restes cel·lular i fent-ho passar per un filtre de 0.45µm per eliminar restes cel·lular que poguessin quedar al sobrenedant on tenim les partícules víriques. Els lentivirus es conservaren a -80°C en alíquotes.

3.5.2 Transducció de línies cel·lulars mitjançant lentivirus

Un cop obtingut els virus aquests s'afegeixen al cultiu cel·lular (línies cel·lulars i cultius primaris) a transduïr en una dilució 1:4 en el medi habitual i en presència de Polibrè (Hexadimethrine Bromide, un polímer catiónic que augmenta l'eficiència de la infecció; Sigma-Aldrich®) a una concentració final de 1.75 µg/ml, en la campana Bio2A. Les línies cel·lulars i/o cultius primaris es deixen en contacte amb el virus durant 24 hores i posteriorment reemplaçem el medi amb l'antibiòtic de selecció (puromicina 2 µg/ml). L'experiment es processa després de 4 a 6 dies després de la infecció en dependència de l'experiment. L'eficiència del silenciament va ser validada per RT-qPCR i/o per Western Blot (WB).

4. Anàlisi de l'expressió gènica

4.1 Obtenció d'ARN i síntesi de cDNA

L'RNA total va ser extret a partir dels cultius primaris i línies cel·lulars utilitzant el kit d'aïllament d'RNA total i proteïna de Macherey-Nagel[®], acoplat a la digestió de rDNAsa per prevenir la contaminació per DNA genòmic, d'acord amb les instruccions del fabricant. Les concentracions obtingudes de RNA total va ser determinades per l'espectòmetre Nanodrop (ND-1000). La síntesi de cDNA va ser realitzat per transcripció reversa de mRNA utilitzant Taq-Man N808-0234 Reverse transcriptor Reagents (Roche[®]).

El cDNA s'obté del RNA a partir de la reacció de transcripció reversa (RT), que es realitza segons el protocol de l'enzim retro-transcriptasa de Taqman (Applied Biosystems[®]) a partir d'1 µg de RNA. La reacció conté MgCl₂, dNTPs, hexàmers, inhibidors de RNases i la retrotranscriptasa en les proporcions indicades pel distribuïdor. Primer es posen les mostres de RNA (1 µg) 2 minuts a 90°C i tot seguit s'hi afegeix la barreja de reacció i s'inicia el programa de la transcripció reversa: 10 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 5 minuts a 95°C. Quan acaba la reacció, es procedeix a realitzar la PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR).

4.2 RT-qPCR

Per determinar els nivells d'expressió gènica es va realitzar una PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR) de 100 ng de cDNA amb triplicats per cada mostra. La reacció va tenir lloc en un volum final de 20 µL constituïts per 10 µL de TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystem) 1 µL de sonda corresponent i H₂O Miliq estèril RNAsa *free* en un termociclador CFX96[™] (Biorad[®]). Tots els assajos es varen basar en sondes d'hidròlisi TaqMan marcades amb FAM (green fluorescent fluorophore 6-carboxyfluorescein). La reacció es va realitzar en un primer pas per activar la reacció de 2 minuts a 50°C i 10 minuts a 95°C seguit de 44 cicles de 95°C durant 15 segons i 60°C 1 minut . Els resultats van ésser obtinguts en forma de valor Ct (*Cycle threshold*) que representa el nombre del cicle en el qual comença la fase exponencial de la PCR. Per tant, una major expressió del gen a la mostra comporta un valor més baix de Ct. Les variacions en els nivells gènics del cDNA es van corregir mitjançant la resta dels cicles obtinguts de la PCR per al gen control GAPDH (Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa). El mètode $\Delta\Delta Ct$ va ésser el seleccionat per a realitzar la quantificació relativa dels nivells gènics seguit la següents fórmules matemàtiques.

Materials i Mètodes

Per obtenir la quantitat relativa de mRNA de cada gen vàrem aplicar la següent fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen GAPDH}$$

I respecte la mostra control:

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ mostra control} - \Delta Ct \text{ mostra}$$

A partir d'aquests càlculs la concentració relativa del mRNA respecte al control és $2^{-(\Delta(\Delta Ct))}$. De cada mostra se'n fan tres rèpliques, de les quals es calculen la mitjana i errors estàndard.

Les seqüències de les sondes utilitzades es recullen a la **Taula 10**.

5. Anàlisi de l'expressió de proteïnes

5.1 Obtenció d'extractes proteics

Al finalitzar cadascun dels tractaments els cultius (línies cel·lulars o cultius primaris) varen ser rentats tres vegades amb PBS 1x i lisats amb tampó de lisis (Tris 62,5 mM pH6,8 i 2% SDS). Aquest pas es va realitzar ràpidament per evitar la degradació i que l'extracte representi fidelment l'estat fisiològic de la cèl·lula viva. Després d'aquest pas obtenim una barreja desnaturalitzada de components cel·lulars.

5.2 Quantificació de proteïna total

Les proteïnes van ser determinades per el mètode Lowry (Lowry et al., 1951). Aquest mètode es basa en la reacció de Cu^+ , produïda per l'oxidació dels enllaços peptídics.

Com a control es va preparar una corba de calibració de 1-15 $\mu\text{g/ml}$ a partir d'una solució estàndard de BSA (Albúmina de Serum Boví) de 1mg/ml (Biorad). Per a l'assaig es quantifica l'absorbància de 2 μl de mostra a analitzar en una barreja de reactius A i S en proporció 50:1 (Bio-rad) i quantificada la seva absorció a l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm.

5.3 Preparació de mostres i electroforesi en gels de SDS-PAGE

Els gels desnaturalitzants de poliacrilamida en presència de SDS s'utilitzen per a separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (Amresco®), que és una solució al 40% acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich®) com a iniciador de la reacció i el persulfat d'amoni al 0,05 % com a catalitzador.

S'utilitzen gels discontinus, és a dir, formats per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior (o gel concentrador) on es carreguen les mostres, fem un percentatge baix d'acrilamida (5%) que es prepara en tampó Tris-HCL 0,5 mM a pH 6,8, i serveix per a portar totes les proteïnes del pouet al mateix temps a l'entrada del gel separador. El gel separador es prepara en tampó Tris-HCL 1,5 mM a pH 8,8, el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que volem separar, i és el que realment separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Per a proteïnes de baix pes molecular s'utilitzen gels amb un percentatge superior d'acrilamida que l'utilitzat per a separar proteïnes d'alt pes molecular. Primer es polimeritza el gel separador en la part inferior, i quan aquest estigui completament polimeritzat, construïm el concentrador a la part superior on afegirem una pinta per tal de fer els pouets.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 375 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 25% β -mercaptoetanol i Blau de bromofenol, igualant tots els volums amb el mateix tampó de càrrega 1x. Després d'això es carreguen les mostres al gel. En un dels pous es càrrega un marcador de pes molecular pretenyit (Fisher Scientific®) per a poder interpretar quina és cadascuna de les bandes que s'obtidran agafant-ho com a referència.

L'electroforesi es migra a un amperatge constant de 18 mA, tot i que quan les mostres entren al gel separador es pot pujar a 22 mA, el gel es migra en tampó de migració (glicina 110 mM, Tris 24 mM, SDS 0,1%) en el sistema HoefferSE260 (Amersham Biosciences®).

5.4 Transferència de les proteïnes a la membrana

La transferència de proteïnes es fa en un sistema de transferència semisec. Primer de tot, i mentre el gel està corrent, cal hidratar la membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore®) en metanol 100% durant uns dos minuts i després cal submergir-la en tampó de transferència (48 mM Tris, 0,0375 % SDS, 39 mM glicina) i 20% metanol (percentatge variable en funció del pes molecular de les

Materials i Mètodes

proteïnes a transferir; Exemple: per transferir Cav3.2 utilitzem 5% de metanol) en el qual també s'ha de submergir el paper de transferència, per tal d'equilibrar-lo.

Un cop el gel acabi de córrer també caldrà submergir-lo en tampó de transferència durant un parell de minuts. Un cop equilibrats es pot començar la transferència: es col·loquen 2 papers de transferència (Whatman) sobre l'ànode, a sobre es posa la membrana de PVDF, a sobre el gel de poliacrilamida, i dos papers de transferència més. Ens assegurem que no es formin bombolles entre el gel i la membrana i posem la tapa (càtode). La transferència s'inicia a un amperatge constant de 0,8 mA per cm² de membrana. La transferència dura 60 o 90 minuts en el cas de Cav3.2. El sistema utilitzat és Hoeffler TE70XP (Amersham Biosciences®).

Després es procedeix a realitzar el bloqueig de la membrana amb Tris Buffer salí 0,01% Tween-20 (Sigma®) i 5% de llet descremada o 5% BSA (Fisher®) en funció de la proteïna a detectar (BSA per fosfo-epítops), la membrana es manté durant 1 hora en agitació a temperatura ambient. A continuació, es renta en TBS-T 1x (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20).

Finalment es procedeix a la incubació de la membrana amb l'anticòs primari (**Taula 6**) diluït en TBS-T durant 30 minuts a temperatura ambient (només per β -actina) o 15-18h a 4°C en agitació. Després de tres rentats de 10 minuts cadascun amb TBS-T 1x, s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari corresponent (**Taula 7**) conjugat a peroxidasa durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació.

5.5 Detecció de proteïnes

Per a la detecció de les proteïnes, es va utilitzar el sistema de quimioluminescència EZ-ECL (Biological Industries®) i/o Super Signal (Thermo Scientific®) d'acord amb les instruccions del fabricant i films reactius a quimioluminescència (Fujifilm®). Els nivells de β -actina així com el blau de Naphtol varen ésser utilitzats per verificar les càrregues dels carrils.

6. Assaigs de proliferació i de viabilitat cel·lular

6.1 Recompte de la proliferació mitjançant exclusió amb Blau Tripà

Aquest assaig s'utilitza per fer un comptatge directe de la viabilitat cel·lular ja que ens permet diferenciar entre les cèl·lules vives i les mortes. Les cèl·lules vives, amb la membrana cel·lular intacta, expulsen el Blau de Tripà, mantenint-se incolores, mentre que les cèl·lules mortes es

tenyeixen de blau. El reactiu de Blau de Tripà (Sigma-Aldrich) s'utilitza al 0,2 % i de la suspensió de cèl·lules resultant se'n compten 10 µl a la cambra de Neubauer.

Es sembren 20.000 cèl·lules per pou (placa M24) en triplicats. Després de 24 hores es tracten les cèl·lules segons correspongui i es compten les cèl·lules passades 24, 48 i 72 hores després del tractament. Es renten les cèl·lules amb PBS, es tripsinitzen i es centrifuguen. El pellet es resuspen en 100 µl de medi i finalment es fa la tinció amb el Blau de Tripà, afegint 10 µl de colorant 0,4% a 10 µl de cèl·lules. D'aquests, 10 µl es comptaran a la cambra de Neubauer, valorant cèl·lules vives i mortes.

6.2 Assaig de viabilitat cel·lular WST-1

El reactiu WST-1 (basat en sals de tetrazolium) ens permet analitzar de forma indirecta la viabilitat cel·lular. És un assaig colorimètric, de quantificació espectrofotomètrica que es basa en la reducció de les sals de tetrazolium, WST-1, a sals de formazan mitjançant l'acció de les succinat deshidrogenases mitocondrials. Per tant, l'assaig determina l'activitat enzimàtica mitocondrial. Les sals de formazan que es formen són solubles i donen un color groguenc que és quantificable a l'espectrofotòmetre. La quantitat de cèl·lules metabòlicament actives és directament proporcional a l'absorbància obtinguda.

Es varen sembrar cadascuna de les línies cel·lulars (A172, U87-MG, U251-MG, RC2) en una confluència d'entre el 70% al 75% en plaques de 96 pous (M96) i després de 24 hores s'afegiren les diferents drogues (**Taula 4**). Es varen fer 3 rèpliques en cada punt de cada condició. Després de 48 hores es va afegir un 10% de reactiu WST-1 (Roche®) mesclat amb medi MEM complet en un volum final de 50 µl per pou. Es manté la placa durant 60-90 minuts a l'incubador a 37°C i després es valora el percentatge de cèl·lules viables per colorimetria a 450 nm enfront d'un valor de referència obtingut amb la lectura d'absorbància a 650 nm, utilitzant un lector de plaques Epoch Biotek Instruments USA amb el software Gen5 2.00.

6.4 Assaig clonogènic

La capacitat clonogènica d'una cèl·lula ve donada, per la competència d'aquesta de formar una colònia de cèl·lules a partir d'una cèl·lula individual. El propòsit d'aquest tipus d'assaig en aquest context és determinar la capacitat proliferativa d'un tipus cel·lular front un altre i l'efecte de diferents tractaments sobre la proliferació cel·lular

Materials i Mètodes

Es sembren 500 cèl·lules en una placa de 35mm (M6) de cadascuna de les línies cel·lulars a analitzar i després de 24 hores es tracten. Les cèl·lules es mantenen a l'incubador durant 15 dies realitzant canvis de medi cada 4 dies. Una vegada finalitzat l'experiment afegim un 10% del volum de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) mesclat amb medi MEM complet esperant aproximadament 1 hora a l'incubador a 37°C. Seguidament es fixa al 4% de paraformaldehid (PFA) durant 15 minuts a temperatura ambient; passat aquest temps es renta el PFA amb PBS 1X. El nombre de colònies es quantifica amb el programa de processament d'imatge digital Image J.

6.5 Assaig de cicle cel·lular

Aquest tipus d'assaig ens permet determinar quin percentatge de cèl·lules del cultiu es troba en els diferents estadis de cicle cel·lular. Es varen recollir 1×10^6 cèl·lules per condició (tractades i controls). Es resuspenen les cèl·lules en 500 µl de PBS 1x perquè quedin ben individualitzades i amb l'ajuda del vòrtex es va afegint 1ml per condició d'etanol 70% fred gota a gota amb la intenció de fixar les cèl·lules; es deixen 2 hores a -20°C . Després de 2 hores, es centrifuguen les cèl·lules i es decanta l'etanol 70%, es fa un rentat amb PBS 1x i es resuspen el pellet amb 500 µl de solució de Iodur de Propidi 0,02 mg/ml (1/500) i RNasa 10 mg/ml (1/200) (Sigma[®]) amb PBS 1x. Es deixen els tubs a 37°C durant 30 minuts i es processa cada mostra valorant-se el contingut de DNA cel·lular per incorporació de Iodur de propidi (emissió fluorescent entre 562-588 nm), podent diferenciar les cèl·lules apoptòtiques ($<2n$), cèl·lules en fase G_0/G_1 i cèl·lules en proliferació (fase S/ G_2 -M, $>2n$). Es va utilitzar el citòmetre FACSCanto medint l'emissió del iodur de propidi.

6.6 Assaig d'annexina

La pèrdua d'asimetria en els fosfolípids de la membrana plasmàtica és un signe característic de l'apoptosi, donant lloc a l'externalització de la fosfatidilserina (PS) com a senyal per al reconeixement per part dels macròfags de les cèl·lules apoptòtiques. Això permet l'ús de l'annexina-V, proteïna anticoagulant que s'uneix a la PS en la superfície de les cèl·lules per a la detecció de l'apoptosi primerenca (Koopman et al. 1994). La combinació d'annexina V-FITC i Iodur de propidi permet diferenciar entre cèl·lules apoptòtiques en estadis primerencs d'aquest procés (només annexina V positives) i cèl·lules apoptòtiques tardanes o necròtiques (annexina-V i Iodur de propidi positives).

Es varen plantar 25×10^4 cèl·lules a plaques de cultiu de 35 mm (P35). Després d'aplicar els tractaments adients, es va recollir tant el sobrenedant com les cèl·lules adherides de cada condició experimental. Es va resuspendre cada mostra amb 100 μ l d'Annexina V Binding Buffer 1x (BD D Falcon[®]), afegint 3 μ l d'Annexina V (FITC Immunotools[®]) i 2 μ l de Iodur de Propidi (0,02 mg/ml; Sigma-Aldrich[®]). Es conservaren les mostres durant 15 minuts a temperatura ambient i s'analitzaren els resultats al citòmetre FACSCanto utilitzant el software Win MDI 2.9.

7. Tècniques d'imatge

7.1 Immunofluorescència

Les cèl·lules es sembraren a un 70% de confluència sobre cobreobjectes pretractats amb Poli-D-Lisina (15 μ g/ml). Les cèl·lules es van fixar amb PFA al 4% (15 minuts a temperatura ambient) i es van fer tres rentats amb PBS 1x. Posteriorment, es van bloquejar i permeabilitzar les cèl·lules amb solució de bloqueig que conté 5% Horse Serum (Thermo Fisher[®]), 5% FBS (Thermo Fisher[®]) 0,2% Glicina (Panreac), 0,1% Tritó X-100 (Merck Millipore[®]) en PBS 1x durant 1 hora a temperatura ambient. Després es va incubar amb l'anticòs primari diluït en la mateixa solució de bloqueig durant 18 hores a 4°C i es van realitzar tres rentats en PBS 1x. A continuació, l'anticòs secundari fluorescent es va diluir 1/600 en la solució de bloqueig i per tal de marcar els nuclis es va incloure a la mescla el colorant Hoechst a una dilució 1/400 (incubació de 40 min a temperatura ambient en obscuritat) (**Taules d'anticossos primaris i secundaris 6 i 7**). Finalment es van realitzar 3 rentats amb PBS 1x i es va muntar el cobreobjecte sobre un portaobjecte de vidre utilitzant una gota de Mowiol.

L'observació i la presa de fotografies es va fer al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus IX70 (10x 0,3 NA i 20x, 0,4 NA) i equipat amb càmera (Olympus OM-4 Ti). Les imatges es van prendre utilitzant el programa DPM manager.

7.2 Mesures de calci intracel·lular per immunofluorescència

Les mesures de calci intracel·lular es van realitzar amb el Kit Abcam Fluo-8-No Wash (ab112129) que detecta la mobilització de calci intracel·lular per fluorescència. Es van sembrar 40.000 cèl·lules de GBM A172 per pou en plaques de M96 de parets negres i base transparent, amb medi complet

Materials i Mètodes

EMEM i es van mantenir a l'incubador durant 24 hores. Després d'aquest temps les cèl·lules que pertocaven es van tractar amb el bloquejant de TT-CC NNC-55 a 10 μ M durant 4 hores i seguidament es van netejar amb PBS 1x. El següent pas va ser afegir 100 μ L per pou de solució de càrrega Fluo-8 dye i s'incubà durant 1 hora a l'incubador. Finalment les mesures de calci per fluorescència es van fer al fluorímetre TECAN, Inditit M200, essent capaces de monitoritzar la intensitat de fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 490nm i recollint el senyal a una longitud d'ona de 525nm.

8. Altres tècniques

8.1 Tècniques bioinformàtiques

S'han utilitzat les següents bases de dades:

- **Gliovis** (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>)
Portal per a l'anàlisi de l'expressió gènica en tumors cerebrals (Bowman et al., 2017).
- **cBioPortal** (<http://www.cbioportal.org/>)
Ofereix la possibilitat de visualitzar, analitzar i descarregar una gran quantitat de dades genòmiques de múltiples tipus de càncers. (Gao et al., 2013)

Anàlisi d'imatges

- **Image J** (National Institutes of Health)
Software gratuït utilitzat per l'anàlisi d'imatges (àrea i intensitat) de immunotincions i densitometria de Western blot.

8.2 Avaluació estadística de les dades

Les dades han estat presentades com a mitjanes \pm error standart (SEM), amb el nombre d'experiments (n) indicat entre parèntesi, essent 3 el mínim d'experiments independents realitzat per a cada assaig. La significació estadística (p-valor) ha estat calculada mitjançant el test T Student. Els asteriscos (*, ** i ***) indiquen els distints graus de significació estadística ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ i $p \leq 0.001$, respectivament).

9. Materials

9.1 Agents farmacològics

Droga	Proveïdor	N° Catàleg	Concentració Stock	Diluent
Bafilomicina-Ailomicina A	Santa Cruz	Sc-201550	500 µM	DMSO
Rapamicina	Sigma-Aldrich	R8781	2 mM	DMSO
Cloroquina	Sigma-Aldrich	C6628	250 mM	PBS 1x
Puromicina	Sigma -Aldrich	P7255	1 mg/ml	H ₂ O
Mibefradil	Sigma-Aldrich	M5441	10 mM	H ₂ O
NNC-55	Alomone	N206	20 mM	H ₂ O
CsA	Sigma-Aldrich	30024	100 mM	DMSO
Bapta-AM	Sigma-Aldrich	A1076	10 mM	H ₂ O
Temozolomida	Sigma-Aldrich	T2577	50 mM	DMSO
ClCo	Sigma-Aldrich	769495	25 mM	H ₂ O

Taula 5. *Fàrmacs utilitzats en aquest treball.*

9.2 Llistat d'anticossos primaris

Anticòs	Proveïdor	N° Catàleg	Aplicació	Dilució
Atg5	Sigma	A2859	WB	1:2000
Beclin1	Novus Biologicals	NB110-87318	WB	1:10.000
Cav3.2	Bcn Antibodies		WB ICQ	1:100
Gadd153	Santa Cruz	Sc-7351	WB	1:100
Lamp1	Hybridoma bank		WB ICQ	1:200
SQSTM1, p62	Novus Biologicals	NB 48320 P1-	WB	1:50
TFEB	Bethyl	A303-672A	WB ICQ	1:4000
Grp78, α-Bip	Sigma	G904	WB	1:1000 1:100
Ubiquitina	Santa Cruz	Sc-8017	WB	1:3000
p-eiF2	Cell Signaling	Cs-9721	WB	1:500
B-actina	Sigma	A5441	WB	1:1000
LC3	Novus Biologicals	NC100-2331	WB	1:5000
P-AMPK	Cell Signaling	Cs-2532	WB	1:3000
HIF-1α	BD	610958	WB	1:1000
P- p70 S6K	Cell Signalling	Cs-9204	WB	1:250
p-AKT	Cell Signalling	Cs-4058	WB	1:1000
p-ERK	Cell Signalling	Cs-4370	WB	1:1000 1:1000

Taula 6. Anticossos primaris utilitzats a aquest treball. ICQ: Immunocitoquímica; WB: Western Blot.

9.3 Llistat d'anticossos secundaris

Anticòs	Proveïdor	Nº Catàleg	Aplicació	Dilució
Ratoli-IgG HRP	Sigma-Aldrich	A9044	WB	1:10.000
Conill-IgG HRP	Sigma-Aldrich	A0545	WB	1:10.000
Cabra-IgG HRP	Sigma-Aldrich	A5420	WB	1:10.000
Mouse IgG AlexaFluor 594	Molecular Probes	A11005	ICQ	1:600
Mouse IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11029	ICQ	1:600
Rabbit IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11034	ICQ	1:600
Mouset IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A1103*	ICQ	1:600

Taula 7. Anticossos secundaris utilitzats a aquest treball. ICQ: Immunocitoquímica; WB: Western Blot.

9.4 Llistat de plàsmids

Gen	Plasmidi	Cedit per
Ptf-LC3	p-EGFP-C1+mRFP	T.Yoshimori (Osaka University, Osaka, Japan)

Taula 8. Construcció plasmídica de sobreexpressió utilitzada en aquest treball.

9.5 Llistat de contruccions shRNA

Vector	Gen	Proveïdor	Codi
PkLopuro	scrambled	Sigma-Aldrich	TRCN0000000001
PkLopuro	CACNA1G, Cav3.1	Sigma-Aldrich	TRCN0000044239
PkLopuro	CACNA1G, Cav3.1	Sigma-Aldrich	TRCN0000430515
PkLopuro	CACNA1H, Cav3.2	Sigma-Aldrich	TRCN0000044209
PkLopuro	CACNA1H, Cav3.2	Sigma-Aldrich	TRCN0000044210

Taula 9. *shRNAs* utilitzats en el nostre estudi.

9.6 Llistat de sondes RT-qPCR

Gen	Espècie	Proveïdor	Codi
CACNA1G, Cav3.1	Humà	Applied Biosystems	Hs00234934_m1
CACNA1H, Cav3.2	Humà	Applied Biosystems	Hs00367969_m1
SQSTM, p62	Humà	Applied Biosystems	Hs00177654_m1
GAPDH	Humà	Applied Biosystems	Hs99999905_m1

Taula 10. *Primers* utilitzats per a la RT-qPCR.

RESULTATS

1.1 Els TT-CC es troben expressats en Astrocitomes, GBM primari i GBM recurrent

El calci té un paper molt important en la senyalització cel·lular, controlant processos vitals com la proliferació, diferenciació, creixement i apoptosi (Santoni et al., 2012). Treballs previs descriuen una sobrerregulació en l'expressió dels canals de calci de tipus T (TT-CC) en cèl·lules de melanoma, comparat amb melanòcits normals (Das et al., 2012). Recentment s'ha establert també la relació entre la sobrerregulació de la isoforma CACNA1H (Cav3.2) en casos de melanoma metastàtic en comparació amb el melanòcit i el melanoma, considerant aquest canal com a potencial marcador de mal pronòstic, associat a una disminució de la supervivència del pacient (Maiques et al., 2017).

També s'ha descrit que les cèl·lules de GBM expressen diferents isoformes de TT-CC (Cav3.1, Cav3.2 i Cav3.3) i que aquesta expressió incrementa la susceptibilitat de les cèl·lules de GBM als efectes derivats del bloqueig dels TT-CC (Latour et al., 2004; Zhang et al., 2017).

Per la importància del calci com a segon missatger i regulador de múltiples vies de senyalització capaces de definir el destí cel·lular, es va investigar l'expressió dels TT-CC en diferents tipus de mostres de GBM. Els nostres models d'estudi de TT-CC han estat tumors primaris establerts en cultius *in vitro*, derivats de biòpsies de pacients (cedides des de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova), teixit de GBM primari i la seva recurrència aparellada (Biobancs de la Xarxa Nacional de Biobancs), línies cel·lulars de GBM i línies cel·lulars resistents al tractament amb Temozolomida (creades en el nostre laboratori de l'IRB Lleida).

L'exposició dels resultats s'inicia amb la part descriptiva de l'estudi d'expressió a nivell d'mRNA de Cav3.1 i Cav3.2 en els casos primaris derivats de biòpsies de pacients (incloent casos d'astrocitomes de grau II i GBMs de grau IV) i GBMs amb les seves recurrències aparellades (**Fig 19**). A la **figura 19A** es presenten dos astrocitomes (C1 i C17) i tres GBMs (C18, C65, C83). L'expressió de TT-CC en els gliomes es va valorar per RT-qPCR i va ser relativitzada als nivells d'expressió presents a l'astrocitoma C7 (grau II). Observem que tots els casos primaris expressen tant Cav3.1 com Cav3.2; no obstant els GBMs presenten una expressió significativament menor de Cav3.1 que els astrocitomes, mentre que no trobem diferències significatives d'expressió de Cav3.2 en aquestes mostres, comparant amb el cas C7. L'expressió de Cav3.3 va ser indetectable.

Vàrem voler contrastar aquests resultats amb un anàlisi *in silico* utilitzant la base de dades GlioVis (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>) i la plataforma d'anàlisi Rembrandt que ens permet comparar els nivells d'expressió d'mRNA de Cav3.1 en mostres de teixit no tumoral respecte astrocitomes i GBMs. Observem que no mostra diferències significatives en l'expressió de Cav3.1 entre astrocitomes i GBMs tot i es tendeix a l'increment de Cav3.1 en GBM respecte astrocitomes. Per

Resultats

altra banda l'anàlisi en aquesta plataforma (Rembrandt) conclou que els GBMs presenten significativament menys transcrit de Cav3.1 que teixit no tumoral. A la **figura 19C** es pot veure que, tal com s'ha descrit a la **figura 19B**, els GBMs presenten significativament menys transcrit de Cav3.1 que el teixit no tumoral també observem que els nivells d'expressió de mRNA de Cav3.2 son significativament inferiors en GBMs respecte teixit no tumoral, tal com passa amb la isoforma 1 (Cav3.1).

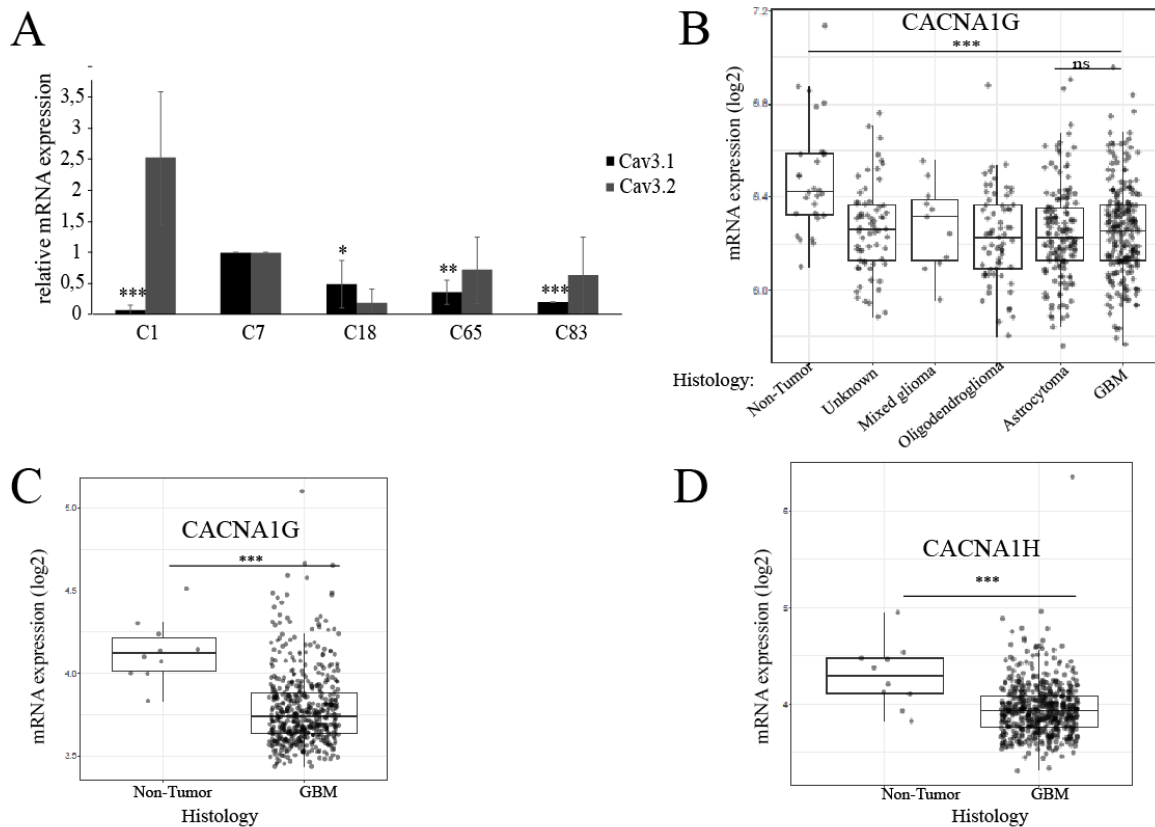


Figura 19. Expressió de TT-CC en astrocitomes i GBMs primaris i recurrents. (A) Nivells d'expressió de Cav3.1 i Cav3.2 obtinguts per RT-qPCR en astrocitomes i GBMs normalitzats respecte els nivells d'expressió de GAPDH i comparats amb el cas C7. Els valors corresponen a les mitjanes i les barres d'error a les desviacions estàndards (sem) derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat (* $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). (B) Estudi dels nivells de mRNA de Cav3.1 en mostres no tumorals, oligodendroglomes, astrocitomes i GBMs analitzats mitjançant la plataforma Gliovis (***) $p \leq 0.001$ (test de Turkey)). (C) Anàlisi in silico dels nivells de mRNA de Cav3.1 (CACNA1G) en teixit no tumoral (10 mostres) versus GBMs (528 mostres) fent servir la base de dades TCGA_GBM; plataforma: Hg_U133A. (***) $p \leq 0.001$ (test de Turkey)). (D) Anàlisi in silico dels nivells de mRNA de Cav3.2 (CACNA1H) en teixit no tumoral (10 mostres) versus GBMs (528 mostres) fent servir la base de dades TCGA_GBM; plataforma: Hg_U133A (***) $p \leq 0.001$ (test de Turkey)).

Una vegada obtingudes (*in silico*) les diferències d'expressió de Cav3.1 i Cav3.2 entre teixit no tumoral i GBMs, es va estudiar amb la plataforma cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) la supervivència dels pacients amb tumor de GBM en funció de la presència o absència d'alteracions en els gens CACNA1G (Cav3.1) i CACNA1H (Cav3.2) (**Fig 20A**); dins alteracions s'inclouen múltiples modificacions transcripcionals com sobreregulacions, *down*-regulacions, mutacions per truncament, amplificacions del gen o mutacions sense sentit. El pacients de GBM amb alteracions, tant al gen CACNA1G com CACNA1H, tendeixen a presentar menors taxes de supervivència (**Fig 20B**).

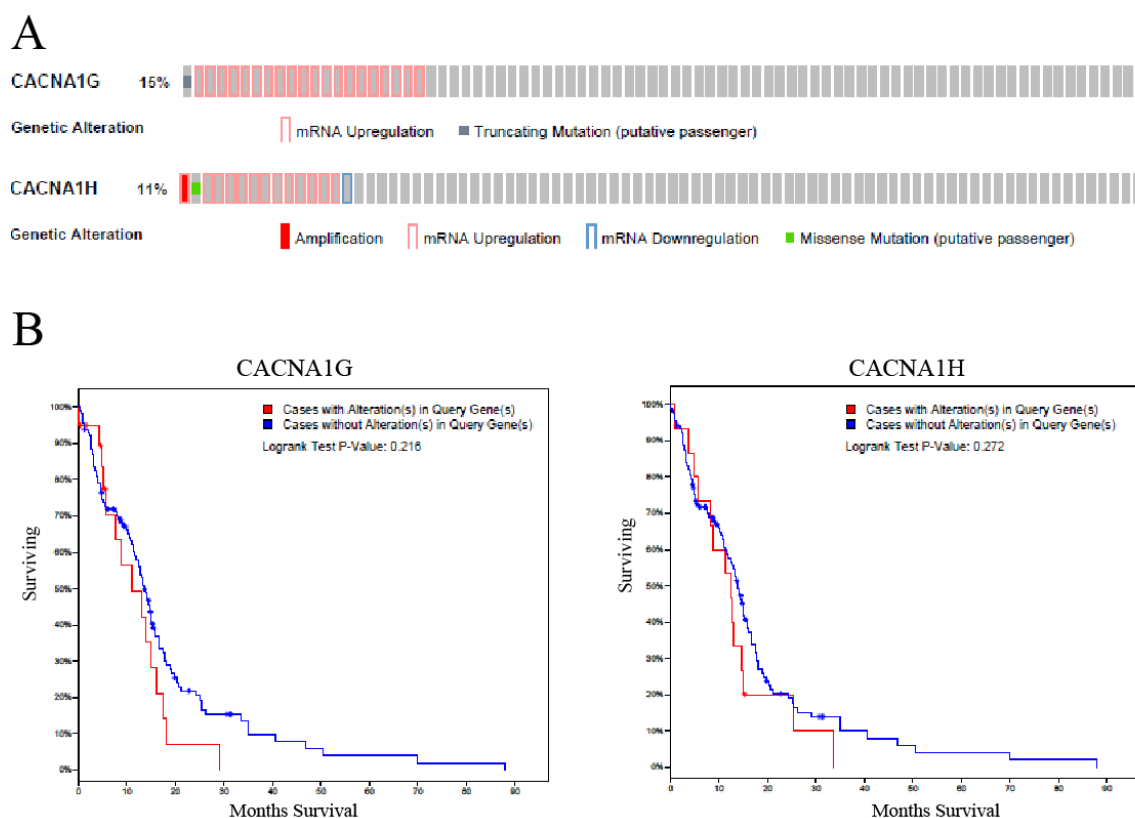


Figura 20. Els pacients amb alteracions als gens CACNA1G i CACNA1H tendeixen a presentar menors taxes de supervivència. (A) A dalt: TGCA anàlisi d'expressió de mRNA Cav3.1 (CACNA1G). De 136 mostres es van trobar 20 sobreregulacions i 1 mutació per truncament. Inferior: TGCA anàlisi d'expressió d'mRNA de Cav3.2 (CACNA1H). De 136 mostres trobem 1 amplificació, 1 mutació sense sentit, 12 sobreregulacions i 1 down-regulació. L'expressió del mRNA es va quantificar amb la plataforma RNASeq V2 RSEM, amb z-score threshold de $\pm 1,0$. (B) Supervivència global Kaplan-Meier. Estimacions per a pacients amb GBM que presenten alteracions en els gens CACNA1H i CACNA1G. Alteracions en ambdós gens va presentar una tendència cap a una supervivència més curta del pacient.

Resultats

A més d'analitzar els nivells d'mRNA de TT-CC en mostres derivades de pacients, es realitzà un estudi descriptiu dels nivells d'expressió d'mRNA de TT-CC en les línies cel·lulars de GBM A172, U87-MG i U251-MG (**Fig 21A**). Els resultats de les línies U87-MG i U251-MG s'expressen en comparació als presents en la línia A172, la qual s'ha representat amb valor de 1. Els resultats indiquen que la línia de GBM A172 presenta una major expressió de Cav3.1 i Cav3.2 respecte les altres dues (U87-MG i U251-MG). A més, en la línia U87-MG només es detecta Cav3.1 i la línia U251-MG expressa Cav3.1 i Cav3.2 però en menor mesura. Els resultats per Cav3.2 en les línies A172 i U87-MG van ser validats per Western Blot (**Fig 21C**) on podem veure que els nivells d'expressió d'mRNA van en concordança amb els nivells proteics.

La Temozolomida (TMZ) és l'agent alquilant oral utilitzat per al tractament del GBM primari. No obstant, prop del 50% dels pacients no responen al tractament amb aquest fàrmac degut a la sobreexpressió de l'enzim reparador O6-metilguanina-metil-transferasa (MGMT) que permet la reparació del DNA, resultant en una manca d'efecte del tractament i la recurrència del tumor (Lee et al., 2016).

A la **figura 21B** es comparen els nivells d'expressió de Cav3.1 i Cav3.2 de les línies resistents al fàrmac TMZ, RC1 i RC2 *versus* la línia A172. Aquestes línies van ser establertes al laboratori a partir de la línia A172. S'observa com ambdues línies resistents presenten una sobrerregulació de Cav3.1 respecte la línia parental. Quant a l'expressió de Cav3.2 en les línies resistents a TMZ, només hi ha diferències en RC2 respecte a la línia cel·lular original (A172), mostrant un lleuger augment significatiu de Cav3.2. Aquest resultat va poder ser validat també a nivell de proteïna per WB (**Fig 21C**), obtenint un augment de Cav3.2 en RC2 *versus* A172.

També vam estudiar els nivells d'expressió de Cav3.1 i Cav3.2 en GBMs primaris respecte la seva recurrència aparellada (**Fig 21D**). Podem veure una tendència (en 3 de 5) dels casos, on el GBM recurrent sobreexpressa Cav3.1; en canvi, observem una inclinació a la disminució de l'expressió de Cav3.2 en 3 de 4 recurrències en comparació amb el seu GBM primari. Així doncs els resultants obtinguts en les línies resistents (**Fig 21B**) concorden amb els resultants obtinguts a partir de les biòpsies derivades de pacients de la **figura 21D**, validant el nostre model de resistència, i demostrant la sobreexpressió de Cav3.1 en GBM recurrent i també de Cav3.2 en RC2.

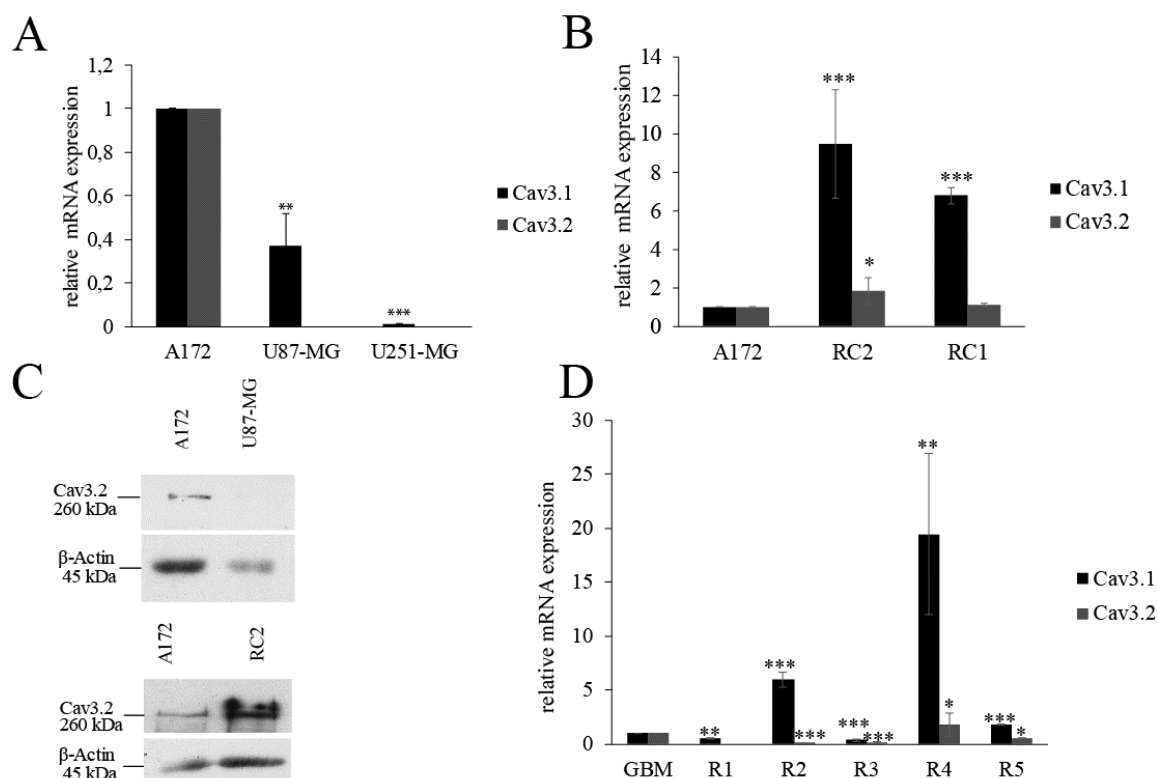


Figura 21. Expressió diferencial de TT-CC en les línies cel·lulars de GBM, línies de GBM resistents a Temozolomida i mostres aparellades de teixits de GBM primaris i recurrents. (A) Representació gràfica dels valors obtinguts per RT-qPCR en les línies cel·lulars de GBM A172, U87-MG i U251-MG i resultats normalitzats respecte els nivells d'mRNA de GAPDH. (B) Gràfic representatiu dels valors obtinguts per RT-qPCR comparant la línia cel·lular GBM A172 amb les línies cel·lulars RC1 i RC2 (GBM resistents a TMZ) obtingudes a partir de dos diferents clons resistents al fàrmac. Els valors corresponen a les mitjanes i les barres d'error a les desviacions estàndards (sem) derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat (* $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$) (C) Superior: Immunoblot contra Cav3.2 en les línies cel·lulars de GBM A172 i U87-MG. Inferior: Immunoblot contra Cav3.2 en la línia cel·lular de GBM A172 i la línia resistent a TMZ RC2. β -actina va ser utilitzada com a control de càrrega. (D) Gràfic obtingut a partir de l'anàlisi dels valors d'expressió per RT-qPCR de Cav3.1 i Cav3.2 en biòpsies aparellades de GBM primari i la seva recurrència. Els valors corresponen a les mitjanes i les barres d'error a les desviacions estàndards (sem) derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat (* $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

1.2 Establiment i validació de les línies resistents a TMZ generades a partir de la línia de GBM A172

Les línies cel·lulars resistents al quimioterapèutic TMZ es van crear al laboratori a partir de la línia cel·lular A172, la qual es va exposar a dosis creixents del fàrmac fins a una concentració final de 200 μ M, concentració a la qual la línia cel·lular parental és incapaç de proliferar però sí les línies resistents RC1 i RC2. Es tracta doncs d'un model de creació de resistència escalat, partint de dosis baixes (20 μ M) i amb increments constants fins aconseguir seleccionar cèl·lules capaces de proliferar a concentracions elevades de TMZ.

A la **figura 22** s'evidencia que el model de línia cel·lular és resistent al fàrmac TMZ comparat amb la línia parental. A la **figura 22A** s'observen fotografies en contrast de fase de la línia cel·lular A172 i la línia resistent RC2, ambdues amb presència i absència de TMZ en el medi de cultiu. Mentre que la línia cel·lular A172 no prolifera en presència del quimioterapèutic, la línia RC2 no veu afectat el seu creixement en presència de TMZ. A més, a la **figura 22B i 22C** s'adverteix que el tractament amb TMZ redueix el nombre de colònies cel·lulars en assaigs clonogènics només en la línia cel·lular A172. Així mateix, la TMZ redueix la viabilitat cel·lular (mesurada en assaigs WST-1) en un 80% en la línia A172. En canvi a la línia RC2, la capacitat de proliferar en colònies no es veu alterada (**Fig 22B**), així com tampoc la viabilitat cel·lular, la qual de fet sembla incrementada en presència del fàrmac (**Fig 22C**). El creixement cel·lular (mesurat pel comptatge de cèl·lules vives negatives per la tinció amb Blau Tripà) només és significativament minvat en el cas de la línia A172 en presència de TMZ vers la línia A172 en condicions basals, mentre que la línia resistent RC2 (amb o sense fàrmac) prolifera de forma semblant a la seva línia parental (**Fig 22D**), demostrant així la formació de línies cel·lulars resistents a TMZ com a models *in vitro* de quimioresistència.

Pel que respecta a la línia cel·lular resistent a TMZ RC1, derivada de la línia cel·lular A172, aquesta va ésser creada en paral·lel a la línia RC2 i cultivades, ambdues a una dosi de 200 μ M de TMZ. L'anàlisi per RT-qPCR (**Fig 21B**) revela que RC1 presenta una expressió incrementada de Cav3.1 respecte a la línia parental (A172), a l'igual que RC2. A més, és capaç de créixer a elevades dosi de TMZ (dades no mostrades), confirmant que es tracta d'una segona línia resistent al quimioterapèutic. Tanmateix, la línia resistent més emprada en aquest treball ha estat la RC2.

La línia resistent RC2 s'ha utilitzat per estudiar l'expressió de TT-CC (**Fig 21B**), així com l'autofàgia respecte la línia cel·lular parental (veure més endavant, **Figs 23 i 24**). També és rellevant investigar possibles diferències quant a la sensibilitat als bloquejants de TT-CC respecte de línies de GBM no resistents (**Fig 26B**), amb possibles implicacions terapèutiques.

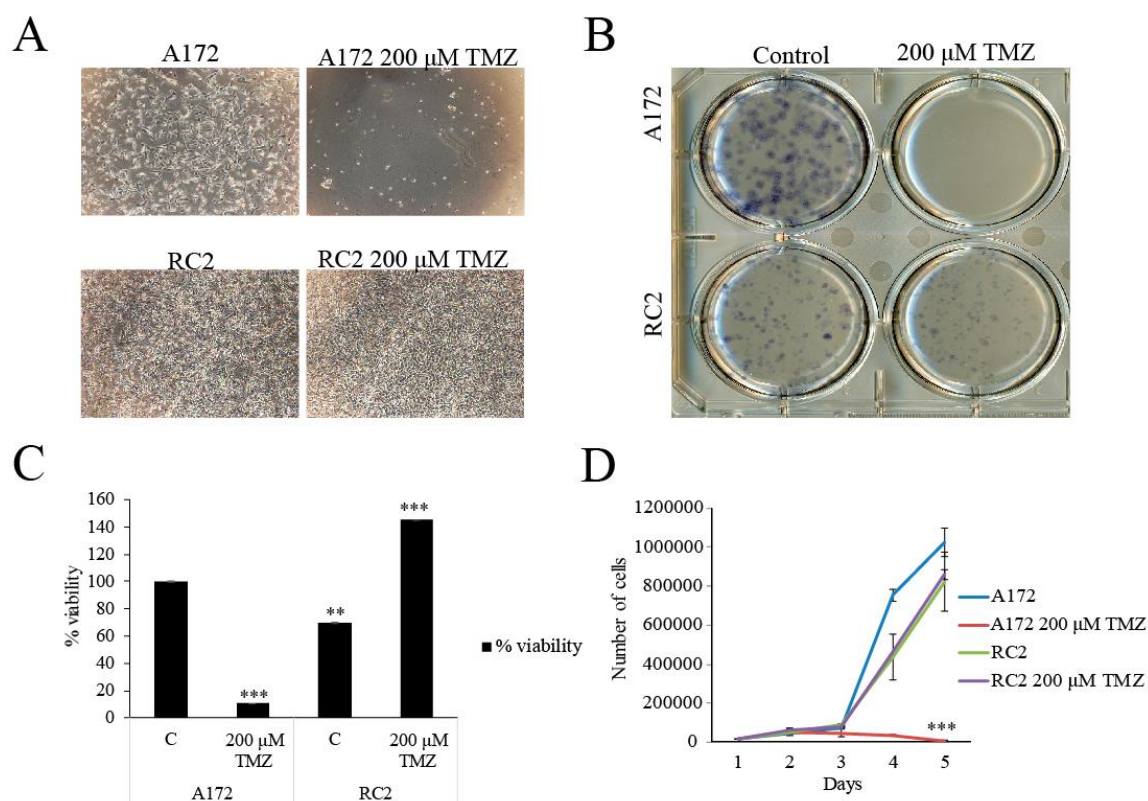


Figura 22. Taxes de proliferació, creixement i viabilitat en les línies A172 i RC2 en presència i absència de TMZ. (A) Imatges representatives en contrast de fase de les cèl·lules A172 i RC2 amb i sense TMZ. (B) Assaig clonogènic de les cèl·lules de GBM A172 i RC2 tractades amb Temozolomida durant 15 dies respecte a les mateixes línies cel·lulars no tractades. (C) Assaig de viabilitat de les cèl·lules A172 i RC2 als 5 dies després del tractament amb Temozolomida a una dosi única de 200 μM. (D) Corba de creixement de les línies cel·lulars A172 i RC2 en presència de 200 μM de TMZ i absència del fàrmac TMZ.

Cada vegada més estudis reforcen la implicació de la TMZ sobre la inducció d'estrès, l'activació de l'UPR i l'autofàgia en cèl·lules de glioma (Koukourakis et al., 2016). Es va voler comprovar quin era l'efecte de l'exposició de les cèl·lules de GBM A172 a elevades dosi de TMZ (200 μM, 6h i 72h) i comprovar si aquest efecte era el mateix en la línia resistent RC2 (**Fig 23**). Amb aquesta finalitat, es van realitzar *immunoblots* contra proteïnes associades a l'estrès de reticle i l'autofàgia. Els resultats obtinguts mostren que a nivell dels marcadors d'UPR analitzats l'únic que s'incrementa amb el tractament amb TMZ i en RC2 és p-EIF2α (**Fig 23A**). A més, els marcadors d'autofàgia (Beclin-1, p62, p-AMPK, atg5-atg12) es troben clarament sobrerregulats respecte el seu control sense tractar i en RC2 (**Fig 23B**). A més, a l'observar l'increment en els nivells de proteïna p62 (**Fig 23B**) de la línia cel·lular RC2 respecte A172, vàrem realitzar experiments de RT-qPCR per tal de comprovar si els nivells d'mRNA de p62 es trobaven augmentats. Els resultats van confirmar que RC2 presenta nivells augmentats d'expressió de p62 respecte la línia parental A172

Resultats

(Fig 23C), d'acord amb l'augment d'altres marcadors autofàgics (Fig 23B).

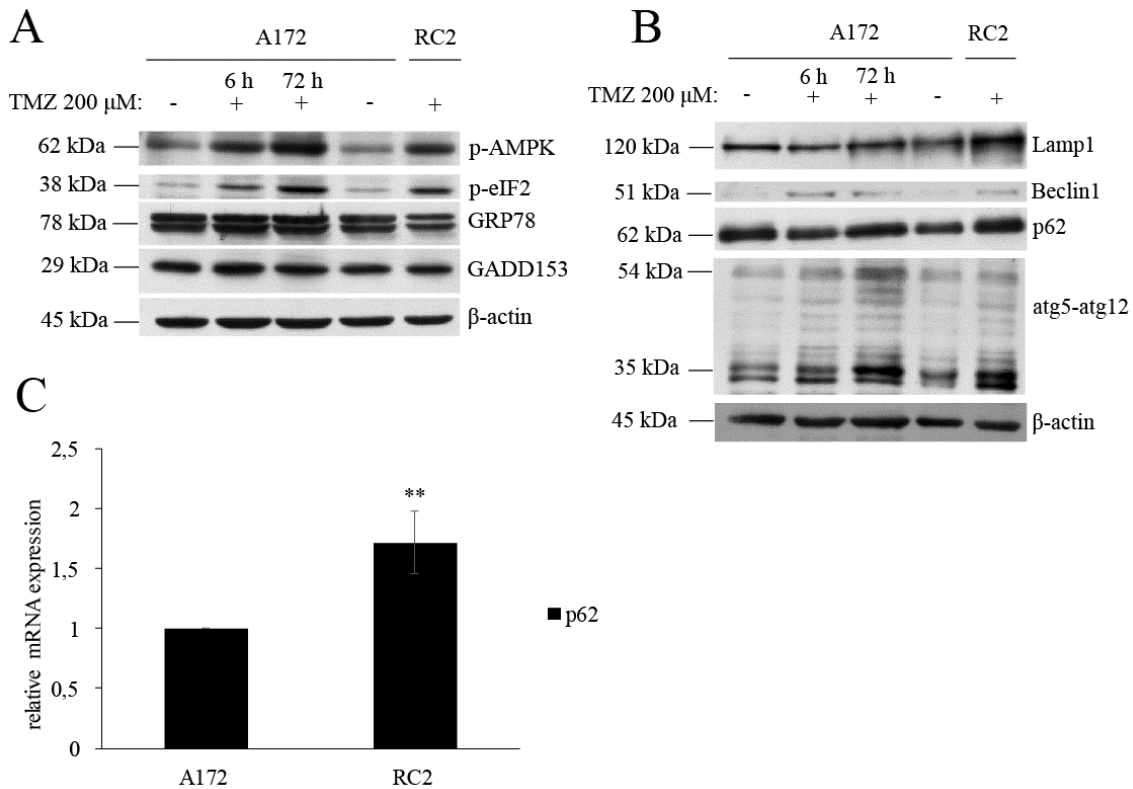


Figura 23. Els tractaments aguts i crònics amb TMZ condueixen a una elevació dels nivells de p-AMPK, p-eIF2 α així com proteïnes autofàgiques. (A) Cèl·lules A172 van ser tractades amb TMZ 200 μ M durant 6 h i 72 h i les RC2 mantingudes o no amb la mateixa dosi de TMZ. Es van analitzar els nivells de fosforilació de p-AMPK, p-eIF2 α i els nivells de GRP78 i de GADD153. β -actina s'utilitza com a control de càrrega. (B) Els mateixos lisats es van utilitzar per analitzar els nivells de les proteïnes d'autofàgia Lamp1, Beclin1, p62 i Atg5-Atg12. β -actina es va utilitzar com a control de càrrega. (C) Els nivells d'mRNA de p62 s'analitzaren per RT-qPCR i els resultats es van normalitzar respecte els nivells de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les barres d'error a les desviacions estàndards (sem) derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat en les línies cel·lulars A172 i RC2 (** $p \leq 0.01$).

Havent observat aquest increment en les proteïnes d'autofàgia, es va voler corroborar els resultats obtinguts per Western blot realitzant la transfecció amb el plasmidi tàndem (ptLC3/mRFP-GFP) per tal de monitoritzar el flux autofàgic (Kimura et al., 2007) en la línia RC2 *versus* A172. El plasmidi tàndem (ptLC3/mRFP-GFP) és una construcció que permet la sobreexpressió de la proteïna autofàgica LC3 associada amb les proteïnes fluorescents mRFP i GFP. La proteïna GFP perd la fluorescència a pH àcid, per tant, una vegada es fusionen l'autofagosoma i el lisosoma aquesta proteïna perd emissió verd fluorescent, quedant només la fluorescència vermella. Aquest

assaig ens permet així distingir els autofagosomes, on la fluorescència serà groga degut a la colocalització verd i vermell, dels autofagolisosomes que mostraran fluorescència vermella degut a la pèrdua de la fluorescència verda dins dels lisosomes.

Per aquest tipus d'assaig és imprescindible la presència de controls positius (inducció d'autofàgia) i negatius (bloqueig de l'autofàgia). Com a control d'inducció d'autofàgia utilitzem la Rapamicina (500 nM /24 hores), coneguda per ser un inhibidor d'mTOR i activador de l'autofàgia. Així, en aquesta condició s'observa un increment de marcatge en punts vermells (autofagolisosomes) respecte del control. Com a control de bloqueig de l'autofàgia utilitzem la Cloroquina (25 nM / 24 hores), fàrmac antipalúdic que s'ha demostrat que bloqueja l'autofàgia produint un patró de punts grocs (autofagosomes). A la **figura 24A** podem observar amb les imatges preses al microscopi de fluorescència com la línia cel·lular resistent al fàrmac TMZ, RC2, presenta un marcatge amb predomini de punts vermells, que representa un clar increment del flux autofàgic respecte a la línia parental de la que deriva, no resistent al fàrmac.

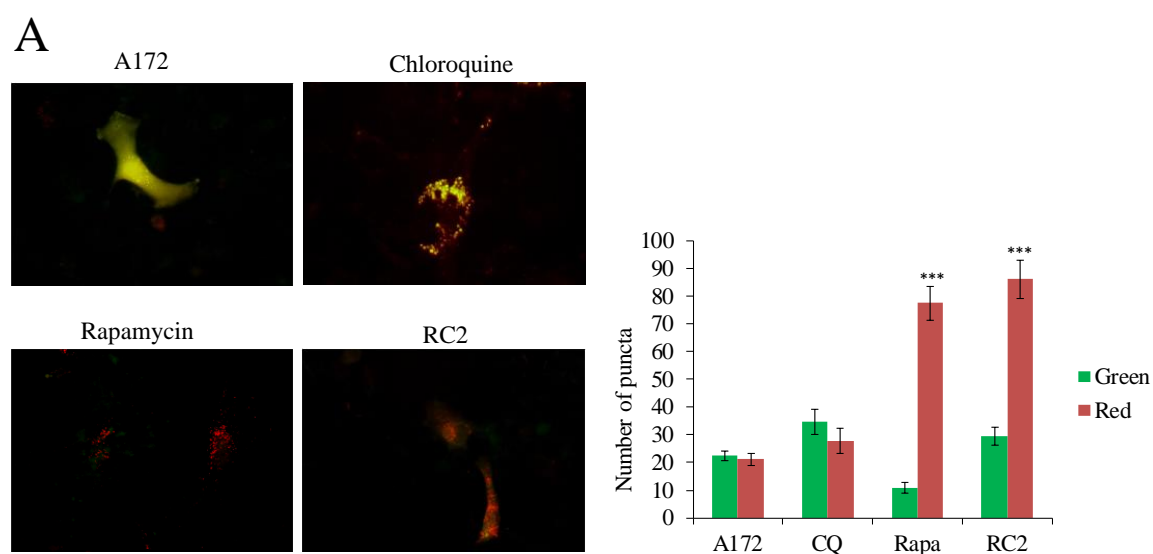


Figura 24. La línia cel·lular RC2, resistent a TMZ, presenta un increment del flux autofàgic respecte a línia cel·lular parental A172. (A) Imatges representatives de les cèl·lules A172 transfectades amb el plasmidi ptfLC3 i tractades amb cloroquina (bloquejant d'autofàgia) o rapamicina (inductor d'autofàgia). Cèl·lules amb puntejat de LC3 groc degut a la colocalització de la fluorescència vermella i verda mostren els autofagosomes. Cèl·lules amb puntejat vermell, indiquen la presència d'autofagolisosomes. El nombre de punts per cèl·lula, verds i vermells, van ser comptats i representats al gràfic de barres situat a la part inferior de les fotografies. Les dades corresponen a la mitjana \pm sem de com a mínim 10 cèl·lules diferents en 10 camps en tres experiments independents (*) $p \leq 0.001$.**

Resultats

Es van realitzar comptatges dels punts verds i vermells en tres experiments independents per tal d'obtenir la quantificació que es pot veure a la dreta de les fotografies, demostrant que la línia resistent presenta una autofàgia basal exacerbada en relació a la línia cel·lular parental de GBM de la que es deriva.

1.3 L'expressió de TT-CC en GBM es regula per normòxia/hipòxia

El GBM és un tumor amb àrees d'elevada proliferació microvascular i alhora focus necròtics rodejats per àrees d'elevada densitat cel·lular amb una menor concentració d'oxigen i disponibilitat de nutrients conegudes com pseudopalissades (Ayuso et al. 2017).

S'ha demostrat l'augment de l'expressió de Cav3.2 en condicions d'hipòxia (1% O₂) en cèl·lules mare de glioma (Zhang et al., 2017), així com en el melanoma, on s'ha establert una relació entre l'hipòxia, la sobrerregulació del Cav3.2 i l'estadi de progressió del tumor (Maiques et al. 2017).

Els nostres resultats demostren que tant en les línies cel·lulars de GBM estudiades, com la línia cel·lular resistent a TMZ RC2 exposades a una baixa concentració de O₂ (2% O₂) sobreexpressen Cav3.2 (**Fig 25B i D**) en comparació a la mateixa línia en condicions de normòxia (21% O₂). A més, aquesta sobre regulació de Cav3.2 en condicions hipòxiques (2% O₂) s'acompanya d'una disminució en els nivells d'expressió de mRNA de Cav3.1 (**Fig 25A**) i l'augment esperat de HIF1 α (**Fig 25B**). S'han descrit que les condicions fisiopatològiques, en quant al percentatge d'oxigen, en el GBM varien entre un 1% O₂ i un 5% O₂ (Hou et al., 2015; Lemaire, et al., 2015; Richards et al., 2016). Al nostre laboratori hem treballat a un percentatge del 2% O₂, que es troba dins d'aquest rang d'hipòxia "fisiològica".

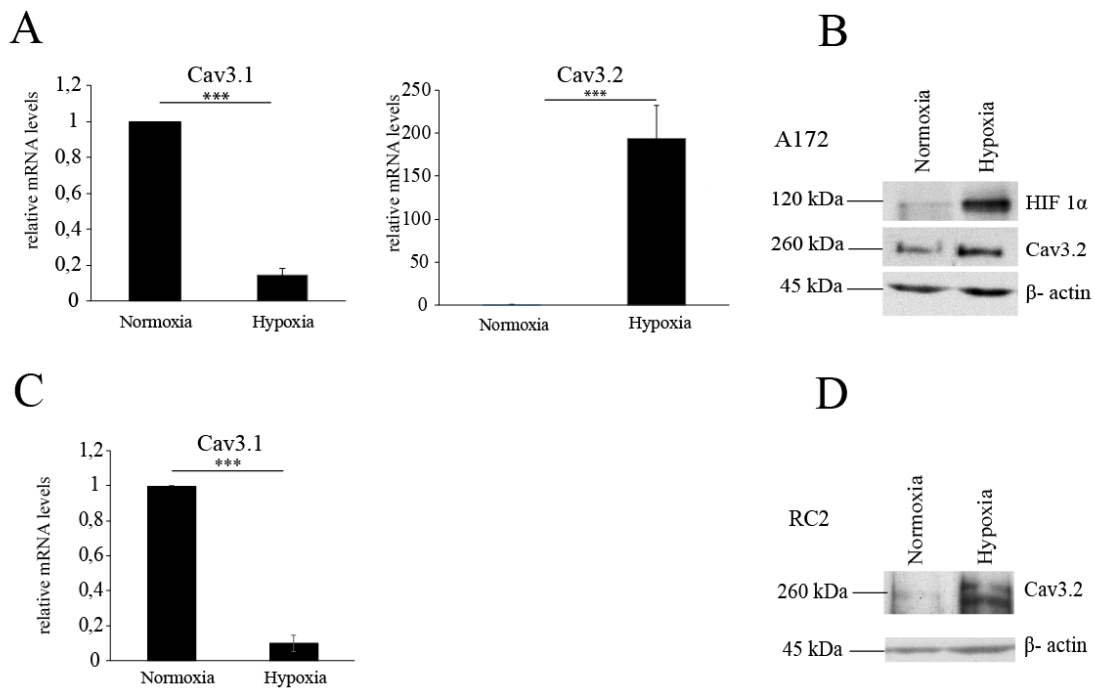


Figura 25. Les condicions hipòxiques modulen el patró d'expressió dels TT-CC en GBM. Les línies A172 i RC2 van ésser exposades a condicions d'hipòxia (2% O₂) durant 48 hores. (A i C) Representació gràfica dels nivells d'expressió d'mRNA del canal Cav3.1 obtinguts per RT-qPCR en les línies A172 (A) i RC2 (C) comparant els nivells d'expressió de la normòxia (21% O₂) versus hipòxia (2% O₂) essent el valor de normòxia relativitzat a 1 en ambdós casos i els resultats normalitzats respecte els nivells d'mRNA de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les desviacions estàndards derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat. Les barres d'error indiquen la mitjana ± sem (***) $p \leq 0.001$. (B i D) Anàlisi per immunoblot dels nivells de Cav3.2 i HIF1α en les línies cel·lulars A172(B) i RC2 (D). β-actina és utilitzada com a control de càrrega.

Lisats cel·lulars de cèl·lules A172 i RC2 cultivades en normòxia o hipòxia van ser analitzats per immunoblot per valorar l'expressió de Cav3.2 a nivell proteic. A més de confirmar l'augment d'expressió d'aquest canal en hipòxia (**Fig 25B i D**), els resultats van posar de manifest la presència d'una doble banda en Cav3.2 en la línia RC2 en condicions hipòxiques que no observem en condicions normòxiques per a la mateixa línia ni tampoc en la línia cel·lular parental de GBM, A172. Una possibilitat fora que la banda d'alta mobilitat en aquest patró de bandes fos deguda a una fosforilació de Cav3.2 en hipòxia (**Fig 25D**).

1.4 Els TT-CC són indispensables per a la supervivència de les cèl·lules de GBM

Els TT-CC es troben expressats en diferents teixits com cervell, ronyó, cor i múscul llis (Taylor, Zeng, et al. 2008). Es troben a més sobre expressats en diferents tipus de tumors, entre els que s'inclouen tumor esofàgic, càncer de mama, càncer ovàric, leucèmies, melanoma, càncer de fetge i de còlon (Huang et al., 2015).

S'ha demostrat que la pèrdua d'expressió o la inhibició de TT-CC amb agents farmacològics com el Mibefradil indueixen la mort per apoptosi en línies cel·lulars de melanoma (Das et al., 2013), GBM (Valerie et al. 2013) i càncer d'ovari (Dziegielewska et al. 2016). No obstant, el mecanisme molecular pel qual l'absència d'activitat dels TT-CC pot desencadenar la mort cel·lular no ha estat elucidat.

Un dels objectius del treball va ser investigar si la inhibició gènica i/o farmacològica és capaç de desregular el procés autofàgic, previ a la mort per apoptosi en el GBM. Abans d'abordar aquest punt el primer que es va fer va ser un *screening* per tal de determinar els paràmetres crítics, concentració de droga i temps que tarda en esdevenir-se la mort apoptòtica quan bloquegem farmacològicament els TT-CC en GBM. També es va determinar si els shRNAs de que disposem per silenciar l'expressió dels TT-CC disminueixen els nivells d'expressió de mRNA, amb quina eficàcia ho fan i quan temps tarda en fer-se efectiva aquesta repressió gènica per produir-se finalment la mort cel·lular.

Per començar a tractar aquest punt, el primer que vam fer va ser investigar quin és l'efecte del bloqueig farmacològic dels TT-CC sobre la proliferació i la viabilitat de cèl·lules de GBM. Per aquest fi, es van realitzar assajos de viabilitat amb la tinció WST, de proliferació en colònies i anàlisi del cicle cel·lular. El bloqueig farmacològic dels TT-CC amb Mibefradil va produir una disminució en la viabilitat cel·lular en la línia A172 significatiu a 10 i 100 μM , amb una disminució de la màxima d'un 50% a 10 μM i del 80% a 100 μM (**Fig 26A**), suggerint una parada proliferativa i/o mort cel·lular. L'anàlisi de cicle cel·lular realitzat sobre les cèl·lules A172 tractades amb Mibefradil a una dosi de 10 μM demostrà que es produeix una parada del cicle cel·lular en fase G1, així com una disminució significativa de les cèl·lules en fase S (**Fig 26A**). Finalment, els assaigs clonogènics van mostrar una molt reduïda capacitat de formar colònies en cèl·lules tractades amb Mibefradil 10 μM , mentre que a 1 μM no es van observar diferències respecte de les cèl·lules no tractades. Aquest resultat indica que Mibefradil atura la proliferació cel·lular i/o indueix mort.

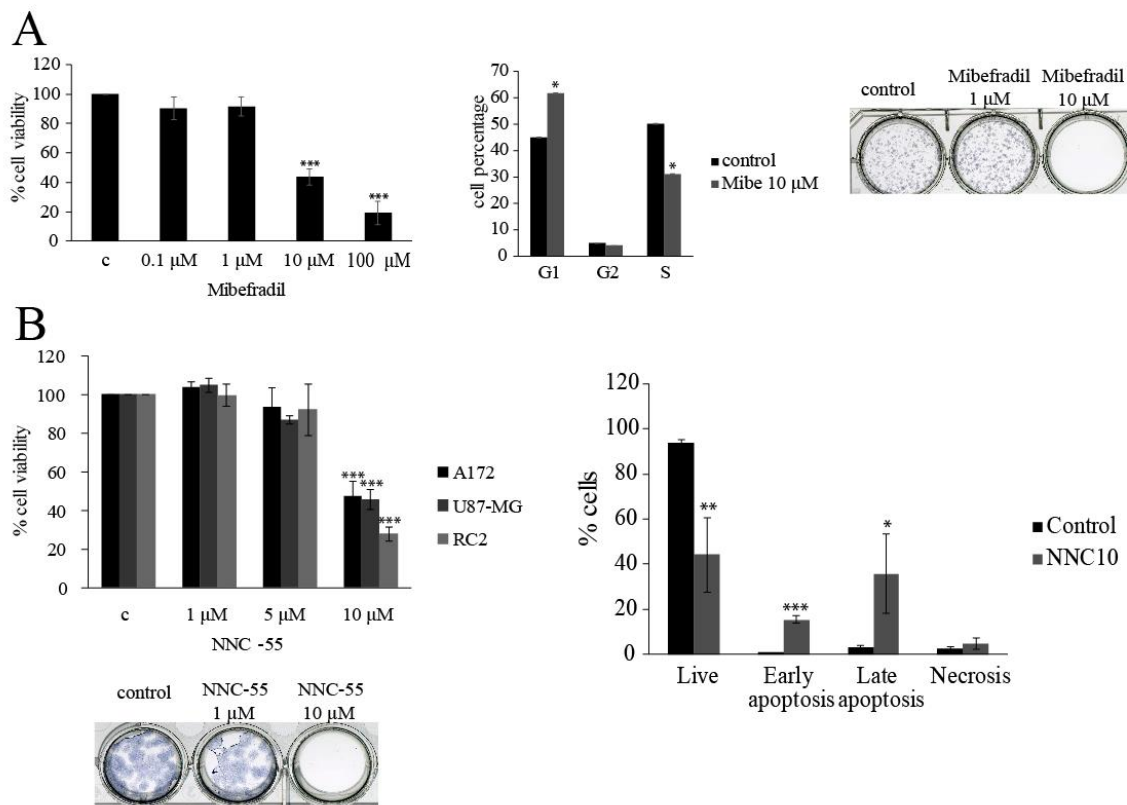


Figura 26. El bloqueig farmacològic dels TT-CC redueix la viabilitat, indueix parada de cicle cel·lular en G1/S i disminueix el potencial proliferatiu cel·lular. (A) La viabilitat de la línia cel·lular A172 va ésser analitzada amb el reactiu WST-1 a les 24 hores després de l'adició de cadascuna de les concentracions de Mibefradil; les barres indiquen la mitjana \pm sem (***) $p \leq 0.001$). L'anàlisi de cicle cel·lular es va realitzar per citometria de flux (tinció amb Iodur de Propidi) en la línia A172 després de 24 hores amb el tractament Mibefradil a una concentració de 10 μ M. Assaig clonogènic en la línia cel·lular A172 control i tractada amb Mibefradil a 1 μ M i 10 μ M. (B) Assaig de viabilitat cel·lular amb les línies A172, U87-MG i la línia resistent RC2 a diferents concentracions després de 24 hores de tractament amb NNC-55-0396; les barres indiquen la mitjana \pm sem (***) $p \leq 0.001$). Assaig clonogènic en la línia cel·lular A172 control i tractada amb NNC-55-0396 a 1 μ M, i 10 μ M després de 15 dies de creixement. L'anàlisi de les diferents poblacions cel·lulars es va realitzar mitjançant l'assaig d'Annexina V/PI per tal de conèixer el percentatge de la població cel·lular viva, en apoptosi inicial, tardana i en necrosi després del tractament de 24 hores amb NNC-55-0396 10 μ M comparat amb el cultiu control sense tractament. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem (* $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

Els assaigs de viabilitat amb WST també es van realitzar amb un derivat més específic de Mibefradil, NNC-55-0396 a 24 hores en la línia A172, U87-MG i RC2. La viabilitat de les tres línies cel·lulars es va veure afectada de forma significativa amb el tractament amb NNC-55-0396 a 10 μ M, amb una disminució de la mateixa del 60%, i del 70% en RC2 (Fig 26B) efecte que no es

Resultats

va observar amb a la concentració de 5 μM , on la pèrdua de viabilitat no és significativa (**Fig 26**). L'assaig clonogènic que es mostra demostra que les cèl·lules tractades amb NNC-55-0396 a 10 μM són incapaces de proliferar. L'observada pèrdua de viabilitat amb el tractament NNC-55-0396 a 10 μM és deguda a la mort cel·lular per apoptosi (**Fig 26B**) segons les dades recollides després de realitzar l'assaig d'Annexina/IP a la condició control i tractada per citometria de flux en la línia A172. Confirmant així que la manca de viabilitat no és deguda a una disminució en la proliferació sino a un increment en l'apoptosi en les cèl·lules tractades amb els bloquejants de TT-CC. Els resultats concorde amb els ja publicats per Valerie et al., (2013) pel Mibefradil en GBM.

Per altra banda es van obtenir diferents construccions gèniques (ShRNAs) que ens han permès silenciar individualment cadascun dels canals: Cav3.1 (ShRNA Cav3.1#1 i ShRNA Cav3.1#2) i Cav3.2 (ShRNA Cav3.2#1 i ShRNA Cav3.2#2). El silenciament gènic mediat per aquests shRNAs es va validar per RT-qPCR. A la **figura 27A** es demostra el silenciament de Cav3.1 amb el shRNA Cav3.1#1 en les línies cel·lulars de GBM A172, U87-MG i el cas primari C65. Es va obtenir un silenciament gènic d'aproximadament un 90% (en A172 i en C65) i d'un 80% en U87, causant alhora una sobreexpressió significativa del canal Cav3.2 en les cèl·lules que l'expressen.

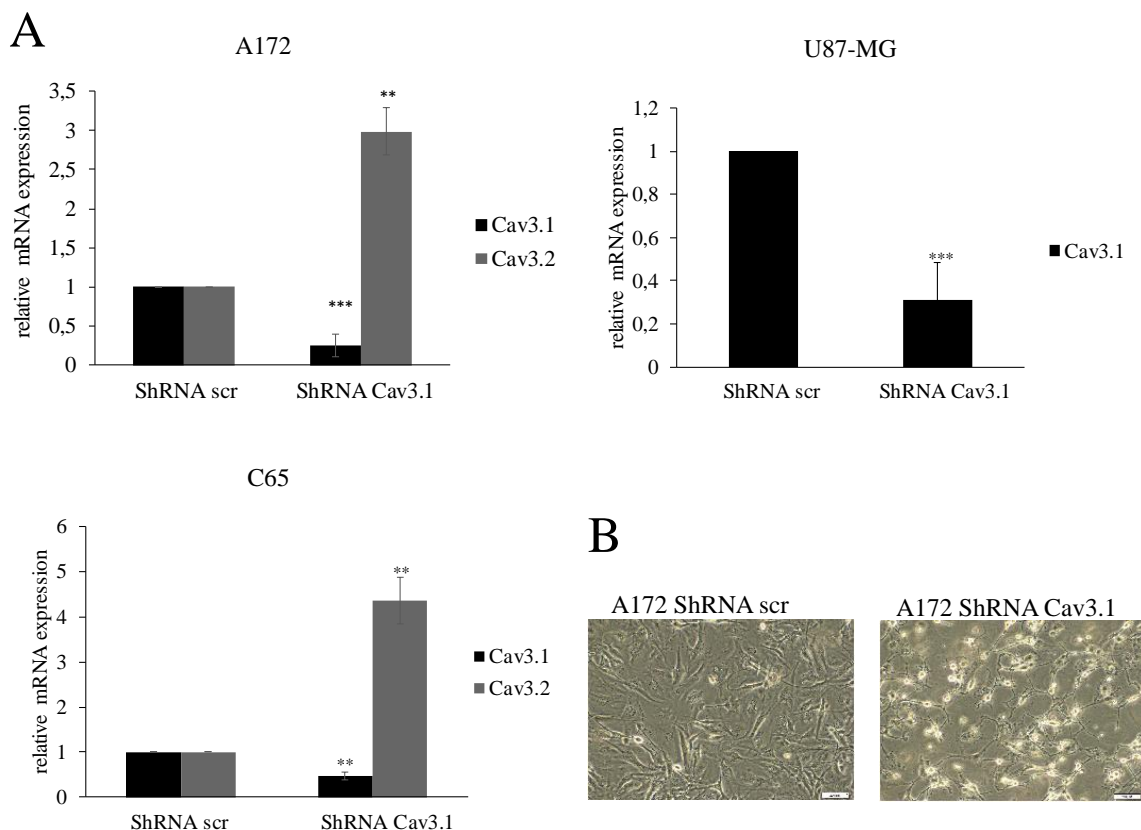


Figura 27. El silenciament de Cav3.1 sobrerregula Cav3.2. (A) Les cèl·lules A172, U87-MG i el cas primari C65 van ser infectats amb lentivirus que permetien l'expressió de ShRNA scrambled i ShRNA Cav3.1. El silenciament gènic es va comprovar als quatre dies després de la infecció. Es

representen gràficament els nivells d'mRNA obtinguts per RT-qPCR per als canals Cav3.1 i Cav3.2. En tots els casos els resultats han estat normalitzats respecte els nivells d'mRNA de GAPDH. (B) Imatges de contrast de fase realitzades a 10x en la línia A172 als quatre dies després de la infecció lentiviral. Els valors corresponen a les mitjanes i les desviacions estàndards derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

L'observació de cèl·lules on Cav3.1 silenciada va evidenciar un fenotip de mort. A la **figura 27B** s'observen imatges en contrast de fase de la línia cel·lular A172 que expressa un ShRNA scrambled o el ShRNA Cav3.1#1 als 4 dies després de la transducció lentiviral, on s'apunta la inducció de mort cel·lular en les cèl·lules en les que el Cav3.1 ha sigut silenciada. Per tant, mitjançant assaigs d'annexina V/PI es va analitzar el percentatge de mort obtingut en les cèl·lules A172 i RC2 transduïdes amb ShRNA Cav3.1 i ShRNA Cav3.2 de la construcció #1 respecte les cèl·lules control (ShRNA scrambled). Com es pot veure a la **figura 28**, el percentatge de cèl·lules vives minva significativament en ambdues línies amb el silenciament de Cav3.1 i augmenta significativament el percentatge de cèl·lules en apoptosi tardana (assolint un 40-50% en A72 i RC2, respectivament).

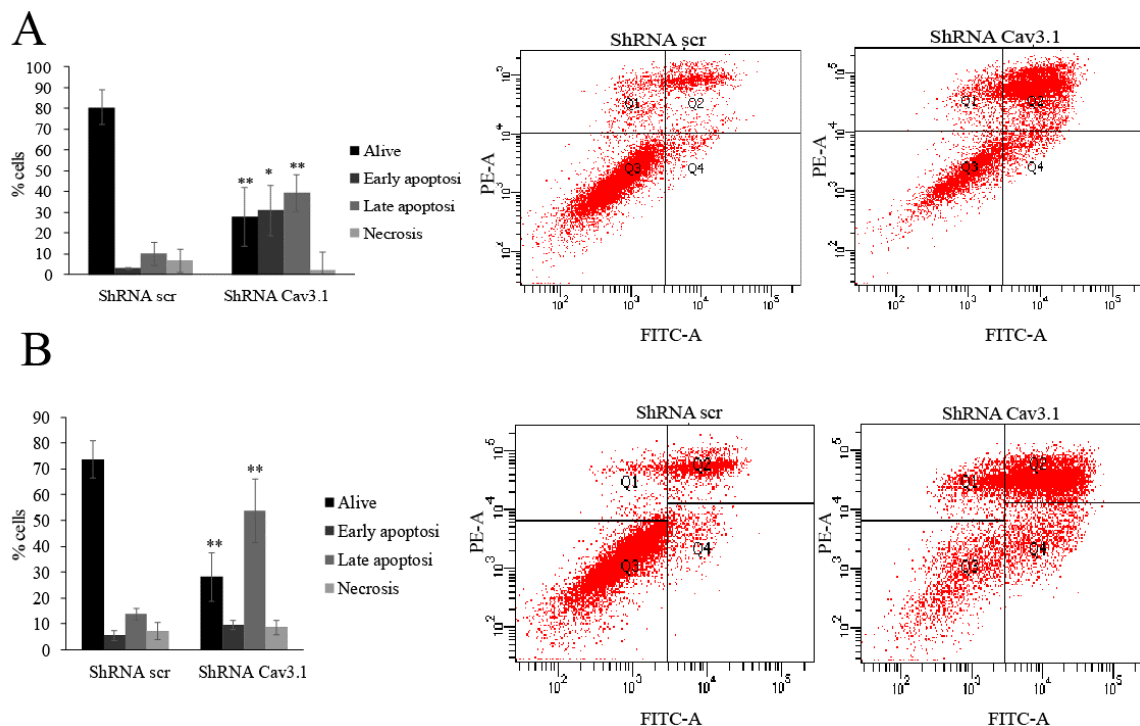


Figura 28. El silenciament de Cav3.1 condueix a la mort per apoptosi. (A) La línia cel·lular A172 i (B) la línia cel·lular resistent RC2, transduïdes amb ShRNA scrambled i ShRNA Cav3.1#1. Al cinquè dia es van analitzar les diferents poblacions cel·lulars mitjançant l'assaig Annexina V/PI per tal de conèixer el percentatge de la població cel·lular viva, en apoptosi inicial, tardana i en necrosi. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem (* $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$) Imatges significatives

Resultats

dels perfils obtinguts per citometria de flux amb la tinció Annexina V en l'eix de les X (FITC-A) i la tinció amb PI en l'eix de les Y (PE-A).

La validació del silenciament de Cav3.2 pel ShRNA#1 als quatre dies d'infecció es mostra a la **figura 29A** per la línia cel·lular A172 i la línia resistent a TMZ RC2. L'anàlisi per RT-qPCR indica que el silenciament de Cav3.2 amb aquest ShRNA#1 és d'un 80% en el cas de la línia A172 i un 55% en la línia resistent RC2. El silenciament de Cav3.2 provoca la sobre expressió significativa de Cav3.1 (i a la inversa), suggerint un mecanisme de regulació compensatori entre els TT-CC però que esdevé finalment en la mort cel·lular aparentment per apoptosi.

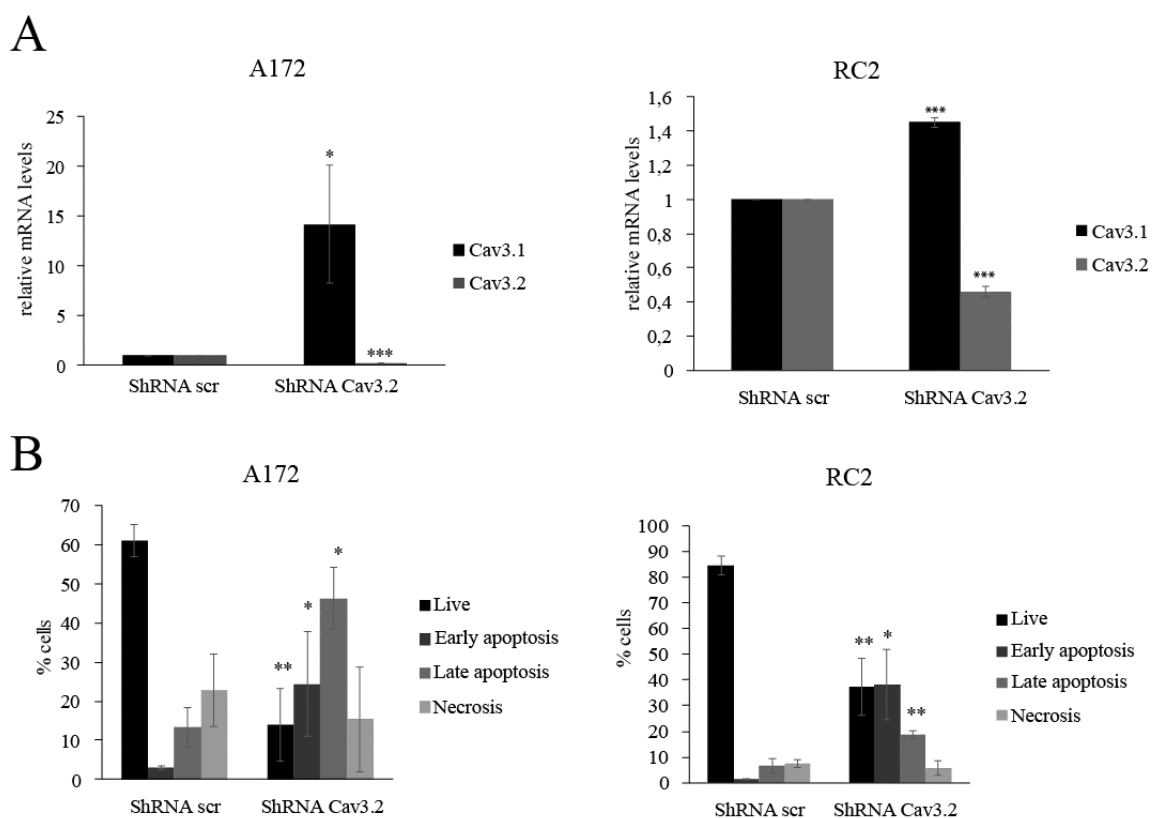
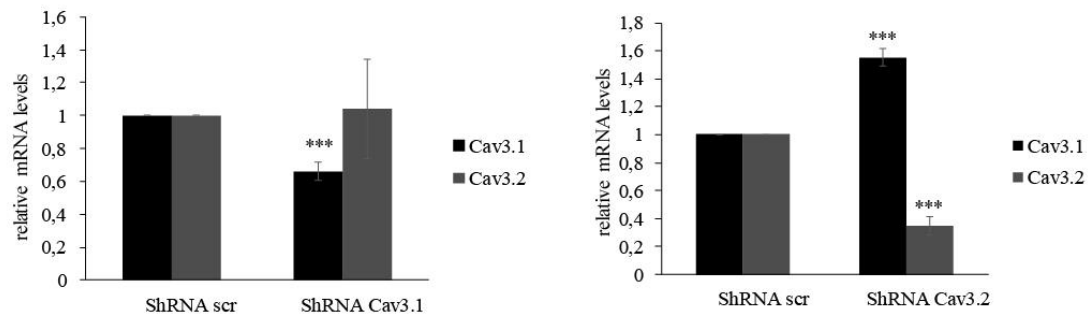


Figura 29. El silenciament del Cav3.2 sobregula Cav3.1 i condueix a la mort per apoptosi. (A) En les línies cel·lulars A172 i RC2 que expressaven un ShRNA scrambled o ShRNA Cav3.2, es van comprovar els nivells d'expressió dels TT-CC als 4 dies després de la infecció. Es representen gràficament els valors obtinguts per RT-qPCR. En tots els casos els resultats han estat normalitzats respecte els nivells d'mRNA de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les desviacions estàndards derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem (* $p \leq 0.5$; *** $p \leq 0.001$) (B) Assaig d'annexina V/PI realitzat al FACs als 6 dies després de la transducció del ShRNA scrambled o ShRNA Cav3.2. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem (* ≤ 0.5 ; ** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001).

En el cas de ShRNA Cav3.2 en comparació amb ShRNA *scrambled*, s'observa també una disminució significativa del percentatge de cèl·lules viables i un increment del percentatge de cèl·lules en apoptosi tardana als sis dies després de la infecció lentiviral en experiments d'annexina V/PI (Fig 29B).

Per tant, el silenciament gènic dels TT-CC condueix a una mort cel·lular apoptòtica en GBM.

A



B

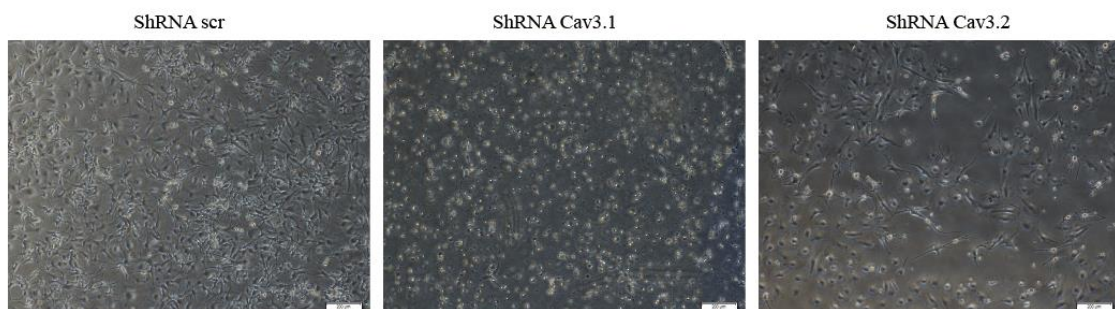


Figura 30. El silenciament de Cav3.1 i Cav3.2 amb els ShRNA #2 valida els resultats dels ShRNA #1. (A) Anàlisi dels nivells d'mRNA obtinguts per RT-qPCR. En tots els casos els resultats han estat normalitzats respecte els nivells d'mRNA de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem derivades de com a mínim tres experiments independents realitzats per triplicat. (***) $p \leq 0.001$. (B) Fotografies en fase als 7 dies després de la transfecció en les diferents condicions mostrant un fenotip de mort.

Disposem de dues seqüències de ShRNA per al gen *CACNA1G* i dues més per al gen *CACNA1H*. És molt important destacar que l'efectivitat del silenciament entre seqüències és diferent; en el cas de l'ShRNA Cav3.1 ja que amb el shRNA#1 aconseguim fins a un 90% de disminució de transcrit de mRNA respecte el control (ShRNA *scrambled*) mentre que amb el shRNA#2 només arribem a una disminució del 40% del transcrit respecte el ShRNA *scrambled* als quatre dies després de la transfecció. En el cas de *CACNA1H* el shRNA#1 també es mostra més eficient (amb un silenciament del 90% vs el 60% aproximadament de l'shRNA#2). No obstant tot i tenir diferents percentatges d'eficiència de silenciament a 4 dies les cèl·lules silenciades en la construcció #2

Resultats

també presenten un fenotip de mort que hem caracteritzat mitjançant contrast de fase i l'assaig d'Annexina V/PI on veiem un significatiu nombre de cèl·lules mortes per apoptosi tardana i necrosi en comparació amb el control ShRNA *scrambled* (dades no mostrades).

1.5 El silenciament gènic dels TT-CC desregula el flux autofàgic en GBM

Els estímuls que condueixen a l'activació de l'autofàgia són múltiples, ja que la finalitat de l'activació d'aquesta via és promoure la supervivència cel·lular i la producció d'energia front estressos metabòlics (Yin et al., 2016). El bloqueig i/o silenciament TT-CC s'ha relacionat amb una desregulació de l'autofàgia, possiblement bloquejant-la previ a una inducció de la mort cel·lular per apoptosi (Das et al., 2013; Niklasson et al., 2017; Valerie et al., 2013; Zhang et al., 2017). Per tant, hipotetitzant que els TT-CC són potencials reguladors de la via autofàgica, vam estudiar aquest procés en GBM primari i resistent mitjançant el silenciament/inhibició dels TT-CC.

Primer es van analitzar els canvis en l'autofàgia en cèl·lules on Cav3.1 havia estat silenciament mitjançant la construcció #1 de shRNA. Com s'observa a la **figura 31** es van analitzar els nivells de LC3, p62 i d'agregats proteics poli-ubiquitinats mitjançant *Western blot*. Si ens fixem en la proteïna LC3 observem una conversió des de la forma no lipidada (no associada a autofagosomes) LC3I, a la forma lipidada (associada autofagosomes) LC3II, en les línies cel·lulars de GBM A172, U87-MG i la línia cel·lular resistent, RC2 després del silenciament amb l'ShRNA de Cav3.1 respecte a cèl·lules control (ShRNA *scrambled*).

L'increment de LC3II indica que hi ha un augment del nombre d'autofagosomes en les cèl·lules transduïdes amb l'ShRNA #1 de Cav3.1. Aquest increment pot ser degut tant a una inducció (augment del nombre d'autofagosomes formats) com a un bloqueig del flux autofàgic (acumulació d'autofagosomes). Per aquest motiu, es va utilitzar paral·lelament el tractament amb Bafilomicina-A (Bafilomicina-A, 20 nM durant les 3 darreres hores de tractament), un inhibidor de la bomba V-ATPasa lisosomal que evita la fusió dels autofagosomes amb els lisosomes i per tant, bloqueja el flux autofàgic (Klionsky et al. 2016). Front a un estímul inductor d'autofàgia, els nivells de LC3II després del bloqueig amb Bafilomicina-A seran més alts que amb Bafilomicina-A aplicada sobre el control sense cap altre estímul, ja que hi haurà més flux autofàgic induït per l'estímul i per tant s'acumulen més autofagosomes. Per altra banda, si es tracta d'un bloqueig, els nivells de LC3II després del tractament amb Bafilomicina-A seran iguals que en el tractament únicament amb el bloquejant de l'autofàgia, ja que el bloqueig ja existia i no es podran acumular més autofagosomes

amb l'addició de Bafilomicina-A. El tractament combinat ShRNA Cav3.1 més Bafilomicina-A no va produir un increment dels nivells de LC3II respecte el control, suggerint un aparent bloqueig del flux autofàgic pel silenciament de Cav3.1. No obstant, cal recordar que els nivells de LC3II en les cèl·lules silenciades per Cav3.1 respecte les control (ambdues sense Bafilomicina-A) mostren més LC3II després del silenciament. D'altra banda, el cotractament ShRNA *scrambled* i Bafilomicina-A demostra l'efectiu bloqueig per Bafilomicina-A de l'autofàgia.

Pel que fa a la proteïna p62 s'aprecia que en la condició ShRNA Cav3.1 els nivells de p62 disminueixen de forma important respecte el control ShRNA *scrambled* i a més, quan tractem amb Bafilomicina-A els nivells no s'incrementen fins als del seu control ShRNA *scrambled*. p62 es pot degradar durant el flux autofàgic, i per tant el bloqueig amb Bafilomicina-A hauria d'incrementar els seus nivells. Tan mateix, aquesta proteïna pot estar sotmesa a una complexa regulació transcripcional.

La proteïna adaptadora de cargo a l'autofagosoma, p62, és una proteïna implicada en el reconeixement de proteïnes a degradar per la via autofàgica-lisosomal essent alhora un substrat de degradació (Puissant et al., 2012). Per tant els nivells proteics de p62 es troben, de forma habitual, inversament relacionats amb els nivells de conversió de LC3II (Harr et al., 2010). Es van analitzar els nivells de p62 per *Western Blot* simple i amb combinació amb Bafilomicina-A després del silenciament de Cav3.1. Es va observar que p62 es reduïa dràsticament en el silenciament de Cav3.1, el que podria suggerir una inducció de l'autofàgia, però quan es combina el silenciament amb el tractament amb Bafilomicina-A, els nivells de p62 no s'acumulen al mateix nivell que el seu control també tractat amb Bafilomicina-A (**Fig 31**). Aquest fet suggeriria que tal vegada es produïa una regulació a nivell transcripcional d'aquesta proteïna. Per corroborar aquesta hipòtesi es van realitzar RT-qPCRs de p62 amb cèl·lules A172, U87-MG i RC2 transduïdes amb ShRNA *scrambled* o ShRNA Cav3.1 (**Fig 32A**). Trobant-se que els nivells d'mRNA de p62 es troben molt disminuïts després del silenciament de Cav3.1. Per tant els nostres resultats apunten a una reducció a nivell transcripcional de p62 en les cèl·lules en què Cav3.1 ha estat silenciada i suggereixen que l'activitat de Cav3.1 actua en GBM com un regulador transcripcional positiu de p62 a través d'un mecanisme desconegut. A més vam realitzar un anàlisi utilitzant la plataforma Gliovis (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>) on hem pogut comprovar mitjançant la correlació en la Dataset de Rembrandt que existeix una correlació positiva i significativa entre l'expressió dels gens *CACNA1G* i *SQSTM1* en GBMs (**Fig. 32B**).

També es va observar un increment del nombre de proteïnes poliubiquitinitzades en les cèl·lules A172 silenciades per Cav3.1 respecte del control (scr) (**Fig 31**), suggerint un bloqueig del flux autofàgic i acumulació de substrats a degradar que estaria d'acord amb la caiguda de p62, que actua com a receptor de cargo. No obstant, no podem excloure la possibilitat d'estar front a una autofàgia

Resultats

defectiva, ja que l'acumulació de proteïnes poliubiquïtinitzades en les cèl·lules silenciades per Cav3.1 també podria ésser deguda a la disminució de p62, on la cèl·lula no és capaç de reclutar el cargo dins l'autofagosoma acumulant-se proteïnes poliubiquïtinitzades al citoplasma cel·lular oferint una lectura a priori confusa sobre l'estat autofàgic cel·lular.

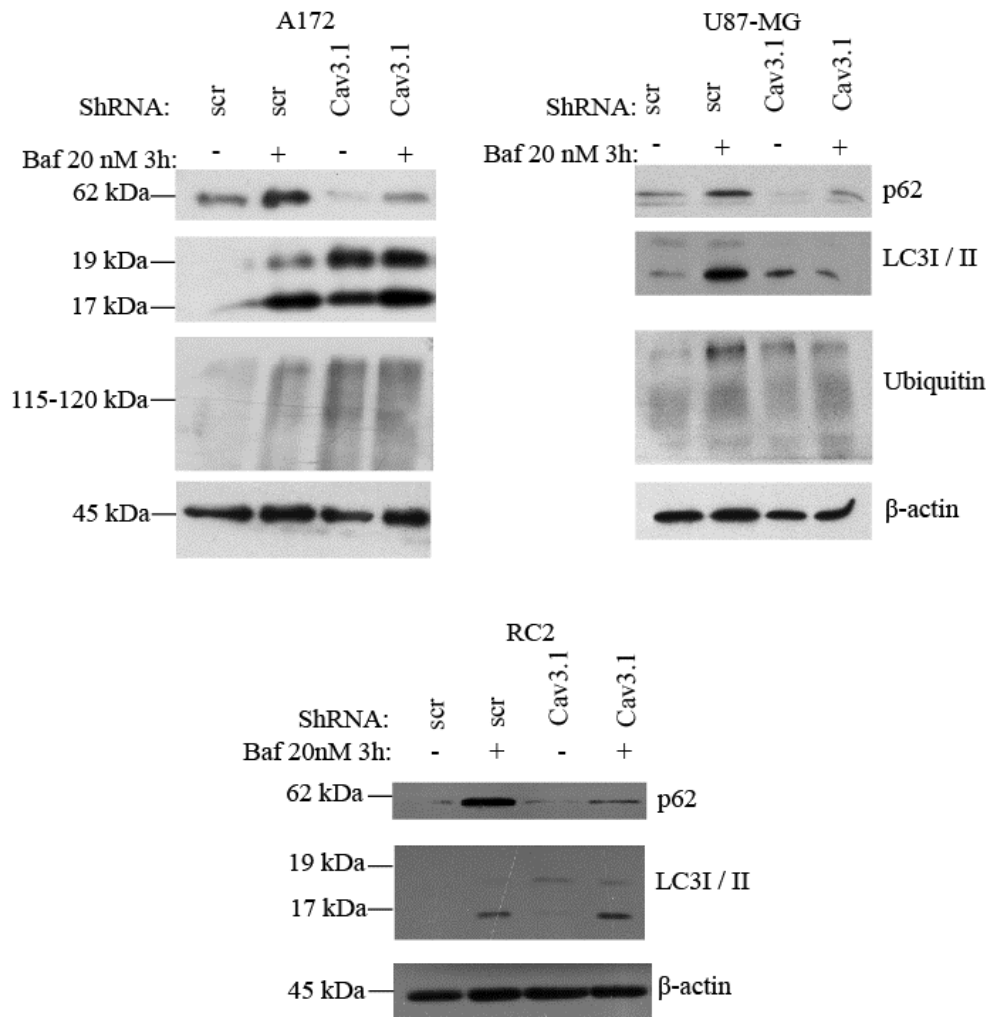
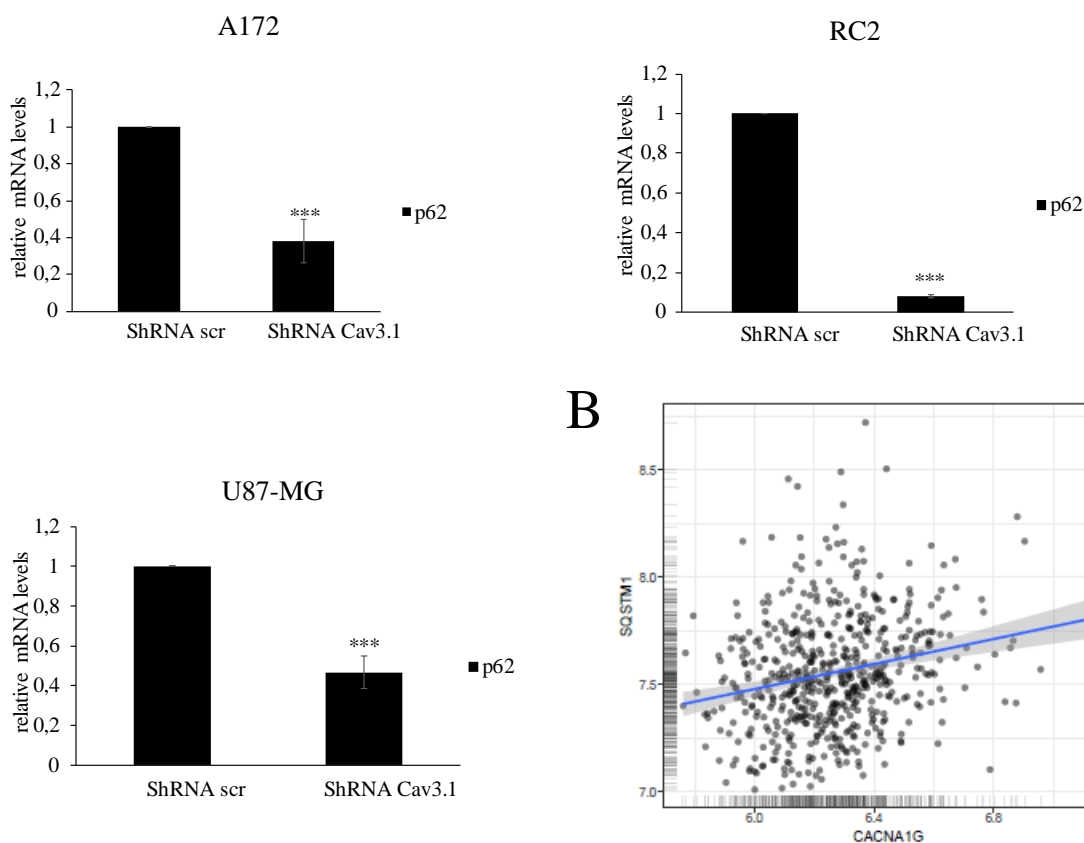


Figura 31. El silenciament de Cav3.1 desregula l'autofàgia. Les línies cel·lulars de GBM A172, U87-MG, RC2 van ser transduïts amb ShRNA scrambled i ShRNA#1 Cav3.1; en les darreres 3 hores del quart dia del cultiu s'afegí Bafilomicina-A a 20 nM a les mostres esmentades i es va recollir el lisat per realitzar immunoblot contra les proteïnes p62, LC3I/II i ubiquïtina. β -actina s'utilitza com a control de càrrega.

A



B

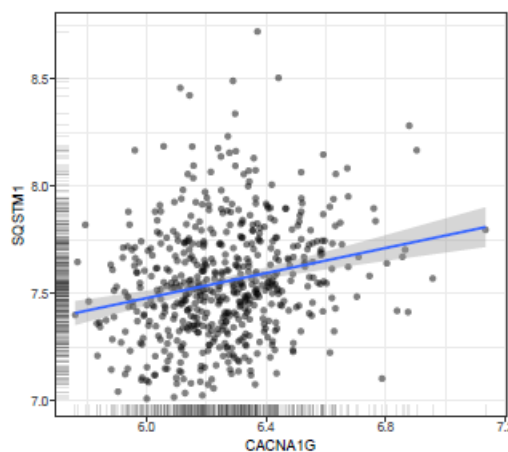


Figura 32. El silenciament de Cav3.1 condueix a una disminució transcripcional de p62. (A) Representació gràfica dels valors d'mRNA de *SQSTM1/p62* obtinguts per RT-qPCR. Valors normalitzats als nivells de mRNA de *GAPDH*. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem. (***) $p \leq 0.001$). (B) Estudi de la correlació entre els gens *SQSTM1* (proteïna p62) i *CACNA1G* (Cav3.1) analitzades mitjançant la plataforma Gliovis i el data set Rembrandt. Correlació mitjançant test de Pearson. Es va obtenir una pendent amb valor 0.206 existint una correlació positiva i significativa (**) entre l'expressió de *CACNA1G* i *SQSTM1*.

En conjunt, el silenciament de Cav3.1 va incrementar els nivells de LC3II, va reduir p62 i va mostrar una tendència a augmentar les proteïnes poliubiquitinatzades en assajos de *Western blot*. Aquestes resultats es podrien reconciliar pensant en una inducció d'una autofàgia defectiva, degut a la repressió transcripcional de p62, quan es silencia el canal Cav3.1 i tenint en compte que Cav3.1 sembla estar actuant com un regulador transcripcional de p62.

A continuació, vam estudiar l'efecte del silenciament gènic de Cav3.2 sobre l'autofàgia. Per això es van transduïr cèl·lules A172 i cèl·lules resistents a TMZ, RC2, amb un ShRNA contra Cav3.2 o amb un ShRNA *scrambled* com a control, i es va utilitzar el tractament amb Bafilomicina-A durant les últimes 3 hores per bloquejar el flux autofàgic i esbrinar si l'autofàgia es trobava bloquejada o

Resultats

induïda després del silenciament d'aquest canal. A la **figura 33A** s'observa el *Western blot* de les línies A172 i RC2 on no s'aprecien canvis de conversió de LC3I a LC3II. El bloqueig amb Bafilomicina-Ailomicina en cèl·lules transduïdes amb l'ShRNA Cav3.2 no revela modificacions sobre l'acumulació de LC3II.

També es van analitzar els nivells de p62 a nivell de *Western blot* (**Fig 33A**), en el silenciament de Cav3.2 simple i amb combinació amb Bafilomicina-A. Es va observar que els nivells de p62 després del silenciament de Cav3.2 són més elevats que al control tant en A172 com en RC2, suggerint una possible sobre regulació transcripcional.

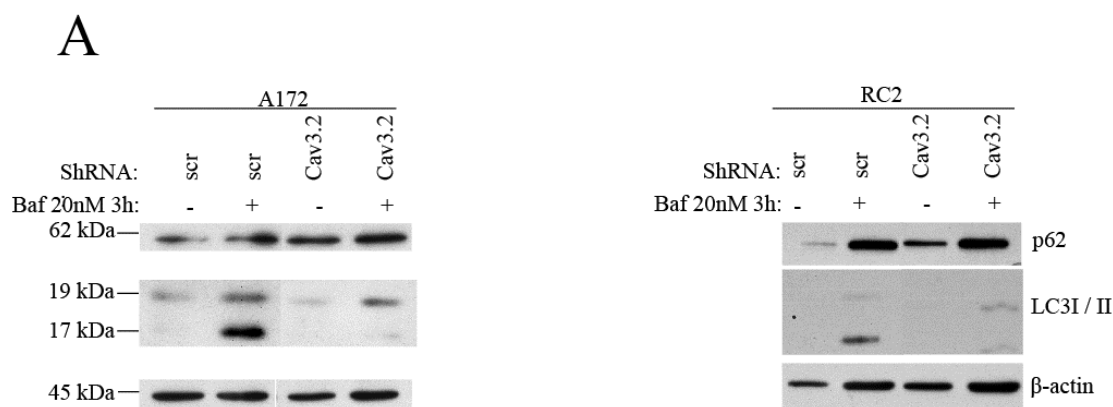


Figura 33. El silenciament gènic de Cav3.2 no afecta al flux autofàgic. (A) Anàlisi dels nivells de LC3I/LC3II en la línia cel·lulars A172 i la línia cel·lular resistent RC2 infectades amb lentivirus que permeten l'expressió d'un ShRNA contra Cav3.2 o un ShRNA scrambled com a control. β-actina s'utilitza com a control de càrrega.

Per aclarir aquest aspecte, es van realitzar RT-qPCRs de p62 a partir de cèl·lules A172 que expressaven l'ShRNA scrambled o ShRNA Cav3.2 (**Fig 34**). Es va trobar que els nivells d'mRNA de p62 estaven augmentats significativament en les cèl·lules silenciades amb el ShRNA de Cav3.2. La hipòtesi que plantegem per explicar aquest fet es basa en el sistema de compensació que aparentment es produeix quan silenciem els canals Cav3.1 i Cav3.2, pel qual el silenciament de la isoforma Cav3.2 condueix a una sobre regulació de Cav3.1 i a l'inrevés (veure **Figs 27 i 29**). Per tant, seria el possible rebot en l'expressió d'aquest canal, Cav3.1, en última instància el que augmentaria la transcripció de p62 després del silenciament de Cav3.2, d'acord amb l'efecte observat en el silenciament de Cav3.1.

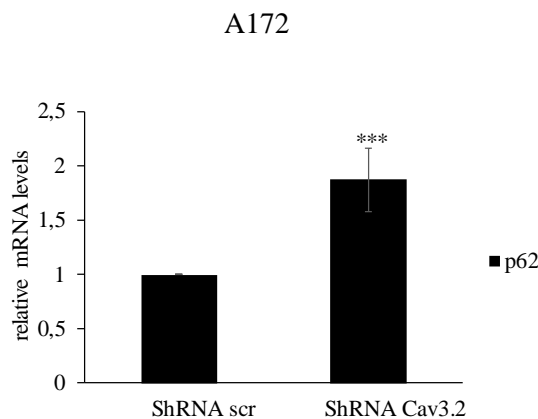


Figura 34. El silenciament de Cav3.2 augmenta els nivells d'mRNA de p62. Els nivells relatius d'mRNA de p62 es van analitzar en la línia cel·lular A172 infectada amb lentivirus per permetre l'expressió de ShRNA scrambled (*scr*) o l'ShRNA Cav3.2. Representació gràfica dels valors d'mRNA de SQSTM1/p62 obtinguts per RT-qPCR. Valors normalitzats als nivells de mRNA de GAPDH i comparats a la condició ShRNA *scr*. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem. (***) $p \leq 0.001$).

1.6 El silenciament dels TT-CC implica les vies AMPK i mTOR

La proteïna mTOR (mechanistic/mammalian Target of Rapamycin) és una serina/treonina cinasa molt conservada i un efector *downstream* de la via PI3K/AKT que forma dos complexos multiproteics, mTORC1 i mTORC2. mTORC1 és sensible a la inhibició per rapamicina. L'activitat de mTORC1 promou la de dianes com S6K1 i 4EBP1, els quals estan involucrats en la traducció d'mRNAs, i la inhibició de la via autofàgica-lisosomal.

Degut a la importància del complex mTOR en el context autofàgic, es va comprovar si aquest es trobava alterat quan es silencien Cav3.1 i Cav3.2. L'estudi per *Western blot* va incloure mostres de la línia de GBM A172 silenciades per Cav3.1 i Cav 3.2 amb ShRNA Cav3.1 i ShRNA Cav3.2 de la construcció #1 (**Fig 35**). S'analitzaren els nivells de fosforilació d'AMPK que quan són elevats resulten en la inhibició de mTOR i l'activació del complex ULK. També es van analitzar els nivells de fosforilació de p70S6K com a substrat de mTOR, així com l'estat de fosforilació d'ERK, un dels *inputs* de mTOR, que regula positivament mTOR mitjançant la inhibició de TSC1/2 (Laplane et al., 2013). Així, la inhibició d'ERK condueix a la inhibició de mTOR i per tant desencadena el flux autofàgic. Es va poder constatar que ERK no es veu alterada com a conseqüència del silenciament dels TT-CC. El silenciament del Cav3.1 va produir una disminució en l'estat de fosforilació d'AMPK, que té com a conseqüència un increment en la fosforilació i per tant a l'activitat de

Resultats

p70S6K, indicant que mTOR es troba més actiu en les cèl·lules silenciades per Cav3.1 que en el control (scr). En el cas de silenciament de Cav3.2 no es van observar canvis significatius respecte el control (scr). Com a control es van utilitzar cèl·lules tractades amb Rapamicina, que inhibeix mTOR i per tant indueix l'autofàgia observant-se que els nivells de p70S6K fosforilats (una diana de mTOR) estan molt baixos.

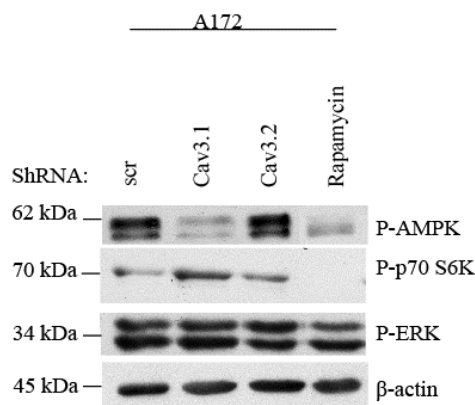


Figura 35. El silenciament de Cav3.1 activa mTOR a través d'AMPK. Lisats cel·lulars de cèl·lules A172 que expressen un ShRNA contra Cav3.1, ShRNA Cav3.2 o un ShRNA scrambled (scr) després de 4 dies de la infecció lentiviral i un control tractat amb Rapamicina 24 hores. Es van analitzar els nivells de fosforilació de p70S6K (T389), AMPK (T172) i ERK (Y202/204). La β -actina s'utilitza com a control de càrrega.

1.7 Els bloquejants farmacològics de TT-CC condueixen a la desregulació de l'autofàgia

El bloqueig dels TT-CC en línies cel·lulars de melanoma condueix a un bloqueig de l'autofàgia i la disminució de la viabilitat cel·lular (Das et al., 2013; Niklasson et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2012) van descriure que el bloqueig dels TT-CC o el silenciament de Cav3.2 en GBM produeix una disminució de la viabilitat cel·lular en aquest tumor. Els nostres resultats amb Mibefradil i NNC-55-0396 en GBM mostren una afectació de la viabilitat cel·lular, i una desregulació autofàgica observada després del silenciament gènic dels TT-CC ens van portar a estudiar l'autofàgia després de la inhibició dels TT-CC.

Per aquest fi, es van realitzar una sèrie d'immunoblots contra les proteïnes p62 i LC3 utilitzant lisats de cèl·lules tractades amb els bloquejants Mibefradil i NNC-55-0396, i fent servir l'eina del contractament amb Bafilomicina-A com a bloquejant del flux autofàgic (**Fig 36**). A la **figura 36A** es mostren els resultats per Mibefradil i a la **figura 36B** els corresponents al tractament amb NNC-55-0396. L'efecte de Bafilomicina-A sobre LC3II és similar al de Mibefradil o NNC-55-0396, i quan

es combinen Mibefradil/ NNC-55-0396 i Bafilomicina-A, els nivells de LC3II són semblants que amb Bafilomicina-A sola, indicant-nos que els bloquejants de TT-CC Mibefradil/ NNC-55-0396 estarien bloquejant l'autofàgia. No obstant, els nivells de LC3II després del tractament amb Mibefradil/ NNC-55-0396 (sense Bafilomicina-A) són sempre superiors als del control. D'altra banda, els nivells de p62 augmenten lleugerament amb els bloquejants de TT-CC, d'acord amb un possible bloqueig de l'autofàgia. La regulació transcripcional de p62 no ha estat analitzada però resultats preliminars indiquen que podria estar augmentada per efecte de NNC-55-0396.

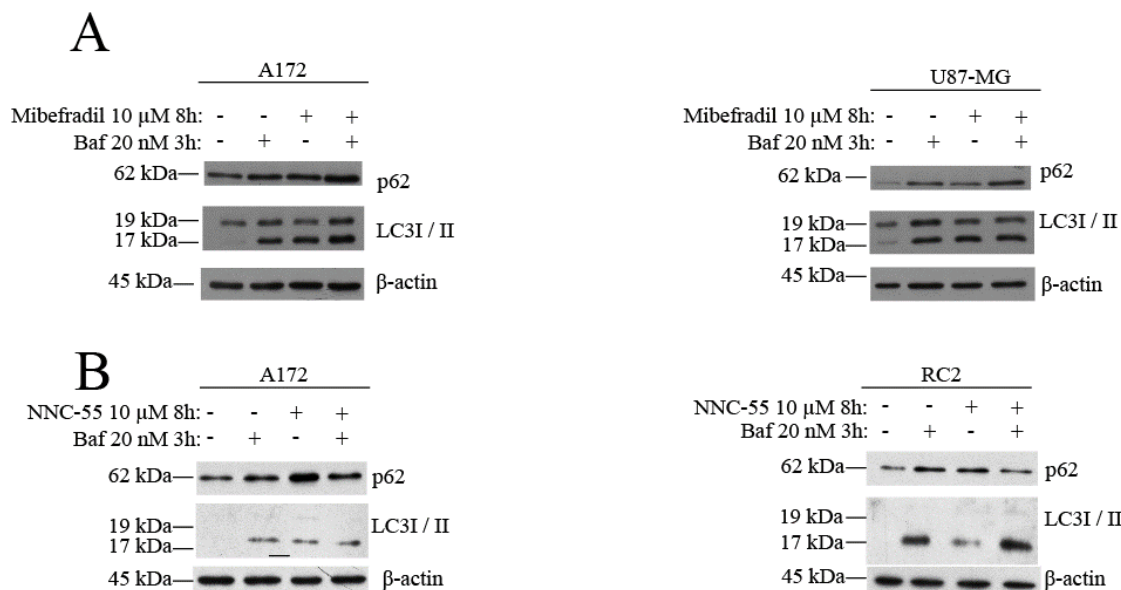


Figura 36. Els bloquejants de TT-CC desregulen l'autofàgia. (A) Les línies cel·lulars A172 i U87-MG es van tractar amb Mibefradil a una concentració de 10 μ M durant 8 hores i les últimes 3 hores amb Bafilomicina-A 20 nM. Els lisats cel·lulars obtinguts van ser immunoblotats contra p62 i LC3I/ L3II. La β -actina es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Les línies cel·lulars A172 i la línia cel·lular resistent a TMZ van ser tractades amb NNC-55-0396 a una concentració de 10 μ M durant 8 hores i les darreres 3 hores es va afegir Bafilomicina-A 20 nM. Els lisats cel·lulars obtinguts es van immunoblotar per les proteïnes d'autofàgia p62 i LC3. La β -actina s'utilitza com a control de càrrega.

1.8 El bloqueig dels TT-CC condueix a l'elevació dels nivells de calci citoplasmàtics afectant les vies AMPK/mTOR/ AKT i produint en última instància la translocació nuclear de TFEB

Per esbrinar si la desregulació de l'autofàgia com a conseqüència del bloqueig dels TT-CC és dependent de la inhibició de la via mTOR/AKT, lisats de cèl·lules de GBM A172 tractades amb el

Resultats

bloquejant NNC-55-0396 10 μ M durant 8 hores i de cèl·lules deprivades de sèrum durant 24 hores (com a control positiu d'inducció d'autofàgia) es van analitzar per *Western blot* contra la diana de mTOR p70S6K. Es va observar sorprenentment una reducció dels nivells de fosforilació de p70S6K en les cèl·lules tractades amb NNC-55-0396, tal com passava amb la deprivació de sèrum i el tractament amb rapamicina. Per altra banda també s'observà una disminució de la fosforilació de la proteïna AKT que condueix a la inhibició de mTOR, demostrant per tant una inducció del flux autofàgic. Per tant, les nostres dades evidencien que després del bloqueig farmacològic dels TT-CC s'activen senyals d'inducció de l'autofàgia que sembla estar mediat per les vies de senyalització mTOR/AKT.

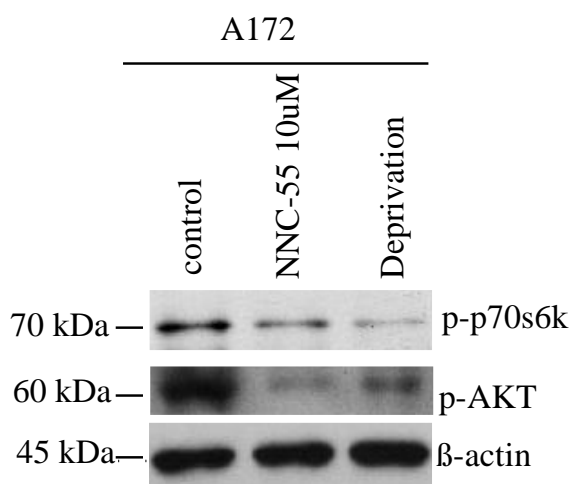


Figura 37. El bloqueig farmacològic de TT-CC disminueix l'activitat d'mTOR i AKT. Lisats de cèl·lules de GBM A172 tractades amb NNC-55-0396 a una concentració de 10 μ M durant 8h, control o en deprivació de sèrum durant 24 hores es van analitzar pels nivells de fosforilació de p70S6K (T389) i d'AKT (S473). S'utilitza la β -actina com a control de càrrega.

Per aprofundir en els mecanismes que porten a l'afectació de la viabilitat cel·lular i que alteren l'autofàgia com a resultat del bloqueig dels TT-CC, es va voler investigar si la inhibició farmacològica dels TT-CC podria estar suscitant la sortida de calci des de compartiments subcel·lulars que es coneix actuen com a reservoris de calci intracel·lular (RE, mitocondri o lisosomes) (Williams et al.,2013; Xue et al.,1994). Així, es van realitzar assaigs per detectar el calci intracel·lular, emprant el kit Fluo-8; aquest compost lipofílic un cop dins de la cèl·lula s'uneix al calci intracel·lular, el compost unit a aquest ió es escindit per una esterasa essent el resultat l'emissió de fluorescència a una longitud d'ona 525 nm quan excitem el compost a una longitud d'ona de 490 nm. Els resultats obtinguts demostren que el tractament amb el bloquejant de TT-CC NNC-55-0396 incrementa els nivells de calci intracel·lular (**Fig 38**). D'aquesta manera, alts nivells de calci citosòlic podrien activar CAMKK2 i portar a la inhibició de mTOR i una subseqüent activació de

l'autofàgia.

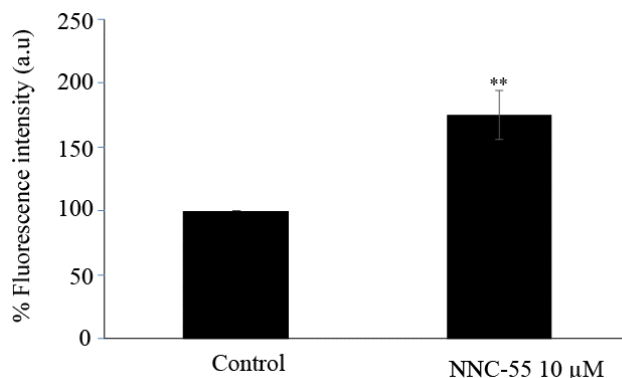


Figura 38. El calci citoplasmàtic s'incrementa després del bloqueig farmacològic dels TT-CC. Mesures realitzades per fluorescència amb el kit Fluo-8-No wash sobre les cèl·lules de GBM A172 tractades durant 4 hores amb el bloquejant farmacològic NNC-55-096 a una concentració de 10 μ M. Al gràfic es mostra el percentatge d'intensitat de fluorescència mesurat en un fluorímetre. Les barres d'error indiquen la mitjana \pm sem. (** $p \leq 0.01$).

TFEB (*Transcription Factor EB*) és un factor de transcripció capaç de regular funcions autofàgiques i lisosomals a través del control d'un ampli programa de transcripció gènica. L'activitat de TFEB es veu inhibida per fosforilació, en part per mTOR que el fosforila a la membrana del lisosoma. Pel contrari, la seva defosforilació permet el transport cap el nucli on activa la transcripció gens relacionats amb autofàgia i lisosomals (Medina et al. 2015), per exemple Lamp1 i p62.

Els resultats mostrats en les **figures 32 i 34** confirmen una regulació transcripcional de p62 després del silenciament de Cav3.1 i Cav3.2, que hipotetitzem podria ser mediada per TFEB. Per confirmar aquesta hipòtesi, es van realitzar immunoblots contra TFEB, utilitzant un anticòs que és capaç de detectar tant la forma fosforilada (inactiva o d'alt pes molecular) com la forma defosforilada (activa/nuclear o de baix pes molecular) de TFEB.

A la **figura 39A** observem com el silenciament de Cav3.1 en la línia de GBM A172 TFEB apareix en la zona d'alt pes molecular (fosforilat); en canvi, en el silenciament de Cav3.2 apareix una tendència cap a la banda defosforilada o de més baix pes molecular de TFEB (**Fig 39**). Els lisats de cèl·lules silenciades per Cav3.1 i 3.2 es van comparar amb lisats de cèl·lules tractades amb NNC-55-0396. Cèl·lules A172 tractades amb NNC-55-0396 a les concentracions de 5 μ M i 10 μ M produeixen un patró de TFEB defosforilat (amb predomini de la banda de baix pes molecular), indicant l'activació de TFEB i transcripció de gens d'autofàgia i lisosomals. Aquests resultats estan d'acord amb la inhibició de mTOR per NNC-55-0396. Com a controls es van utilitzar cèl·lules en

Resultats

deprivació de sèrum per tal d'obtenir un control positiu de defosforilació de TFEB (activació de l'autofàgia) i tractades amb ciclosporina A (1 μ M, 24 hores), que actua inhibint calcineurina (proteïna fosfatasa dependent de calci que defosforila TFEB) (Medina et al. 2015). També es va fer el tractament amb Bapta-AM durant 24 hores, un agent quelant de calci. En aquest cas vàrem observar una única banda superior fosforilada/ inactiva de TFEB. El segrest del calci inactivaria calcineurina, que ha estat implicada en la defosforilació/ activació de TFEB (Sun et al.,2016).

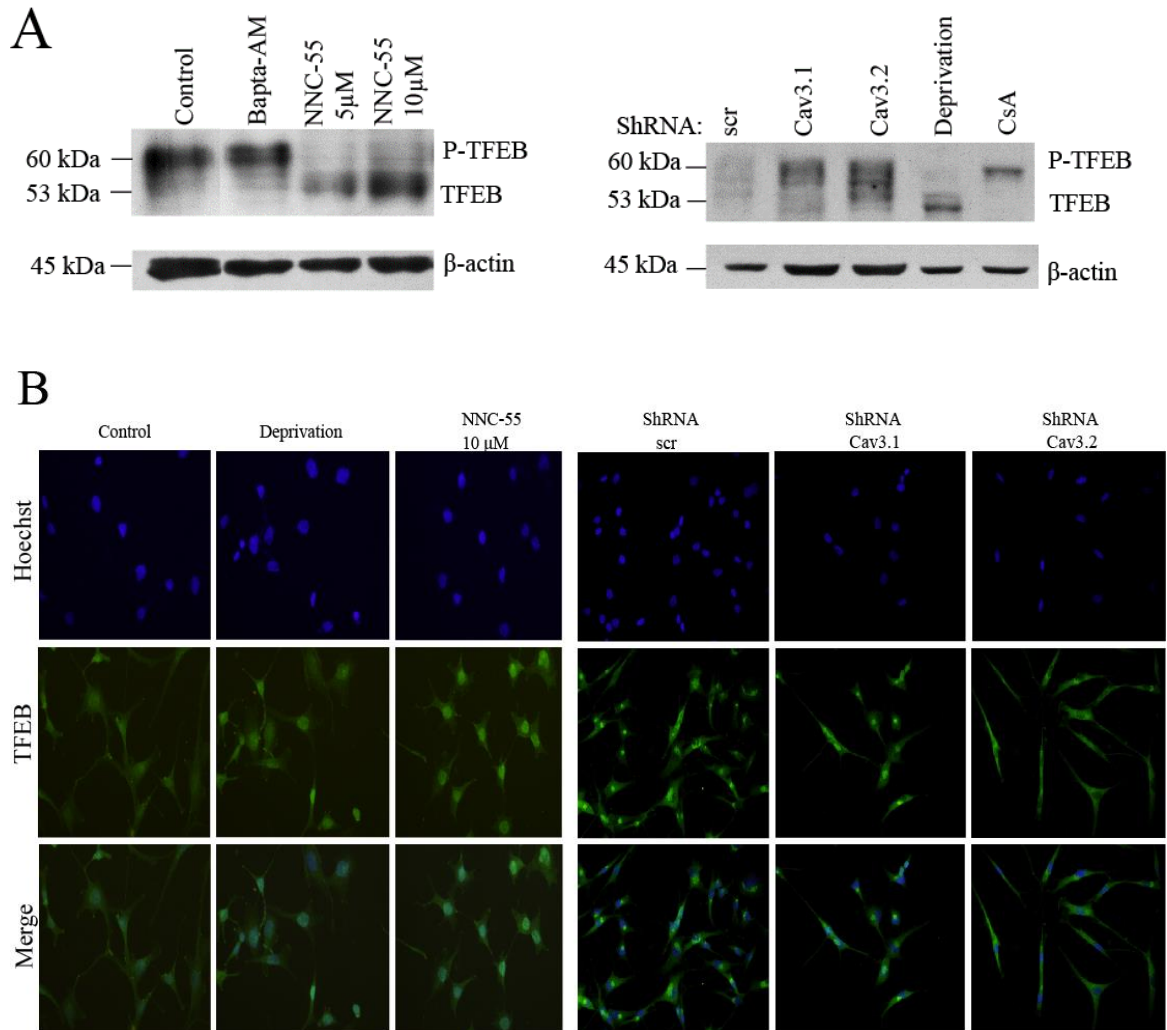


Figura 39. El bloqueig farmacològic dels TT-CC promou la translocació nuclear de TFEB i el silenciament gènic Cav3.1 i Cav3.2 afavoreix la seva localització citoplasmàtica. (A) Immunoblot de TFEB en la línia A172 en condicions control, Bapta-AM 24h (control negatiu), NNC-55-0396 a dues diferents concentracions 5 μ m 24h i NNC-55-0396 10 μ m 8h. La banda superior del WB correspon a la forma fosforilada/ inactiva de TFEB, mentre que la banda de baix pes correspon a la forma no fosforilada/ activa. Immunoblot de TFEB en cèl·lules A172 que expressen un ShRNA Cav3.1, ShRNA Cav3.2 o ShRNA scrambled (als 4 dies d'infecció lentiviral). Com a controls es va utilitzar la deprivació de sèrum, que promou l'activació de TFEB, mentre que el tractament amb ciclosporina A (CsA) permet que TFEB es mantingui fosforilat. La β -actina és utilitzada com a control de càrrega. (B) Immunotinció de TFEB en cèl·lules A172 tractades amb NNC-55-0396, en condicions de deprivació, comparades amb la situació control i A172 transfectades amb ShRNA Cav3.1 i ShRNA Cav3.2 comparades amb ShRNA scrambled (als 4 dies després de la infecció lentiviral). Les imatges mostren les tincions simples amb Hoechst (blau), anti-TFEB (verd) i la tinció doble. Cal remarcar la co-localització nuclear en la condició de deprivació de nutrients i en el tractament amb NNC-55-0396. En canvi, en les cèl·lules no tractades o silenciades per Cav3.1 i Cav3.2, TFEB és principalment perinuclear. (C) Quantificació de la immunotinció on es representa el % d'intensitat total a nucli i citoplasma per a cada condició. Es van comptar 3 experiments independents i com a mínim 4 camps per condició.

Per investigar si el factor de transcripció EB canvia la localització per tal d'afavorir la transcripció de gens d'autofàgia i lisosomals es va realitzar un estudi per immunocitoquímica sobre la línia de GBM A172 en cèl·lules tractades amb NNC-55-0396 i silenciades per als gens que codifiquen les dues isoformes de TT-CC (Cav3.1 i Cav3.2). A la **figura 39B** podem observar que amb el tractament amb el bloquejant de TT-CC, NNC-55-0396 es dona un canvi de localització respecte al control, passant d'una localització citoplasmàtica-perinuclear (control) a una immunolocalització nuclear de TFEB. El silenciament de Cav3.1 i Cav3.2 corroboren els resultats obtinguts per Western Blot a la **figura 39A**, la immunotinció revela que el patró de TFEB és clarament perinuclear quan les cèl·lules es troben silenciades per ShRNA Cav3.1 on trobem TFEB localitzat en un sol punt molt a prop del nucli. En el cas del silenciament gènic de Cav3.2 el resultat és una tinció citoplasmàtica per TFEB però no tant localitzada a un punt com és el cas de Cav3.1.

A la representació gràfica de la quantificació de la immunotinció s'observa un increment significatiu de TFEB en nucli i una disminució significativa en el citoplasma en els casos en que les cèl·lules han estat tractades amb deprivació de sèrum durant 24 hores i les tractades amb NNC-55-0396 10 μ M 8 hores respecte el control. Les cèl·lules on els gens que codifiquen per Cav3.1 i Cav3.2 han estat silenciats no mostren canvis respecte el seu control (ShRNA scrambled).

En conclusió, pel que fa a TFEB, podem afirmar que el tractament amb el bloquejant de TT-CC

Resultats

NNN-55-0396 produeix una defosforilació /activació de TFEB, acompanyada de translocació nuclear, que permetria la transcripció de gens d'autofàgia i lisosomals i suportaria la inducció de l'autofàgia. Per altra banda el ShRNA de Cav3.1 i ShRNA Cav3.2 no permetrien aquesta translocació de nucli a citoplasma.

1.9 La combinació de NNC-55-0396 i cloroquina disminueix la viabilitat cel·lular a concentracions baixes de NNC-55-0396

La major part dels quimioterapèutics i la radiació s'han mostrat capaces d'induir autofàgia. Les conseqüències de la promoció d'autofàgia en cèl·lules tumorals depèn de factors múltiples com la duració de la inducció i el context cel·lular. L'excessiva o sostinguda autofàgia té el potencial d'induir mort cel·lular així com la resistència als tractaments. Per altra banda, s'ha demostrat que la inhibició de l'autofàgia augmenta la quimiosensibilitat i la regressió tumoral. La cloroquina és capaç de millorar l'eficàcia de molts quimioterapèutics induint mort cel·lular (Yang et al., 2012). Prenent juntes aquestes dades i tenint en compte que el bloquejant de TT-CC, NNC-55-0396, és un potencial inductor d'autofàgia en cèl·lules de glioma, varem hipotetitzar que concentracions baixes de NNC-55-0396 podrien fer sinèrgia junt amb el bloquejant d'autofàgia Cloroquina (CQ) en quant a la viabilitat cel·lular. Ens varem fixar en la concentració de 5 μ M de NNC-55-0396, en la qual el tractament senzill no afecta la viabilitat cel·lular (**Fig 26B**). Els assaigs de viabilitat cel·lular amb el reactiu WST-1 (**Fig 40**) corroboren que mentre que els tractaments simples amb NNC-55-0396 a aquesta dosi o amb CQ 12,5 μ M sola no afecten la viabilitat a les línies cel·lulars de GBM A172, U87-MG i U251-MG, quan s'aplica el tractament combinat (NNC-55-0396 5 μ M + CQ 12,5 μ M), que és la dosi capaç de bloquejar el flux autofàgic però no de toxicitat cel·lular, la pèrdua de viabilitat és significativa respecte el control en les línies A172 i U87-MG, amb disminucions en la viabilitat del 50% i 40% respectivament. Aquests resultats demostren un efecte sinèrgic de NNC-55-0396 i CQ.

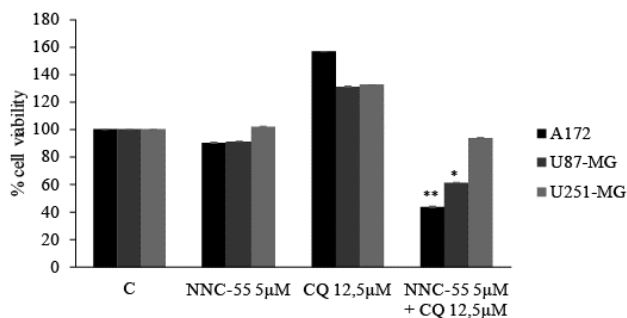


Figura 40. El bloqueig del TT-CC juntament amb el bloqueig de l'autofàgia disminueix la viabilitat cel·lular. La viabilitat cel·lular en les línies A172, U87-MG i U251-MG tractades amb NNC-55-0396 a 5 µM o amb CQ 12.5 µM en tractaments simples o combinats. La viabilitat cel·lular va ser analitzada amb el reactiu WST-1 a les 48 hores després de l'addició de les drogues. Les barres indiquen la mitjana ± sem. (** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$).

1.10 La hipòxia induïx l'autofàgia i afavoreix la translocació nuclear de TFEB

Una de les principals característiques del GBM és la presència de zones hipòxiques (Jawhari et al., 2016). D'altra banda, el factor de transcripció induït per hipòxia (HIF1 α) activa l'autofàgia (Mimouna et al. 2014). Diversos estudis han abordat la hipòxia des d'una perspectiva autofàgica, amb l'objectiu de bloquejar l'autofàgia induïda en aquestes condicions i així incrementar la sensibilitat del tumor al quimioterapèutic TMZ (Rosenfeld et al. 2014). Un aspecte poc estudiat és la possible implicació del factor de transcripció TFEB en l'autofàgia induïda per hipòxia. Per tant, vàrem investigar si en un estat hipòxic l'estat de fosforilació de TFEB es veu modulats per tal d'induir l'expressió de gens autofàgics i lisosomals. Així, vàrem exposar cèl·lules A172 a condicions hipòxiques (2% O₂) i es va analitzar per *immunoblot* l'estat de fosforilació de TFEB. Com a control positiu de defosforilació/ activació de TFEB es van utilitzar lisats cel·lulars de la mateixa línia A172 cultivades en condicions de deprivació de sèrum durant 24 hores en normòxia (21% O₂). Com a control negatiu de fosforilació/ inactivació de TFEB es van utilitzar cèl·lules tractades amb Bapta-AM durant 24 hores en condicions de normòxia (21% O₂) (**Fig 41**). Es va observar que en condicions d'hipòxia una gran part de TFEB mostra mobilitats de baix pes, corresponent a la forma defosforilada/ activa, tal i com indica el control en deprivació de sèrum. Els nivells de HIF 1 α ens serveixen per comprovar que l'exposició a la hipòxia ha funcionat. En canvi, les cèl·lules en normòxia mostren un clar predomini de la mobilitat en bandes d'alt pes molecular, denotant la forma fosforilada/ inactiva de TFEB. Per tant, aquests resultats indiquen que l'activació de TFEB contribuiria a l'elevada taxa autofàgica que presenten les cèl·lules en baixa concentració d'oxigen.

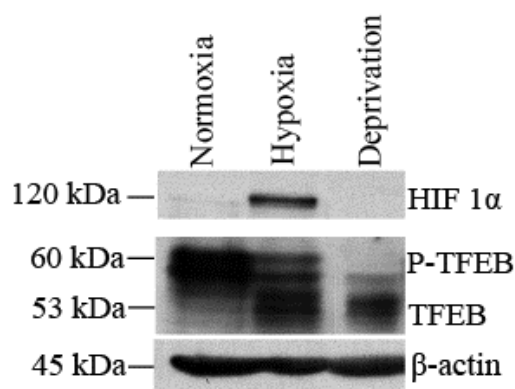


Figura 41. La hipòxia promou l'estat defosforilat de TFEB. (A) Lisats de la línia cel·lular de GBM A172 obtinguts sota condicions de normòxia (21% O₂) i d'hipòxia (2% O₂) durant 48 hores, privació de sèrum durant 24 hores en normòxia. Es van analitzar els nivells de HIF 1α i la mobilitat de TFEB. La banda superior correspon a la forma fosforilada/ inactiva de TFEB, mentre la banda de sota correspon a la forma no fosforilada/ activa, tal i com es mostra el control de privació. β-actina s'utilitza com a control de càrrega.

1.11 El bloqueig dels TT-CC en condicions d'hipòxia produeix la degradació de HIF 1α

Es van realitzar experiments de viabilitat cel·lular amb NNC-55-0396 en hipòxia per tal de valorar si l'efecte d'aquest bloquejant de TT-CC variava en funció de canvis en la concentració d'oxigen que es produeixen en l'ambient tumoral. L'efecte del bloqueig farmacològic dels TT-CC amb NNC-55-0396 sota condicions d'hipòxia és més fort que en normòxia ja que redueix la viabilitat cel·lular significativament en cèl·lules de GBM a concentracions de 5 μM i 1 μM (**Fig 42B**). Aquests resultats es van observar en les línies A172, U87-MG i RC2. Igual que en el tractament sinèrgic NNC-55-0396 i CQ, la línia U251-MG va ser la menys sensible. Cal recordar que en normòxia (**figura 26B**) no vèiem efecte sobre la viabilitat a aquestes concentracions en tractaments senzills. Aquests resultats indiquen que les cèl·lules de GBM exposades a ambient hipòxic són més sensibles al bloqueig dels TT-CC, d'acord amb una funció més rellevant dels TT-CC en termes de viabilitat i proliferació cel·lular en ambients de baixa concentració d'oxigen. Aquest resultat està d'acord amb la sobre regulació dels TT-CC en hipòxia (**Fig 25**).

Kim et al., (2015) i Zhang et al., (2017) van descriure que els bloquejants de TT-CC són capaços de suprimir l'expressió del factor de transcripció HIF 1α sota condicions d'hipòxia. Donades les evidències sobre la desregulació autofàgica que provoquen els bloquejants dels TT-CC (**Fig 36**) i la

disminució de la viabilitat cel·lular que presenta a dosis inferiors a les de normòxia (**Fig 42A**) es van analitzar els nivells de HIF 1 α i de p62 en cèl·lules tractades amb NNC-55-0396. S'observà que les cèl·lules en hipòxia i tractades amb NNC-55-0396 presenten uns nivells de HIF 1 α inferiors als de les cèl·lules en hipòxia sense el bloquejant de TT-CC, el que corrobora els resultats de Kim et al. (2015) indicant que NNC-55-0396 suprimeix l'expressió d' HIF 1 α . A la vegada, els nivells de p62 disminueixen en hipòxia comparats amb normòxia, suggerint un major flux autofàgic en la primera condició (**Fig 42B**). A més, en presència de NNC-55-0396, els nivells de p62 augmenten de forma consistent amb el bloqueig del flux autofàgic. A la vegada, les dades de viabilitat indiquen que les cèl·lules en un ambient hipòxic són més sensibles al bloqueig de l'autofàgia per NNC-55-0396, suggerint la possibilitat de que Cav3.2 és un important regulador de l'autofàgia en condicions hipòxiques (perquè és el canal que es sobreexpressa en aquestes condicions, **Fig 25**).

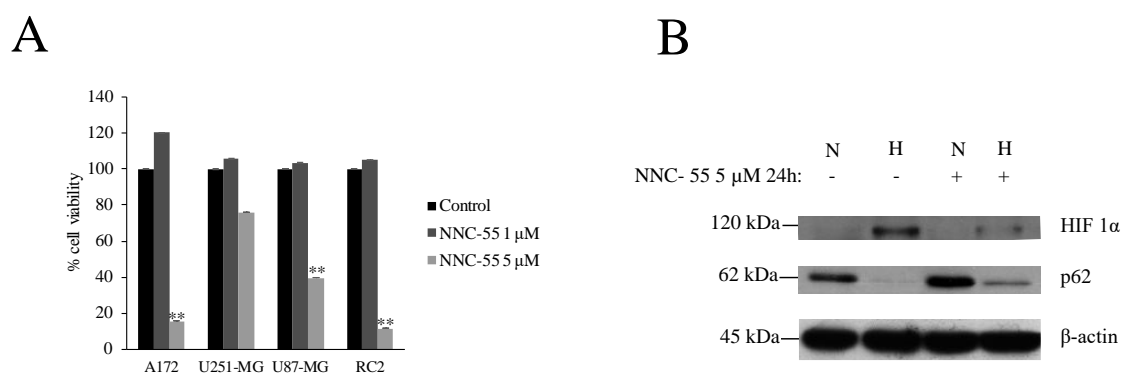


Figura 42. El tractament amb NNC-55-0396 inhibeix l'expressió d'HIF 1 α i provoca una disminució de la viabilitat de les cèl·lules de GBM en condicions d'hipòxia. (A) Assaigs de viabilitat en les línies cel·lulars A172, U251-MG, U87-MG i línia cel·lular resistent a TMZ RC2 sota condicions de hipòxia 48 hores i tractaments, NNC1 μ M i 5 μ M. La viabilitat cel·lular va ser analitzada amb el reactiu WST-1 a les 48 hores després del tractament amb les drogues. Les barres indiquen la mitjana \pm sem (***) $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$). (B) Immunoblot de la línia cel·lular de GBM A172 cultivada sota condicions de normòxia (21% O₂, N) i d'hipòxia (2% O₂, H), i tractades amb NNC-55-0396 a una concentració de 5 μ M durant 24 hores. S'analitzen els nivells de HIF 1 α i p62. B-actina s'utilitza com a control de càrrega.

1.12 Els cultius tridimensionals organitzats en càmeres microfluídiques revelen que les cèl·lules de GBM en les zones hipòxiques són més sensibles al bloqueig dels TT-CC

Per validar els resultats obtinguts amb NNC-55-0396 en un model de cultiu 3D que mimetitzava la organització del tumor *in vivo*, es va fer servir les cambres Be-gradient proporcionades per la empresa BeonChip[®]. En aquestes càmeres es poden recrear les tres zones que caracteritzen el GBM, zona hipòxica/ necròtica, zona hipòxica i zona normòxica (Urbanska et al.,2014) i per tant, valorar

Resultats

l'efecte del bloquejant de TT-CC en totes aquestes àrees alhora. El bloquejant de TT-CC (NNC-55-0396) es va aplicar a una concentració de 5 μM a les 48 hores després de la sembra de les cèl·lules U251-MG-GFP i durant 24 hores. A les 24 hores es va realitzar una tinció amb PI per valorar la mort cel·lular després del tractament. A la **figura 43** podem veure les imatges preses amb el microscopi de fluorescència a 2x augments, on en verd es poden observar les cèl·lules U251-MG-GFP positives/ vives i en vermell les U251-MG-GFP que han perdut la fluorescència verda i han incorporat la tinció vermella deguda al PI, que marca les cèl·lules mortes. A la **figura 43B** es mostra el gràfic on està representat el valor d'intensitat per al color verd (cèl·lules vives) i color vermell (cèl·lules mortes), a més de proporcionar informació sobre la localització de cadascuna de les poblacions cel·lulars (vives i mortes) dins de la cambra. Com es pot observar, a la part central de les càmeres tractades amb NNC-55-0396 (5 μM , 24 hores) hi ha una major àrea de cèl·lules mortes que en les càmeres control i aquestes estan distribuïdes en la zona hipòxica de la cambra. Aquest resultat concorda l'obtingut en els cultius 2D en hipòxia, condicions en què la sensibilitat de les cèl·lules de GBM al NNC-55-0396 era major (**Fig 42A**). Aquest fet apuntaria a que aquest tipus de fàrmac pogués ser més indicat per tumors com el GBM on es dona la presència de zones tumorals amb baix aport d'oxigen.

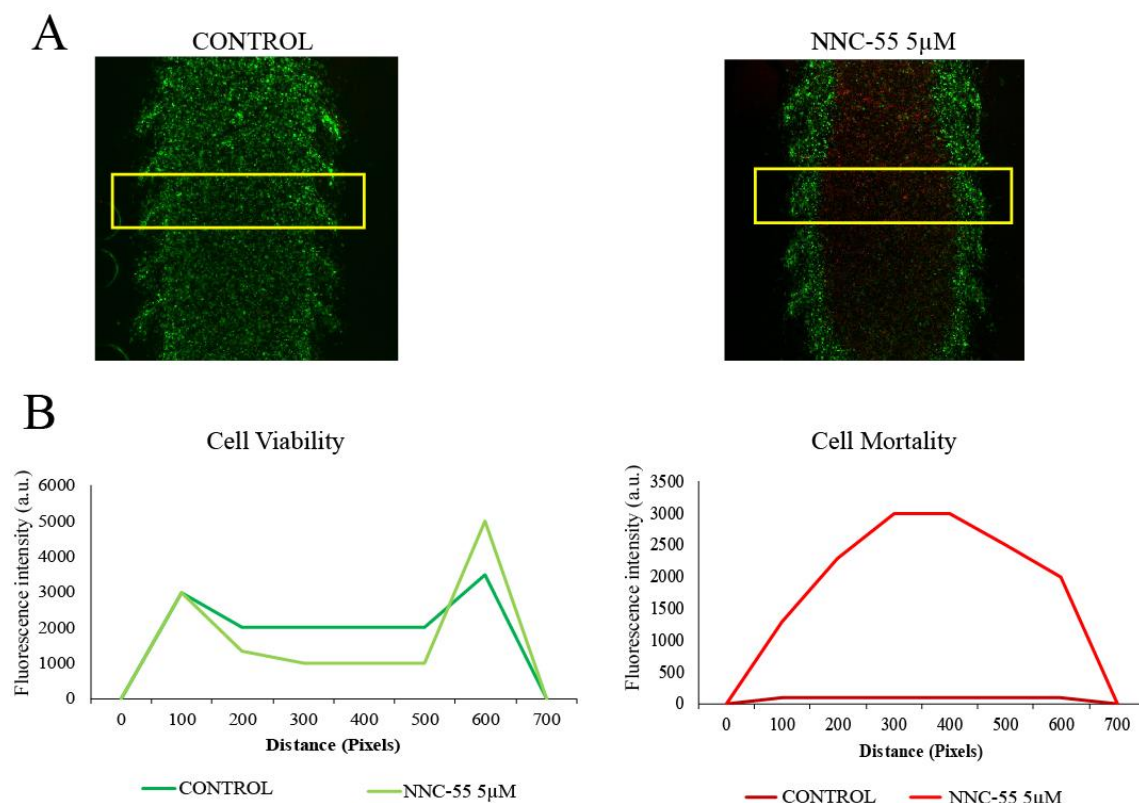


Figura 43. El bloqueig dels TT-CC en càmeres microfluídiques que recreen les condicions del tumor (normòxia i hipòxia) condueix a la mort cel·lular en la zona hipòxica induïda per NNC (5 μM , 24 hores). (A) Imatges obtingudes de les cèl·lules U251-MG-GFP sembrades a una densitat

Resultats

de 80×10^4 cèl·lules per mil·lilitre en les microcàmeres i tractades a les 48 hores post-sembra amb NNC-55-0396 a una concentració de $5 \mu\text{M}$ durant 24 hores. A les 24 hores, s'aplica el colorant PI pels canals laterals i als 15 min es fotografien les cambres amb el microscopi de fluorescència a 2x augments, utilitzant els filtres per Texas-Red i GFP. (B) Gràfiques representatives del valor d'intensitat de fluorescència dels dos canals, verd i vermell il·lustren la distribució de les dues poblacions cel·lulars.

DISCUSSIÓ

El calci té un paper important en la senyalització intracel·lular i controla diferents processos com son la proliferació, diferenciació, creixement, migració, autofàgia i mort cel·lular. Així, alteracions en la senyalització per calci poden causar defectes en el creixement cel·lular i invasió que caracteritzen el càncer. La rellevància dels canals de calci activats per voltatge i específicament els activats a baix voltatge (LVGCC), en la regulació del creixement i progressió tumoral és ben documentada (Santoni et al., 2012; Tong et al., 2015).

Des del seu descobriment els anys 70, els canals de calci de tipus T (LVGCC) han transcendit degut al seu paper com a reguladors homeostàtics de calci intracel·lular involucrats en processos fisiològics i patològics en cèl·lules i teixits (Dziegielewska and Gray 2014; Hagiwara, Ozawa, and Sand 1975). Les característiques biofísiques dels TT-CC els fan únics dins el conjunt de canals de calci regulats per voltatge (VGCC) ja que posseeixen la capacitat d'activació i d'inactivació ràpides i a potencials negatius, prop del potencial de repòs de membrana, i una cinètica de desactivació lenta (Nowycky et al., 1985). La conseqüència funcional d'aquestes característiques biofísiques és que hi ha finestres de potencials de membrana en les que es pot donar una activació perdurable d'una petita població de TT-CC, que condueixi a un influx continu de calci (Fornaro et al., 2017). Addicionalment, aquestes propietats permeten modificar l'entrada de calci des de l'exterior amb petits canvis de potencial, la qual cosa possibilita adaptacions ràpides i eficaces de la cèl·lula front canvis associats al cicle cel·lular o a estímuls externs (p.e. factors tròfics).

Per altra banda, la senyalització per calci ha estat descrita com un regulador de l'autofàgia, no obstant segueix essent controvertit el seu paper en aquest procés, amb evidències que suggereixen la seva implicació en la iniciació i en etapes finals de l'autofàgia (Berridge et al., 2000; Filippi-Chiela et al., 2016).

El GBM és el tumor més maligne i freqüent del SNC. El 90% dels GBM es desenvolupen *de novo*, també anomenats GBM primaris, en pacients d'avançada edat sense haver presentat amb anterioritat signes clínicopatològics d'una lesió pre-maligna. El 10% dels GBM restants apareixen com a progressió d'un astrocitoma difús o anaplàsic (GBM secundari). Els pacients que el pateixen son més joves i presenten un pronòstic més favorable (Wesseling et al., 2015) Discriminar entre un GBM primari i secundari és impossible a nivell histopatològic però l'anàlisi dels perfils genètics ens permet distingir-los; el GBM primari no presenta mutacions en el gen IDH1 ni TP53 i tenen un elevat contingut relatiu de cèl·lules positives per el marcador CD133, en canvi el GBM secundari presenta mutacions en el gen IDH1 i TP53 i el contingut de cèl·lules positives per CD133 és molt més baix (Louis et al., 2016; Ohgaki and Kleihues 2013).

Expressió de TT-CC en GBM

Els canals de calci i els TT-CC es troben expressats de manera diferencial en cèl·lules malignes, en les que s'ha descrit tant la sobreexpressió com la disminució de la seva expressió respecte les cèl·lules no tumorals. Les alteracions en la seva expressió i/o activitat apunten al seu possible ús com a dianes per a noves teràpies (Stewart et al., 2015; Sallán et al., 2017).

Per començar l'estudi sobre els TT-CC en GBM vam comprovar que els TT-CC es troben expressats en cultius primaris d'astrocitomes de baix grau, GBMs, recurrències, línies cel·lulars de GBM i línies cel·lulars de GBM quimioresistents a TMZ; per tant, podem afirmar que els TT-CC Cav3.1 i Cav3.2 es troben expressats des de l'astrocitoma de baix grau fins a la recurrència del GBM. La base de dades GlioVis (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>) mostra que el teixit no tumoral presenta una major expressió de Cav3.1 i Cav3.2 respecte dels GBMs (amb un total de 528 mostres de GBM) (**Fig 19**). D'altra banda els pacients amb alteracions als gens que codifiquen per a les dues isoformes de TT-CC expressades en GBM mostren diferències de supervivència, un fet suggerent del valor pronòstic de l'expressió de TT-CC en pacients amb aquest tipus de tumor. L'eina bioinformàtica cBioportal permet extreure les corbes de supervivència Kaplan-Meier en les que s'evidencia una tendència que indica que alteracions gèniques en els gens CACNA1G i CACNA1H, la majoria d'elles sobreexpressions, conferirien un pitjor pronòstic (**Fig 20**). Aquest punt, que en principi sembla dissonant amb la caiguada de l'expressió en el teixit tumoral, pot ser en part explicable pel fet que la major part dels gens supressors tumorals exhibeixen expressions baixes o reduïdes en comparació als teixits normals / sans. Podria ser que en GBM els TT-CC actuïn com a tals, especialment tenint en compte que recentment s'ha identificat CACNA1G (Cav 3.1) com un supressor tumoral en càncer de pulmó, essent alhora un important regulador de la diferenciació i proliferació cel·lular (Castro et al. 2011). Un estudi recent ha descrit que els gens CACNA1G i CACNA1H es troben entre el 1 i el cinc per cent dels gens amb baixa expressió en càncer d'ovari, renal, cervell i bufeta (Phan et al., 2017). Seguint aquest raonament esperaríem que les sobreexpressions en els gens que codifiquen per als TT-CC conferissin un millor pronòstic als pacients ja que estarien actuant com a putatius supressors tumorals. Una possible explicació seria que els TT-CC no estan associats directament amb el desenvolupament del GBM, però una vegada desenvolupat, l'expressió de TT-CC sí que sembla un factor a tenir en compte alhora de parlar de l'agressivitat del tumor. En consonància, en aquest treball de tesi hem descrit un increment en l'expressió de TT-CC en mostres de recurrències respecte del seu GBM primari i en línies cel·lulars resistents al quimioterapèutic TMZ creades *in vitro* al nostre laboratori (**Fig 21B i D**).

L'altre punt important a considerar, de tipus metodològic, és que les bases de dades consultades compten amb un gran nombre de casos de GBM (528 mostres) però malhauradament no ocorre el

mateix amb els casos no tumorals o de teixit sa (10 mostres) amb els que s'han comparat els GBMs. Això dificulta la comparativa d'expressió de TT-CC entre teixit tumoral i teixit sa. A més de l'anàlisi dels nivells d'expressió, s'hauria de tenir en compte la funcionalitat del canal, essent aquesta funcionalitat en última instància fonamental i que depèn de factors com el potencial de membrana, l'estat de fosforilació, l'expressió de certes variants de *splicing*, i d'altres. A aquest raonament cal afegir la possibilitat d'una major sensibilitat de les cèl·lules tumorals als processos en els quals els TT-CC es troben involucrats (*i.e.*, l'autofàgia), fet que explicaria que poguessin constituir dianes terapèutiques malgrat no es trobessin sobreexpressats.

En la comparació de casos aparellats de GBM, es va observar una tendència a l'increment de l'expressió dels TT-CC en els GBM recurrents. Les línies quimioresistents creades *in vitro* també presenten un patró d'expressió de TT-CC caracteritzat per la sobreexpressió dels TT-CC (**Fig 21**). Aquesta sobreexpressió pot ser deguda al propi procés intrínsec d'adquisició de resistència, així com el manteniment d'un fenotip pluripotent i d'autorenovació conegut com *fenotip stem* (Dziegielewska & Gray, 2014; Zhang et al., 2017), on per tant els TT-CC tindrien un paper important en el desenvolupament de les recurrències i manteniment del fenotip stem/resistent. En aquest sentit, l'expressió de Cav3.2 s'ha associat amb cèl·lules mare embrionàries i GICs (Zhang et al., 2017). Tanmateix, malgrat les recurrències i els models de resistència presenten uns nivells de mRNA dels TT-CC significativament superiors, no s'han detectat diferències en quant a la seva sensibilitat als bloquejants de TT-CC comparat amb GBM primari (**Fig 26B**).

Implicació dels TT-CC en l'autofàgia: ús del silenciament gènic de TT-CC

Treballs previs del grup en melanoma indicaven que dins la família dels TT-CC, Cav3.1 estaria íntimament relacionat amb el procés autofàgic, mentre que Cav3.2 estaria relacionat amb la proliferació i seria sobre-expressat en un ambient hipòxic (Das et al., 2012; Maiques et al., 2017; Das et al., 2013). La línia cel·lular de GBM quimioresistent a TMZ, RC2, exhibeix una expressió significativament superior de TT-CC (especialment Cav3.1), així com un flux autofàgic basal superior si ho comparem amb la línia de la que procedeix (A172), a més d'un increment de p62/SQSTM1 a nivell transcripcional (**Fig 23 i 24**). S'ha descrit que l'autofàgia en GBM té un paper protector front el quimioterapèutic TMZ (Koukourakis et al., 2016). Les nostres dades suggereixen que la sobreexpressió de Cav3.1 podria estar ajudant a mantenir els nivells autofàgics incrementats de la RC2 i per tant emparant la resistència al tractament. Així les nostres dades ens portarien a relacionar directament l'expressió de Cav3.1 amb el procés autofàgic i, concretament, amb la proteïna p62 (veure més avall).

Estudis *in vitro* i *in vivo* en GBM demostren que els TT-CC són importants en la regulació de la

Discussió

proliferació tumoral i la migració (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2012) en aquest tipus de tumor. Prèviament, el nostre grup va demostrar que tant el silenciament gènic com el bloqueig farmacològic dels TT-CC (amb Mibefradil i Pimozida) afectava la viabilitat i reduïa la capacitat proliferativa de cèl·lules de melanoma tot desregulant l'autofàgia cel·lular, per portar finalment a la parada de cicle cel·lular i la mort per apoptosi (Das et al., 2013). En línies generals aquests resultats es reproduïen al GBM, tal i com s'ha descrit aquí. Tanmateix queden molts aspectes per demostrar, per exemple quina és la funció o funcions que tenen els TT-CC en GBM i quines són les vies de senyalització que s'afecten en el seu bloqueig farmacològic o el silenciament gènic, i que condueixen a la mort cel·lular.

Prèviament s'havia descrit que el silenciament gènic per siRNA de cadascuna de les isoformes de TT-CC condueix a la mort per apoptosi en cèl·lules de GBM (Valerie et al., 2013). Al nostre grup observarem que els silenciaments gènics de cadascuna de les isoformes de TT-CC provoquen la sobreexpressió de la isoforma no silenciada, en el que hipotetitzem seria una resposta cel·lular compensatòria front la manca de l'altre isoforma (**Fig 27 i Fig 29A**). No obstant, aquesta regulació creuada no és capaç de compensar la pèrdua de l'altra isoforma i les cèl·lules moren inevitablement per apoptosi (**Fig 28 i Fig 29B**). Disposem, de dos shRNAs diferents per al silenciament de cada isoforma de TT-CC. Les dues construccions d'ShRNA per cadascun dels gens CACNA1G i CACNA1H porten a la mort per apoptosi en tots els casos. La segona construcció d'shRNAs han estat menys treballats però validen els resultats en quant al silenciament i mort cel·lular obtinguts amb la construcció primera d'shRNA per als dos gens que codifiquen els TT-CC (**Fig 30**).

Una de les principals incògnites sobre els TT-CC és com exerceixen la seva acció, és a dir, quins són els mecanismes que regulen i que, en la seva absència o inhibició, es veuen modificats, perdent les cèl·lules el control sobre aquestes funcions i esdevenint-se la mort cel·lular. Valerie et al., (2013) va descriure que la inhibició gènica i/o farmacològica dels TT-CC condueix a una inhibició de la via mTOR/Akt relacionada amb la supervivència cel·lular, que indueix apoptosi i sensibilitza les cèl·lules de GBM a radioteràpia *in vitro*. Per altra banda, Das et al., (2013) descriu que en melanoma el bloqueig farmacològic i/o silenciament gènic dels TT-CC condueix a un bloqueig de l'autofàgia, que acabaria induïnt una mort apoptòtica.

Amb aquests antecedents, s'analitzà si l'autofàgia es desregulava quan es realitzava la depleció gènica dels TT-CC, previ a la mort cel·lular per apoptosi. S'observà que el silenciament de Cav3.1 condueix a un increment en els nivells de LC3II i de proteïnes ubiquitinitzades respecte del control (**Fig 31**). No obstant, el que més crida l'atenció del silenciament de Cav3.1 és la disminució de p62 que podria ser conseqüència d'una inducció de l'autofàgia, però quan apliquem el tractament amb

el bloquejant d'autofàgia Bafilomicina-A no s'observa una acumulació d'aquesta proteïna fins als nivells control. Aquest fet ens va portar a l'estudi del missatger i vàrem trobar una sorprenent repressió transcripcional de p62 quan Cav3.1 està silenciada (**Fig 32**), indicant que Cav3.1 és capaç de modular directa o indirectament la transcripció de p62. Aquest fet involucra Cav3.1 en la regulació del procés autofàgic. Per tant, en conjunt les dades apunten a que el silenciament de Cav3.1 condueix a la repressió transcripcional de p62, que impossibilita el reclutament del *cargo*, resultant en l'acumulació citoplasmàtica de proteïnes poliubiquitinitzades; una resposta cel·lular a aquesta situació seria la desregulació de l'autofàgia, en aquest cas defectiva. Duran et al., (2011) va descriure en MEFs que el silenciament de la proteïna p62 ve acompanyat d'elevats nivells de LC3II compatibles amb l'increment de la funció autofàgica tal com succeeix en el nostre cas quan p62 es reprimida després del silenciament gènic de Cav3.1.

Per altra banda s'analitzà l'efecte del silenciament de Cav3.2 sobre l'autofàgia amb la intenció d'estudiar si ambdós canals compleixen una funció comú o bé desenvolupen funcions diferents. El marcador autofagosomal LC3II no va denotar diferències significatives respecte el control (**Fig 33**). Tanmateix, Cav3.2 és indispensable per a la supervivència de cèl·lules de GBM, conduint el seu silenciament a la mort per apoptosi (**Fig 29B**). Quan analitzem els nivells de la proteïna p62 per WB observem un augment significatiu d'aquesta proteïna en les cèl·lules silenciades per Cav3.2 (**Fig 33**). L'anàlisi per RT-qPCR revela igualment que el silenciament de Cav3.2 sobreexpressa p62 (**Fig 34**). Aquest fet podria explicar-se per la sobreexpressió de Cav3.1 que desencadena el silenciament de Cav3.2. En presència de la proteïna p62 i, podent-se reclutar el *cargo* dins l'autofagosoma de manera adequada, no hi haurien canvis en el flux autofàgic respecte l'estat basal.

Per aprofundir en els mecanismes en que els TT-CC es troben implicats en la regulació de les vies de senyalització que controlen el procés autofàgic, vàrem analitzar els principals reguladors *upstream* de l'autofàgia (**Fig 35**) després del silenciament de les isoformes Cav3.1 i Cav3.2. Les dades obtingudes indiquen que el silenciament de Cav3.1 implica una disminució en la fosforilació de AMPK, en paral·lel a l'augment de l'activitat de mTOR (visualitzada a través de la fosforilació de p70S6K, diana de mTOR). Aquestes dades novament apunten a una funció pro-autofàgica del canal Cav3.1, l'activitat del qual inhibiria mTOR.

En els darrers anys TFEB s'ha postulat com un màster regulador de l'autofàgia i de la biogènesi lisosomal, promovent la transcripció de p62 i Lamp1, entre altres membres de la xarxa CLEAR (*Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*) (Klionsky et al., 2016; Laplante and Sabatini 2013; Medina et al., 2015; Settembre et al., 2012). Sota condicions de privació de nutrients i inducció de l'autofàgia, mTORC1 es troba inhibida i es desplaça del lisosoma, sent incapaç de fosforilar TFEB. Aleshores, TFEB defosforilat pot translocar al nucli i actuar com a factor de

Discussió

transcripció. TFEB podria ser clau en la regulació de l'expressió de p62 deguda al silenciament de Cav3.1 i de Cav3.2. (**Fig 39A**). TFEB es manté inactivat/fosforilat i clarament perinuclear després del silenciament de Cav3.1. Així es demostra una mobilitat de TFEB en bandes d'alt pes molecular, com l'obtinguda en cèl·lules control i tractades amb Bapta-AM o Ciclosporina-A, que impliquen la inhibició de la fosfatasa calcineurina (que quan activa porta a la defosforilació/activació de TFEB). Així doncs, l'expressió de Cav3.1 mantindria TFEB defosforilat/actiu, el que podria incidir en la regulació transcripcional de p62, regulant positivament l'autofàgia. En canvi, en el silenciament de Cav3.2 apareix una tendència a l'aparició de bandes baix pes molecular de TFEB, tot i que no s'assoleix la banda que es detecta en condicions de deprivació de sèrum (TFEB defosforilat/actiu nuclear) ni s'observa la seva traslocació nuclear.

Així doncs, suggerim el següent escenari per tal d'integrar l'efecte del silenciament de Cav3.1 i l'autofàgia. Seria esperable que conseqüència del silenciament el calci intracel·lular disminueixi (tot i l'efecte rebot en l'expressió de Cav3.2), disminuint conseqüentment l'activació de la via Ca^{2+} -CAMKK2-AMPK i provocant l'activació de mTOR que hem vist. D'altra banda, s'observa una autofàgia romanent, que seria alhora defectiva per a la recepció del *cargo* a degradar al estar molt disminuïts els nivells de la proteïna p62.

En el cas del silenciament de Cav3.2 no s'observen diferències respecte del control quan analitzem els reguladors *upstream* de l'autofàgia, mTOR i AMPK (**Fig 35**), resultat esperable ja que no s'han detectat canvis en el flux autofàgic. En canvi, es detecta un increment significatiu en els nivells de mRNA i proteïcs de p62, un efecte contrari al del silenciament de Cav3.1 i que podria per tant ser degut al de la sobreexpressió rebot de Cav3.1.

Per tant i per concloure aquesta part, el silenciament de Cav3.1 porta a la inactivació de TFEB, la repressió de p62, el bloqueig autofàgic/autofàgia defectiva i a la inhibició de la autofàgia des del complex mTOR, remarcant una funció pro-autofàgica d'aquest canal en múltiples punts.

Implicació dels TT-CC en l'autofàgia: estudi de la inhibició farmacològica dels TT-CC

Nombrosos estudis han relacionat l'ús de bloquejants farmacològics TT-CC amb la inhibició de la proliferació, la mort cel·lular, i fins i tot la inhibició de la migració en diferents models tumorals incloent el GBM (Das et al., 2013; Panner et al., 2006; Valerie et al., 2013; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2017, Niklasson et al., 2017). L'estudi de Das et al., (2013) va relacionar el bloqueig farmacològic dels TT-CC amb un increment de l'estrès de reticle i un bloqueig de l'autofàgia en línies de melanoma. D'altra banda, nombroses investigacions relacionen l'autofàgia en GBM com

a possible factor clau en la resistència als tractaments ajudant a la supervivència de les cèl·lules tumorals (Jawhari et al., 2016). No obstant, resten per elucidar les funcions de cada isoforma de TT-CC i quines són les vies de senyalització que s'activen o inactiven front el seu bloqueig o silenciament gènic. Aquestes dues circumstàncies ens motivaren a analitzar les conseqüències del bloqueig farmacològic dels TT-CC en GBM i aprofundir en els mecanismes pels quals la mort cel·lular induïda per aquests compostos estaria relacionada amb la desregulació autofàgica. De forma semblant als treballs mencionats més amunt, en aquesta tesi hem utilitzat els fàrmacs Mibefradil i NNC-55-0396 per al bloqueig farmacològic dels TT-CC i l'estudi de les seves funcions cel·lulars.

Els resultats obtinguts amb els bloquejants de TT-CC revelen una clara desregulació del procés autofàgic quan es tracten les cèl·lules amb Mibefradil o NNC-55-0396. Els nivells de LC3II són superiors als nivells de les cèl·lules sense tractament (**Fig 36**). El tractament amb el bloquejant d'autofàgia Bafilomicina-A i el tractament combinat Mibefradil o NNC-55-0396 més Bafilomicina-A es va realitzar per tal d'esbrinar si el bloqueig dels TT-CC condueix a una inducció o bloqueig de l'autofàgia. Aquests resultats indiquen que estem front un bloqueig de l'autofàgia per NNC-55-0396 (**Fig 36**), resultats que anirien en concordança amb els obtinguts en amb Mibefradil (Das et al., 2013). Aquest resultat reforça la implicació dels TT-CC en el manteniment del flux autofàgic.

No obstant, a l'analitzar les vies de senyalització *upstream* de l'autofàgia (P-AKT i P-p70S6K) (**Fig 37**), veiem que P-AKT està fortament disminuïda, efecte que descriu Valerie et al., (2013), i la diana de mTOR P-p70S6K també, indicant que mTOR es troba inhibit, el que conduiria a una inducció de l'autofàgia (Klionsky et al., 2005). Cal destacar que el resultat de l'activitat de mTOR després del bloqueig farmacològic, per tant, és notòriament diferent a l'obtingut amb el silenciament gènic de Cav3.1.

Tenint en compte el paper central del calci en la regulació de molts processos cel·lulars, incloent la macroautofàgia, en aquest estudi vàrem investigar l'efecte de NNC-55-0396 sobre el calci intracel·lular. Els nostres resultats demostren que la concentració intracel·lular d'aquest ió incrementa sorprenentment degut al bloqueig amb NNC-55-0396 (**Fig 38**). Aquest efecte només es pot explicar a través d'accions "off-target" del fàrmac, perquè en ser els TT-CC responsables d'una difusió facilitada de l'ió, el seu bloqueig/inhibició necessàriament comportaria la reducció del calci citosòlic, independentment de la seva localització a la membrana plasmàtica o a la membrana dels orgànuls cel·lulars.

Les nostres dades suggereixen doncs que el compost NNC-55-0396 produeix l'increment dels nivells de calci intracel·lular que activarien la via CAMKK2/AMPK, conduïnt a la inhibició de

Discussió

mTOR i a la inducció de l'autofàgia (Filippi-Chiela et al., 2016), per mecanismes independents als del seu bloqueig dels TT-CC, com podria ser per exemple un bloqueig dels transportadors actius presents a la membrana plasmàtica o d'òrgànuls cel·lulars com el reticle endoplasmàtic, mitocondris o lisosomes (Williams et al., 2013), malgrat que aquestes possibilitats no han estat analitzades en aquest treball.

D'altra banda, NNC-55-0396 també promouria la transcripció de gens autofàgics i lisosomals a través de la defosforilació i translocació nuclear de TFEB (**Fig 39**), possiblement mitjançant els nivells incrementats de calci intracel·lular que mantenen activa calcineurina. Tanmateix, l'acció bloquejant del compost sobre les 3 isoformes de TT-CC a les concentracions utilitzades en aquest treball és ben documentada i, per tant, estariem davant d'un efecte complex de desregulació de l'homeostasi del calci que implicaria tant els TT-CC com d'altres dianes moleculars no identificades.

Relació entre els TT-CC i la hipòxia

El GBM és un tipus de tumor sòlid que es caracteritza per un elevat grau d'hipòxia (Huang et al., 2016). Aquestes àrees hipòxiques esdevenen a partir de la proliferació descontrolada de cèl·lules canceroses, que resulten en aquestes àrees anomenades de pseudopaliçada. Les cèl·lules canceroses reaccionen a la disminució de la pressió parcial d'oxigen amb l'estimulació de la vascularització secretant VEGF (Box et al., 2010). L'adaptació de les cèl·lules a aquest ambient està controlada per factors de transcripció que s'activen a pressions parcials d'oxigen baixes; el més important és HIF 1 α , que regula en condicions d'hipòxia (juntament amb HIF 1 β i múltiples coactivadors) la transcripció més de 100 gens que permeten fer front a la hipòxia, promoure angiogènesi, supervivència cel·lular i augmenten el metabolisme de la glucosa i faciliten la invasió tumoral (Jawhari et al., 2016). Sukumaran et al., (2015) demostren que en situacions d'hipòxia es produeix un increment dels nivells de calci citoplasmàtic, descrivint-se una inducció autofàgica en línies cel·lulars epitelials i neuronals a través d'altres tipus de canals de calci, (família de canals TRPC); no obstant no es descarta la possibilitat de que altres tipus de canals estiguin sobrerregulats i ajudin al manteniment d'aquest estat d'inducció autofàgica.

Les línies de GBM exposades a hipòxia sobreexpressen el Cav3.2. La sobrerregulació de Cav3.2 podria participar en la millora del potencial invasiu de les cèl·lules de GBM sota les condicions esmentades afavorint també la inducció de l'autofàgia (Sukumaran et al., 2015; Zhang et al., 2017). Alhora, és destacable el fet de que aquesta sobrerregulació ve acompanyada en tots els casos d'una disminució dels nivells de mRNA de Cav3.1 (**Fig 25**).

S'ha demostrat que en els contextos hipòxics les cèl·lules tumorals tenen una menor expressió de proteïnes pro-apoptòtiques i promouen la inducció d'autofàgia a través de l'activació de HIF1 α , un fet que ajuda a que la cèl·lula tumoral pugui sobreviure en aquestes condicions adverses (Wouters and Koritzinsky 2008). Nosaltres hem pogut observar que TFEB es troba també defosforilat (actiu) (**Fig 41**) en hipòxia comparat amb normòxia, apuntant a la possibilitat de que la inducció d'autofàgia es trobi sustentada en condicions hipòxiques també a través d'aquesta via.

Basant-nos en la relació dels TT-CC amb l'autofàgia i la mort cel·lular, vàrem bloquejar farmacològicament els TT-CC amb NNC-55-0396 tant en condicions normòxiques (21% O₂) com en condicions hipòxiques (2% O₂). Els resultats van revelar que la viabilitat cel·lular es trobava afectada a dosis més baixes de NNC-55-0396 en hipòxia que en condicions de normòxia (**Fig 42**).

Aquesta dada obre una finestra a l'estudi del tractament del GBM amb bloquejants de TT-CC, on les cèl·lules exposades a situacions hipòxiques, que serien les que corresponen a la massa tumoral propera a la zona necròtica, més autofàgiques i potser associades a un fenotip *stem*, també serien més sensibles al tractament amb els bloquejants de TT-CC. Conseqüentment, a la **figura 43** hem demostrat que, en un sistema tridimensional de microcàmera (model on es reproduïxen les zones normòxiques i hipòxiques tal com succeiria a el GBM *in vivo*), les cèl·lules de GBM U251-MG situades al centre de la càmera (que es troben en una situació hipòxica/necròtica, Ayuso et al., 2016) són especialment sensibles al bloqueig dels TT-CC.

Hem comprovat que l'efecte del NNC-55-0396 sobre els marcadors autofàgics en les cèl·lules crescudes en hipòxia continua sent de bloqueig (**Fig 42B**). Podem hipotetitzar que Cav3.1 treballaria com a canal de calci regulant l'autofàgia en condicions de normòxia i el Cav3.2 seria també un putatiu regulador del procés autofàgic però en condicions d'hipòxia. En qualsevol cas, els TT-CC tenen un paper destacat en el procés autofàgic, i és possible induir la mort cel·lular desregulant aquest procés, tal i com indiquen el seu silenciament gènic i el bloqueig farmacològic. Per això i per la seva contribució en la progressió del cicle cel·lular en la transició G1-S, els TT-CC es poden considerar com una diana terapèutica potencial en el GBM, si bé és cert que queden molts aspectes a resoldre per conèixer sobre la seva funció en cèl·lules tumorals.

CONCLUSIONS

PRIMERA. Els TT-CC (Cav3.1 i Cav3.2) es troben expressats en astrocitomes, GBM primaris i recurrents, línies cel·lulars de GBM i en el model de línia cel·lular resistent a TMZ, amb predomini de Cav3.1.

SEGONA. Els TT-CC es troben sobreexpressats en GBM recurrents i en el model cel·lular de quimioresistència *versus* GBM primaris.

TERCERA. Els tractaments aguts amb TMZ condueixen a l'elevació dels nivells de p-AMPK, p-eiF2 α i proteïnes d'autofàgia.

QUARTA. Les línies resistents a TMZ presenten major expressió de TT-CC que la seva línia parental, així com una presència superior de transcrits codificants per la proteïna p62, i un flux autofàgic incrementat.

CINQUENA. El bloqueig farmacològic dels TT-CC amb Mibefradil i NNC-55-0396 condueix a la parada del cicle cel·lular en fase G₁/S, bloqueig de l'autofàgia i la mort cel·lular apoptòtica. Així mateix s'ha trobat sinèrgia entre drogues bloquejants de TT-CC i bloquejants de l'autofàgia afectant a la viabilitat cel·lular.

SISENA. El bloqueig farmacològic dels TT-CC amb NNC-55-0396 condueix a l'elevació dels nivells de calci citoplasmàtic i afavoreix l'estat defosforilat (actiu) de TFEB, un factor de transcripció que regula l'expressió de gens autofàgics i lisosomals.

SETENA. El bloqueig farmacològic dels TT-CC amb NNC-55-0396 inhibeix el complex mTOR que afavoriria l'activació de l'autofàgia conseqüència d'un efecte complex de desregulació de l'homeostasi del calci, implicant a aquest procés tant els TT-CC com altres dianes moleculars no identificades.

OCTAVA. El silenciament gènic de Cav3.1 i Cav3.2 condueix a la sobrerregulació de la isoforma no silenciada i resulta en la mort cel·lular per apoptosi.

NOVENA. El silenciament gènic de Cav3.1 condueix a la disminució dels nivells de fosforilació de p-AMPK, activació de mTOR, inhibició de l'autofàgia i repressió transcripcional de p62, que condueix a un bloqueig de l'autofàgia o autofàgia defectiva. Aquests fets impliquen Cav3.1 directament amb una funció pro-autofàgica.

DESENA. El silenciament gènic de Cav3.2 no afecta el flux autofàgic però incrementa els nivells d'expressió de p62, efecte possiblement degut al rebot de Cav3.1 en aquesta situació.

ONZENA. La hipòxia moderada (2% O₂) incrementa l'expressió de Cav3.2 i reprimeix la de Cav3.1.

DOTZENA. En condicions d'hipòxia moderada les cèl·lules de GBM són més sensibles al bloqueig farmacològic dels TT-CC.

TRETZEAVA. Els cultius tridimensionals organitzats en càmeres microfluídiques revelen que les cèl·lules de GBM en les zones hipòxiques són més sensibles al bloqueig dels TT-CC.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Alvear Diego, Yiming Zhou, Alexandre Blais, Mary Tsikitis, Nathan H. Lents, Carolina Arias, Christen J. Lennon, Yuval Kluger, and Brian David Dynlacht. 2007. “XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks.” *Molecular Cell* 27 (1): 53–66.
- Aita V M, X H Liang, V V Murty, D L Pincus, W Yu, E Cayanis, S Kalachikov, T C Gilliam, and B Levine. 1999. “Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21.” *Genomics* 59 (1): 59–65.
- Alcantara Llaguno Sheila R, and Luis F Parada. 2016. “Cell of Origin of Glioma: Biological and Clinical Implications.” *British Journal of Cancer* 115 (12): 1445–50.
- Anding Allyson L, and Eric H Baehrecke. 2017. “Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles.” *Developmental Cell* 41 (1): 10–22.
- Arnoult, C, M Villaz, and H M Florman. 1998. “Pharmacological Properties of the T-Type Ca²⁺ Current of Mouse Spermatogenic Cells.” *Molecular Pharmacology* 53 (6): 1104–11.
- Auffinger Brenda, Drew Spencer, Peter Pytel, Atique U Ahmed, and Maciej S Lesniak. 2015. “The Role of Glioma Stem Cells in Chemotherapy Resistance and Glioblastoma Multiforme Recurrence.” *Expert Review of Neurotherapeutics* 15 (7): 741–52.
- Axe Elizabeth L, Simon A Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, and Nicholas T Ktistakis. 2008. “Autophagosome Formation from Membrane Compartments Enriched in Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Dynamically Connected to the Endoplasmic Reticulum.” *The Journal of Cell Biology* 182 (4): 685–701.
- Ayuso Jose M., Rosa Monge, Alicia Martínez-González, María Virumbrales-Muñoz, Guillermo A. Llamazares, Javier Berganzo, Aurelio Hernández-Lain, et al. 2017. “Glioblastoma on a Microfluidic Chip: Generating Pseudopalisades and Enhancing Aggressiveness through Blood Vessel Obstruction Events.” *Neuro-Oncology* 19 (4): 503–13.
- Ayuso Jose M., María Virumbrales-Muñoz, Alodia Lacueva, Pilar M. Lanuza, Elisa Checa-Chavarria, Pablo Botella, Eduardo Fernández, et al. 2016. “Development and Characterization of a Microfluidic Model of the Tumour Microenvironment.” *Scientific Reports* 6 (1): 36086.
- Azad Meghan B., Yongqiang Chen, and Spencer B. Gibson. 2009. “Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment.” *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (4): 777–90.
- Bahar Entaz, Hyongsuk Kim, and Hyonok Yoon. 2016. “ER Stress-Mediated Signaling: Action Potential and Ca(2+) as Key Players.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (9): 1–22.
- Ballester Leomar Y, Jason T Huse, Guilin Tang, and Gregory N Fuller. 2017. “Molecular Classification of Adult Diffuse Gliomas: Conflicting IDH1/IDH2, ATRX and 1p/19q Results.” *Human Pathology* 2 (5): 571-92.

Bibliografia

- Berghe T Vanden, N Vanlangenakker, E Parthoens, W Deckers, M Devos, N Festjens, C J Guerin, et al. 2010. "Necroptosis, Necrosis and Secondary Necrosis Converge on Similar Cellular Disintegration Features." *Cell Death and Differentiation* 17 (6): 922–30.
- Berridge Michael J., Martin D. Bootman, and H. Llewelyn Roderick. 2003. "Calcium: Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 517–29.
- Berridge Michael J, Peter Lipp, and Martin D Bootman. 2000. "The Versatility and Universality of Calcium Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 11–21.
- Bimboim HC, and J Doly. 1979. "A Procedure for Extracting Plasmid DNA from Bacterial Cells." *7 (6):862-52.*
- Blais J. D., C. L. Addison, R. Edge, T. Falls, H. Zhao, K. Wary, C. Koumenis, et al. 2006. "Perk-Dependent Translational Regulation Promotes Tumor Cell Adaptation and Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress." *Molecular and Cellular Biology* 26 (24): 9517–32.
- Bottomley Martyn J, Margaret R Batten, Richard A Lumb, and Neil J Bulleid. 2001. "Quality Control in the Endoplasmic Reticulum." *Current Biology* 11 (14): 1114–18.
- Bowma, Robert L., Qianghu Wang, Angel Carro, Roel G.W. Verhaak, and Massimo Squatrito. 2017. "GlioVis Data Portal for Visualization and Analysis of Brain Tumor Expression Datasets." *Neuro-Oncology* 19 (1): 139–41.
- Box Carol, Susanne J. Rogers, Marta Mendiola, and Suzanne A. Eccles. 2010. "Tumour-Microenvironmental Interactions: Paths to Progression and Targets for Treatment." *Seminars in Cancer Biology* 20 (3): 128–38.
- Braakman Ineke, and Neil J. Bulleid. 2011. "Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum." *Annual Review of Biochemistry* 80 (1): 71–99.
- Brat Daniel J., Amilcar A. Castellano-Sanchez, Stephen B. Hunter, Marcia Pecot, Cynthia Cohen, Elizabeth H. Hammond, Sarojini N. Devi, Balveen Kaur, and Erwin G. Van Meir. 2004. "Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population." *Cancer Research* 64 (3): 920–27.
- Brugarolas James, Kui Lei, Rebecca L Hurley, Brendan D Manning, Jan H Reiling, Ernst Hafen, Lee A Witters, Leif W Ellisen, William G Kaelin, and William G Kaelin Jr. 2004. "Regulation of mTOR Function in Response to Hypoxia by REDD1 and the TSC1 / TSC2 Tumor Suppressor Complex." *Genes and Development* 18 (23): 1–12.
- Bruna Alejandra, Rachel S. Darken, Federico Rojo, Alberto Ocaña, Silvia Peñuelas, Alexandra Arias, Raquel Paris, et al. 2007. "High TGFβ-Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene." *Cancer Cell* 11 (2): 147–60.
- Carroll Bernadette, and Elaine A Dunlop. 2017. "The Lysosome: A Crucial Hub for AMPK and mTORC1 Signalling." *The Biochemical Journal* 474 (9): 1453–66.

- Castro M, Grau L., Franco N., Orenes E., Alvarez M., Blanca A., Heredero O., et al. 2011. “Multiplexed Methylation Profiles of Tumor Suppressor Genes in Bladder Cancer.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 13 (1): 29–40.
- Catalano Myriam, Giuseppina D’Alessandro, Francesca Lepore, Marco Corazzari, Sara Caldarola, Cristina Valacca, Fiorella Faienza, et al. 2015. “Autophagy Induction Impairs Migration and Invasion by Reversing EMT in Glioblastoma Cells.” *Molecular Oncology* 9 (8): 1612–25.
- Catterall William A, Alan L Goldin, and Stephen G Waxman. 2005. “International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels.” *Pharmacological Reviews* 57 (4): 397–409.
- Chagin Andrei S. 2016. “Effectors of mTOR-Autophagy Pathway: Targeting Cancer, Affecting the Skeleton.” *Current Opinion in Pharmacology* 28 (3): 1–7.
- Chemin Jean, Arnaud Monteil, Steve Dubel, Joël Nargeot, and Philippe Lory. 2001. “The α_{11} T-Type Calcium Channel Exhibits Faster Gating Properties When Overexpressed in Neuroblastoma/glioma NG 108-15 Cells.” *European Journal of Neuroscience* 14 (10): 1678–86.
- Chen Hsiao-Yun, Liang-Ting Lin, Mong-Lien Wang, Benoit Laurent, Chih-Hung Hsu, Chih-Ming Pan, Wan-Ru Jiang, et al. 2017. “Musashi-1 Enhances Glioblastoma Cell Migration and Cytoskeletal Dynamics through Translational Inhibition of Tensin3.” *Scientific Reports* 7 (1): 8710.
- Chen Ning, Muke Zhou, Mi Yang, Jian Guo, Cairong Zhu, Jie Yang, Yucai Wang, Xue Yang, and Li He. 2010. “Calcium Channel Blockers versus Other Classes of Drugs for Hypertension.” *Cochrane Database of Systematic Reviews* 4;(8):3654.
- Chigurupati Srinivasulu, Rajarajeswari Venkataraman, Daniel Barrera, Anusha Naganathan, Meenu Madan, Leena Paul, Jogi V. Pattisapu, et al. 2010. “Receptor Channel TRPC6 Is a Key Mediator of Notch-Driven Glioblastoma Growth and Invasiveness.” *Cancer Research* 70 (1): 418–27.
- Clapham David E. 2007. “Calcium Signaling.” *Cell* 131 (6): 1047–58.
- Clarke Jennifer L, Michele M Ennis, W K Alfred Yung, Susan M Chang, Y Wen, Timothy F Cloughesy, Lisa M Deangelis, et al. 2011. “Survival or Overall Survival for Patients” 13 (10): 1118–24.
- Coutts, Amanda S., and Nicholas B. La Thangue. 2016. “Regulation of Actin Nucleation and Autophagosome Formation.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (17): 3249–63.
- Crino Peter B. 2016. “The mTOR Signalling Cascade: Paving New Roads to Cure Neurological Disease.” *Nature Reviews. Neurology* 12 (7): 379–92.
- Das A., C. Pushparaj N., Bahí A., Sorolla A, Herreros J., Pamplona R., Vilella R., Matias-Guiu X., Martí R. M., and Cantí C.. 2012. “Functional Expression of Voltage-Gated Calcium Channels in Human Melanoma.” *Pigment Cell and Melanoma Research* 25 (2): 200–212.

Bibliografia

- Das A., Pushparaj C., Herreros J., Nager M., Vilella R., Portero M., Pamplona R., Matias-Guiu M., Marti R M., and Canti C.. 2013. “T-Type Calcium Channel Blockers Inhibit Autophagy and Promote Apoptosis of Malignant Melanoma Cells.” *Pigment Cell Melanoma Res* 26 (6): 874–85.
- Dauchy Sandrine, Fabien Dutheil, Richard J. Weaver, Francine Chassoux, Catherine Daumas-Duport, Pierre Olivier Couraud, Jean Michel Scherrmann, Isabelle De Waziers, and Xavier Declèves. 2008. “ABC Transporters, Cytochromes P450 and Their Main Transcription Factors: Expression at the Human Blood-Brain Barrier.” *Journal of Neurochemistry* 107 (6): 1518–28.
- Davis F M, I Azimi, R A Faville, A A Peters, K Jalink, J W Putney, G J Goodhill, E W Thompson, S J Roberts-Thomson, and G R Monteith. 2014. “Induction of Epithelial–mesenchymal Transition (EMT) in Breast Cancer Cells Is Calcium Signal Dependent.” *Oncogene* 33 (18): 2307–16.
- DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli, and C. B. Thompson. 2007. “Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49): 19345–50.
- DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, and Craig B. Thompson. 2008. “The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation.” *Cell Metabolism* 7 (1): 11–20.
- Déliot, Nadine, and Bruno Constantin. 2015. “Biochimica et Biophysica Acta Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration.” *BBA - Biomembranes* 1848 (10): 2512-2522.
- Dolphin A, C N Wyatt, J Richards, R E Beattie, P Craig, J H Lee, L L Cribbs, S G Volsen, and E Perez-Reyes. 1999. “The Effect of alpha2-Delta and Other Accessory Subunits on Expression and Properties of the Calcium Channel alpha1G.” *The Journal of Physiology* 519 Pt 1 (1999): 35–45.
- Drogat, Benjamin, Patrick Auguste, Duc Thang Nguyen, Marion Bouchecareilh, Raphael Pineau, Josephine Nalbantoglu, Randal J. Kaufman, Eric Chevet, Andréas Bikfalvi, and Michel Moenner. 2007. “IRE1 Signaling Is Essential for Ischemia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression and Contributes to Angiogenesis and Tumor Growth in Vivo.” *Cancer Research* 67 (14): 6700–6707.
- Dupont, Nicolas, Sandra Lacas-Gervais, Julie Bertout, Irit Paz, Barbara Freche, Guy Tran Van Nhieu, F. Gisou van der Goot, Philippe J. Sansonetti, and Frank Lafont. 2009. “Shigella Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy.” *Cell Host and Microbe* 6 (2): 137–49.
- Duve, C, B Pressma, T Gianetro, D Wattiaus, and F Appelmans. 1955. “Tissue Fractionation

- Studies.” *Biochem J* 60 (1951): 604–17.
- Dziegielewska, Barbara, Eli V Casarez, Wesley Z Yang, Lloyd S Gray, Jaroslaw Dziegielewski, and Jill K Slack-Davis. 2016. “T-Type Ca²⁺ Channel Inhibition Sensitizes Ovarian Cancer to Carboplatin.” *Pflugers Arch.* 15 (3): 460–70.
- Elstrom, R. L., Daniel E Bauer, Monica Buzzai, Robyn Karnauskas, Marian H Harris, David R Plas, Hongming Zhuang, et al. 2004. “Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells.” *Cancer Research* 64 (11): 3892–99.
- English, A, N Zurek, and G Voeltz. 2012. “Peripheral ER Structure to Function” 37 (1): 62–70.
- Filippi-Chiela, E. C., M. S. Viegas, M. P. Thome, A. Buffon, M. R. Wink, and G. Lenz. 2016. “Modulation of Autophagy by Calcium Signalosome in Human Disease.” *Molecular Pharmacology* 90 (3): 371–84.
- Fischer, Ingeborg, Jean-Pierre Gagner, Meng Law, Elizabeth W Newcomb, and David Zagzag. 2005. “Angiogenesis in Gliomas: Biology and Molecular Pathophysiology.” *Brain Pathology* 15 (4): 297–310.
- Fleming, Angeleen, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, and David C Rubinsztein. 2011. “Chemical Modulators of Autophagy as Biological Probes and Potential Therapeutics.” *Nature Chemical Biology* 7 (1): 9–17.
- Fornaro Lorenzo, Caterina Vivaldi, Dong Lin, Hui Xue, Alfredo Falcone, Yuzhuo Wang, Francesco Crea, and Martin D. Bootman. 2017. “Prognostic Relevance of a T-Type Calcium Channels Gene Signature in Solid Tumours: A Correlation Ready for Clinical Validation.” *PLoS ONE* 12 (8): 1–12.
- Frakes, Ashley E., and Andrew Dillin. 2017. “The UPRER: Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis.” *Molecular Cell* 66 (6): 761–71.
- Fuentes-Raspall, Rafael, Marta Solans, Aina Roca-Barceló, Loreto Vilardell, Montse Puigdemont, Sonia del Barco, Raquel Comas. 2017. “Descriptive Epidemiology of Primary Malignant and Non-Malignant Central Nervous Tumors in Spain: Results from the Girona Cancer Registry (1994–2013).” *Cancer Epidemiology* 50 (Part A): 1–8.
- Galanis Evanthia, Jan C. Buckner, Matthew J. Maurer, Jeffrey I. Kreisberg, Karla Ballman, J. Boni, Josep M. Peralba, et al. 2005. “Phase II Trial of Temsirolimus (CCI-779) in Recurrent Glioblastoma Multiforme: A North Central Cancer Treatment Group Study.” *Journal of Clinical Oncology* 23 (23): 5294–5304.
- Galizzi J P, M Fosset, G Romey, P Laduron, and M Lazdunski. 1986. “Neuroleptics of the Diphenylbutylpiperidine Series Are Potent Calcium Channel Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (19): 7513–17.
- Galluzzi Lorenzo, José Manuel Bravo-San Pedro, and Guido Kroemer. 2014. “Organelle-Specific Initiation of Cell Death.” *Nature Cell Biology* 16 (8): 728–36.
- Gao Jianjiong, Bülent Arman Aksoy, Ugur Dogrusoz, Gideon Dresdner, Benjamin Gross, S Onur

Bibliografia

- Sumer, Yichao Sun, et al. 2013. "Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal." *Science Signaling* 6 (269):11-17.
- Gilbertson Richard J., and Jeremy N. Rich. 2007. "Making a Tumour's Bed: Glioblastoma Stem Cells and the Vascular Niche." *Nature Reviews. Cancer* 7 (10): 733–36.
- Gourine Alexander V, Vitaliy Kasymov, Nephtali Marina, Feige Tang, Melina F Figueiredo, Samantha Lane, Anja G Teschemacher, K Michael Spyer, Karl Deisseroth, and Sergey Kasparov. 2010. "Astrocytes Control Breathing through pH-Dependent Release of ATP." *Science (New York, N.Y.)* 329 (5991): 571–75.
- Hagiwara S, S Ozawa, and O Sand. 1975. "Voltage Clamp Analysis of Two Inward Current Mechanisms in the Egg Cell Membrane of a Starfish." *The Journal of General Physiology* 65 (5): 617–44.
- Hailey Dale W, Angelika S Rambold, Prasanna Satpute-Krishnan, Kasturi Mitra, Rachid Sougrat, Peter K Kim, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2010. "Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation." *Cell* 141 (4): 656–67.
- Hanif Farina, Kanza Muzaffar, Kahkashan Perveen, Saima M Malhi, and Shabana U Simjee. 2017. "Glioblastoma Multiforme: A Review of Its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 18 (1): 3–9.
- Harr Michael W., and Clark W. Distelhorst. 2010. "Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals That Mediate Life or Death." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (10): 1–18.
- Hayashi-Nishino, Mitsuko, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Akihito Yamaguchi, Tamotsu Yoshimori, and Akitsugu Yamamoto. 2009. "A Subdomain of the Endoplasmic Reticulum Forms a Cradle for Autophagosome Formation." *Nature Cell Biology* 11 (12): 1433–37.
- Hegi Monika E., Lili Liu, James G. Herman, Roger Stupp, Wolfgang Wick, Michael Weller, Minesh P. Mehta, and Mark R. Gilbert. 2008. "Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation with Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity." *Journal of Clinical Oncology* 26 (25): 4189–99.
- Hering Steffen, Stanislav Berjukow, Stanislav Sokolov, Rainer Marksteiner, Regina G Wei, Richard Kraus, and Evgeni N Timin. 2000. "Molecular Determinants of Inactivation in Voltage-Gated Ca²⁺ Channels" *J Physiol* 1: 237–49.
- Hetz C., F. Martinon, D. Rodriguez, and L. H. Glimcher. 2011. "The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1 ." *Physiological Reviews* 91 (4): 1219–43.
- Hirooka Kazuyuki, Gabriel E Bertolesi, Melanie E M Kelly, Eileen M Denovan-Wright, Xiaolu Sun, Jawed Hamid, Gerald W Zamponi, Alexander E Juhasz, Lawrence W Haynes, and Steven Barnes. 2002. "T-Type Calcium Channel alpha1G and alpha1H Subunits in Human

- Retinoblastoma Cells and Their Loss after Differentiation.” *Journal of Neurophysiology* 88 (1): 196–205.
- Hogan Patrick G., and Anjana Rao. 2015. “Store-Operated Calcium Entry: Mechanisms and Modulation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460 (1): 40–49.
- Hou Huagang, Venkata Krishnamurthy Nemani, Gaixin Du, Ryan Montano, Rui Song, Barjor Gimi, Harold M. Swartz, Alan Eastman, and Nadeem Khan. 2015. “Monitoring Oxygen Levels in Orthotopic Human Glioma Xenograft Following Carbogen Inhalation and Chemotherapy by Implantable Resonator Based Oximetry.” *International Journal of Cancer* 223 (3): 648–57.
- Høyer-Hansen M, and M Jäättelä. 2007. “Connecting Endoplasmic Reticulum Stress to Autophagy by Unfolded Protein Response and Calcium.” *Cell Death and Differentiation* 14 (9): 1576–82.
- Høyer-Hansen Maria, Lone Bastholm, Piotr Szyniarowski, Michelangelo Campanella, György Szabadkai, Thomas Farkas, Katuscia Bianchi, et al. 2007. “Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-B, and Bcl-2.” *Molecular Cell* 25 (2): 193–205.
- Huang Ji-Biao, Andrei L Kindzelskii, Andrea J Clark, and Howard R Petty. 2004. “Identification of Channels Promoting Calcium Spikes and Waves in HT1080 Tumor Cells: Their Apparent Roles in Cell Motility and Invasion.” *Cancer Research* 64 (7): 2482–89.
- Huang Weifeng, Chunjing Lu, Yong Wu, Shou Ouyang, and Yuanzhong Chen. 2015. “T-Type Calcium Channel Antagonists, Mibefradil and NNC-55-0396 Inhibit Cell Proliferation and Induce Cell Apoptosis in Leukemia Cell Lines.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34 (1): 27–35.
- Huang Wen-Juan J, Wei-Wei W Chen, and Xia Zhang. 2016. “Glioblastoma Multiforme: Effect of Hypoxia and Hypoxia Inducible Factors on Therapeutic Approaches.” *Oncol Lett* 12 (4): 2283–88.
- Hui Anna S, Amy L Bauer, Justin B Striet, Phillip O Schnell, and Maria F Czyzyk-Krzeska. 2006. “Calcium Signaling Stimulates Translation of HIF-Alpha during Hypoxia.” *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (3): 466–75.
- Iftinca, M. (2011). "Neuronal T-type calcium channels: What's new? Iftinca: T-type channel regulation". *Journal of Medicine and Life*, 4(2), 126–138.
- Itakura E, Mizushima N. 2010 "Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins". *Autophagy* 6(6):764-76.
- Itakura E, Mizushima N 2011. "p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding". *J Cell Biol.* 10;192(1):17-27.
- Ito Hideaki, Shigeru Daido, Takao Kanzawa, Seiji Kondo, and Yasuko Kondo. 2005. “Radiation-

Bibliografia

- Induced Autophagy Is Associated with LC3 and Its Inhibition Sensitizes Malignant Glioma Cells." *International Journal of Oncology* 26 (5): 1401–10.
- Jawhari Soha, Marie-Hélène Ratinaud, and Mireille Verdier. 2016. "Glioblastoma, Hypoxia and Autophagy: A Survival-Prone 'Ménage-À-Trois'." *Cell Death & Disease* 7 (10): e2434.
- Johnson Guyla G., Misti C. White, Jian-He Wu, Matthew Vallejo, and Maurizio Grimaldi. 2014. "The Deadly Connection between Endoplasmic Reticulum, Ca²⁺, Protein Synthesis, and the Endoplasmic Reticulum Stress Response in Malignant Glioma Cells." *Neuro-Oncology* 16 (8): 1086–99.
- Kabeya, Y. 2000. "LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosome Membranes after Processing." *The EMBO Journal* 19 (21): 5720–28.
- Kahl Christina R., and Anthony R. Means. 2003. "Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways." *Endocrine Reviews* 24 (6): 719–36.
- Kaloshi G, Petrela M. 2017. "An Extent of Resection Threshold for Recurrent Glioblastoma : Why Wait until Recurrence ?," *J Neurosurg* 127(5):1200.
- Kang Sang Soo, Kyung Seok Han, Bo Mi Ku, Yeon Kyung Lee, Jinpyo Hong, Hye Young Shin, Antoine G. Almonte, et al. 2010. "Caffeine-Mediated Inhibition of Calcium Release Channel Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subtype 3 Blocks Glioblastoma Invasion and Extends Survival." *Cancer Research* 70 (3): 1173–83.
- Kania E, Beata Paj, and Arkadiusz Orzechowski. 2015. "Calcium Homeostasis and ER Stress in Control of Autophagy in Cancer Cells" *BioMed Research International* 15(1) 1-13.
- Kania Elzbieta, Gemma Roest, Tim Vervliet, Jan B. Parys, and Geert Bultynck. 2017. "IP3 Receptor-Mediated Calcium Signaling and Its Role in Autophagy in Cancer." *Frontiers in Oncology* 7 (7): 1–15.
- Kanu Okezie O, Ankit Mehta, Chunhui Di, Ningjing Lin, Kathy Bortoff, Darell D Bigner, Hai Yan, and David Cory Adamson. 2009. "Glioblastoma Multiforme: A Review of Therapeutic Targets." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 13 (10): 701–18.
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. 2007 "Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis" *Genes Dev.* 21(13):1621-35.
- Kaur Avileen, and Saurabh Sharma. 2017. "Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) as a Potential Therapeutic Target in Various Diseases." *Inflammopharmacology* 25 (3): 293–312.
- Kaza Niroop, Latika Kohli, and Kevin A. Roth. 2012. "Autophagy in Brain Tumors: A New Target for Therapeutic Intervention." *Brain Pathology* 22 (1): 89–98.
- Keir Stephen T., Henry S. Friedman, David A. Reardon, Darell D. Bigner, and Lloyd A. Gray. 2013. "Mibefradil, a Novel Therapy for Glioblastoma Multiforme: Cell Cycle Synchronization and Interlaced Therapy in a Murine Model." *Journal of Neuro-Oncology* 111 (2): 97–10.
- Keith L. Ligon, Emmanuelle Huillard, Shwetal Mehta, Santosh Kesari, Hongye, Ronald A. Liu,

- John A. Alberta, Robert M. Bachoo, Michael Kane, David N. Louis, and and David H. Rowitch DePinho, David J. Anderson, Charles D. Stiles. 2007. "Olig2-Regulated Lineage-Restricted Pathway Controls Replication Competence in Neural Stem Cells and Malignant Glioma." *Neuron*. 53(4):503-17.
- Khosravani H, and GW Zamponi. 2006. "Voltage-Gated Calcium Channels and Idiopathic Generalized Epilepsies." *Physiological Reviews* 107(1): 941–66.
- Kim Ki Hyun, Dongyoung Kim, Ju Yeol Park, Hye Jin Jung, Yong Hee Cho, Hyoung Kyu Kim, Jin Han, Kang Yell Choi, and Ho Jeong Kwon. 2015. "NNC 55-0396, a T-Type Ca²⁺ Channel Inhibitor, Inhibits Angiogenesis via Suppression of Hypoxia-Inducible Factor-1?? Signal Transduction." *Journal of Molecular Medicine* 93 (5): 499–509.
- Kim Min Jung, Soo Jung Woo, Chang Hwan Yoon, Jae Seong Lee, Sungkwan An, Yung Hyun Choi, Sang Gu Hwang, Gyesoon Yoon, and Su Jae Lee. 2011. "Involvement of Autophagy in Oncogenic K-Ras-Induced Malignant Cell Transformation." *Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 12924–32.
- Kimura Shunsuke, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori. 2007. "Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3." *Autophagy* 3 (5): 452–60.
- Kirkin Vladimir, David G. McEwan, Ivana Novak, and Ivan Dikic. 2009. "A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy." *Molecular Cell* 34 (3): 259–69.
- Klionsky DJ; Meier, AJ; Codogno P; Neufeld T; Ryan SC. 2005. "Autophagy and p70s6k." *Autophagy* 4 (10): 1332–34.
- Klionsky Daniel J., Daniel J. Klionsky, Kotb Abdelmohsen, Akihisa Abe, Md Joynal Abedin, Hagai Abeliovich, Abraham Acevedo Arozena, et al. 2016. "Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd Edition)." *Autophagy* 12 (1): 1–222.
- Komatsu Masaaki, Satoshi Waguri, Masato Koike, Yu-shin Sou, Takashi Ueno, Taichi Hara, Noboru Mizushima, et al. 2007. "Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice," 1149–63.
- Kondo Yasuko, Takao Kanzawa, Raymond Sawaya, and Seiji Kondo. 2005. "The role of autophagy in cancer development and response to therapy" *Nat Rev Cancer* 5(9):726-34.
- Kondratskyi Artem, Maya Yassine, Kateryna Kondratska, Roman Skryma, and Christian Slomianny. 2013. "Calcium-Permeable Ion Channels in Control of Autophagy and Cancer" *Front Physiol.* 2(4):272
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994 "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis" *Blood* 84 (5):1415-20.
- Kopitz, J, G O Kisen, P B Gordon, P Bohley, and P O Seglen. 1990. "Nonselective Autophagy of Cytosolic Enzymes by Isolated Rat Hepatocytes." *Journal of Cell Biology* 111 (10): 941–53.

Bibliografia

- Koukourakis Michael I, Achilleas G Mitrakas, and Alexandra Giatromanolaki. 2016. “Therapeutic Interactions of Autophagy with Radiation and Temozolomide in Glioblastoma : Evidence and Issues to Resolve.” *British Journal of Cancer* 114 (5): 485–96.
- Kozutsumi Yasunori, Mark Segal, Karl Normington, Mary-Jane Gething, and Joe Sambrook. 1988. “The Presence of Malfolded Proteins in the Endoplasmic Reticulum Signals the Induction of Glucose-Regulated Proteins.” *Nature*. 332(6163):462-4.
- Kraft, Claudine, Matthias Peter, and Kay Hofmann. 2010. “Selective Autophagy: Ubiquitin-Mediated Recognition and beyond.” *Nature Cell Biology* 12 (9): 836–41.
- Lacroix M, D Abi-Said, D R Fourney, Z L Gokaslan, W Shi, F DeMonte, F F Lang, et al. 2001. “A Multivariate Analysis of 416 Patients with Glioblastoma Multiforme: Prognosis, Extent of Resection, and Survival.” *Journal of Neurosurgery* 95 (2): 190–98.
- Laplante M., and D. M. Sabatini. 2013. “Regulation of mTORC1 and Its Impact on Gene Expression at a Glance.” *Journal of Cell Science* 126 (8): 1713–19.
- Latour Isabelle, Deon F. Louw, Aaron M. Beedle, Jawed Hamid, Garnette R. Sutherland, and Gerald W. Zamponi. 2004. “Expression of T-Type Calcium Channel Splice Variants in Human Glioma.” *Glia* 48 (2): 112–19.
- Leanza Luigi, Antonella Manago, Mario Zoratti, Erich Gulbins, and Ildiko Szabo. 2015. “Pharmacological Targeting of Ion Channels for Cancer Therapy: In Vivo Evidences.” *BBA - Molecular Cell Research*. 25 (3):25-38.
- Lee G L, and W N Hait. 1985. “Inhibition of Growth of C6 Astrocytoma Cells by Inhibitors of Calmodulin.” *Life Sciences* 36 (4): 347–54.
- Lee Sang Y. 2016. “Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme.” *Genes and Diseases* 3 (3). Elsevier Ltd: 198–210.
- Lemaire L., F. Franconi, B. Siegler, C. Legendre, and E. Garcion. 2015. “In Vitro Expansion of U87-MG Human Glioblastoma Cells under Hypoxic Conditions Affects Glucose Metabolism and Subsequent in Vivo Growth.” *Tumor Biology* 36 (10): 7699–7710.
- Li Ming, J Bondo Hansen, Luping Huang, Brian M Keyser, and James T Taylor. 2005. “Towards Selective Antagonists of T-Type Calcium Channels: Design, Characterization and Potential Applications of NNC 55-0396.” *Cardiovascular Drug Reviews* 23 (2): 173–96.
- Li Ying-Jie, Yu-He Lei, Nan Yao, Chen-Ran Wang, Nan Hu, Wen-Cai Ye, Dong-Mei Zhang, and Zhe-Sheng Chen. 2017. “Autophagy and Multidrug Resistance in Cancer.” *Chinese Journal of Cancer* 36 (1): 52.
- Lijnen P, R Fagard, and V Petrov. 1999. “Mibefradil-Induced Inhibition of Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.” *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33 (4): 595–604.
- Liu Aizhen, Chunfeng Hou, Hongfang Chen, Xuan Zong, and Peijun Zong. 2016. “Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation.”

- Frontiers in Oncology* 6 (1): 16.
- Löffler Antje S, Sebastian Alers, Alexandra M Dieterle, Hildegard Keppeler, Mirita Franz-Wachtel, Mondira Kundu, David G Campbell, Sebastian Wesselborg, Dario R Alessi, and Björn Stork. 2011. "Ulk1-Mediated Phosphorylation of AMPK Constitutes a Negative Regulatory Feedback Loop." *Autophagy* 7 (7): 696–706.
- López-otín Carlos, Maria A Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer. 2013. "The Hallmarks of Aging." *Cell* 153 (6): 1194–1217.
- Louis David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, and David W. Ellison. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica* 131 (6): 803–20.
- Lowry Oliver H, Nira J Rosebrough, Far Lewis, and Rose J Randall. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *Readings* 193 (1): 265–75.
- Lozy,Fred, and Vassiliki Karantza. 2012a. "Autophagy and Cancer Cell Metabolism." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23 (4): 395–401.
- Lu Chen, and Amal Shervington. 2008. "Chemoresistance in Gliomas." *Molecular and Cellular Biochemistry* 312 (1–2): 71–80.
- Lum Julian J, Thi Bui, Michaela Gruber, John D Gordan, Ralph J DeBerardinis, Kelly L Covello, M Celeste Simon, and Craig B Thompson. 2007. "The Transcription Factor HIF-1alpha Plays a Critical Role in the Growth Factor-Dependent Regulation of Both Aerobic and Anaerobic Glycolysis." *Genes & Development* 21 (9): 1037–49.
- Ma Daniel J., Evanthia Galanis, S. Keith Anderson, David Schiff, Timothy J. Kaufmann, Patrick J. Peller, Caterina Giannini, et al. 2015. "A Phase II Trial of Everolimus, Temozolomide, and Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: NCCTG N057K." *Neuro-Oncology* 17 (9): 1261–69.
- Macià A., J. Herreros, R. M. Martí, and C. Cantí. 2015. "Calcium Channel Expression and Applicability as Targeted Therapies in Melanoma." *BioMed Research International* 2015.
- Maiques O, Macià A, Moreno S, Barceló C, Santacana M, Veà A, Herreros J, Gatiús S, Ortega E, Valls J, Chen BJ, Llobet-Navas D, Matias-Guiu X, Cantí C, Martí RM. 2017 "Immunohistochemical analysis of T-type calcium channels in acquired melanocytic naevi and melanoma". *Br J Dermatol.* 176(5):1247-1258.
- Martina Jose A, Yong Chen, Marjan Gucek, and Rosa Puertollano. 2012. "MTORC1 Functions as a Transcriptional Regulator of Autophagy by Preventing Nuclear Transport of TFEB." *Autophagy* 8 (6): 903–14.
- Mason Warren P, and J Gregory Cairncross. 2005. "Drug Insight: Temozolomide as a Treatment for Malignant Glioma--Impact of a Recent Trial." *Nature Clinical Practice. Neurology* 1 (2): 88–95.

Bibliografia

- McGirt Matthew J., Kaisorn L. Chaichana, Muraya Gathinji, Frank J. Attenello, Khoi Than, Alessandro Olivi, Jon D. Weingart, Henry Brem, and Alf redo Quiñones-Hinojosa. 2009. “Independent Association of Extent of Resection with Survival in Patients with Malignant Brain Astrocytoma.” *Journal of Neurosurgery* 110 (1): 156–62.
- Medina Diego L., Simone Di Paola, Ivana Peluso, Andrea Armani, Diego De Stefani, Rossella Venditti, Sandro Montefusco, et al. 2015. “Lysosomal Calcium Signalling Regulates Autophagy through Calcineurin and TFEB.” *Nature Cell Biology* 17 (3): 288–99.
- Meister Silke, Ulrich Schubert, Kirsten Neubert, Kai Herrmann, Renate Burger, Martin Gramatzki, Sabine Hahn, et al. 2007. “Extensive Immunoglobulin Production Sensitizes Myeloma Cells for Proteasome Inhibition.” *Cancer Research* 67 (4): 1783–92.
- Mimouna Sanda, Marie Bazin, Baharia Mograbi, Arlette Darfeuille-Michaud, Patrick Brest, Paul Hofman, and Valérie Vouret-Craviari. 2014. “HIF1A Regulates Xenophagic Degradation of Adherent and Invasive Escherichia Coli (AIEC).” *Autophagy* 10 (12): 2333–45.
- Mishra S K, and K Hermsmeyer. 1994. “Selective Inhibition of T-Type Ca²⁺ Channels by Ro 40-5967.” *Circulation Research* 75 (1): 144–48.
- Monteith Gregory R., Felicity M. Davis, and Sarah J. Roberts-Thomson. 2012. “Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 31666–73.
- Moreau Kevin, Brinda Ravikumar, Maurizio Renna, Claudia Puri, and David C Rubinsztein. 2011. “Autophagosome Precursor Maturation Requires Homotypic Fusion.” *Cell* 146 (2): 303–17.
- Morgan Anthony J., Lianne C. Davis, Siegfried K T Y Wagner, Alexander M. Lewis, John Parrington, Grant C. Churchill, and Antony Galione. 2013. “Bidirectional Ca²⁺ Signaling Occurs between the Endoplasmic Reticulum and Acidic Organelles.” *Journal of Cell Biology* 200 (6): 789–805.
- Morokoff Andrew, Wayne Ng, Andrew Gogos, and Andrew Kaye. 2015. “Molecular Subtypes, Stem Cells and Heterogeneity: Implications for Personalised Therapy in Glioma.” *Journal of Clinical Neuroscience* 22 (8): 1219–26.
- Morrone FB, Gehring MP, Nicoletti NF. 2016 "Calcium Channels and Associated Receptors in Malignant Brain Tumor Therapy" *Mol Pharmacol* 90(3):403-9.
- Motiani Rajender K., María C. Hyzinski-García, Xuexin Zhang, Matthew M. Henkel, Iskandar F. Abdullaev, Yu Hung Kuo, Khalid Matrougui, Alexander A. Mongin, and Mohamed Trebak. 2013. “STIM1 and Orai1 Mediate CRAC Channel Activity and Are Essential for Human Glioblastoma Invasion.” *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 465 (9): 1249–60.
- Mrschik Michaela, and Kevin M. Ryan. 2015. “Lysosomal Proteins in Cell Death and Autophagy.” *FEBS Journal* 282 (10): 1858–70.
- Mullins M E, B Z Horowitz, D H Linden, G W Smith, R L Norton, and J Stump. 1998. “Life-Threatening Interaction of Mibefradil and Beta-Blockers with Dihydropyridine Calcium

- Channel Blockers.” *JAMA* 280 (2): 157–58.
- Murat Anastasia, Eugenia Migliavacca, Thierry Gorlia, Wanyu L. Lambiv, Tal Shay, Marie France Hamou, Nicolas De Tribolet, et al. 2008. “Stem Cell-Related ‘self-Renewal’ signature and High Epidermal Growth Factor Receptor Expression Associated with Resistance to Concomitant Chemoradiotherapy in Glioblastoma.” *Journal of Clinical Oncology* 26 (18): 3015–24.
- Neifeld J P, D C Tormey, M A Baker, F L Meyskens, and R N Taub. 1983. “Phase II Trial of the Dopaminergic Inhibitor Pimozide in Previously Treated Melanoma Patients.” *Cancer Treatment Reports* 67 (2): 155–57.
- Niklasson Mia, Gianluca Maddalo, Zuzana Sramkova, Ercan Mutlu5, Shimei Wee2, Petra Sekyrova, Linnéa Schmidt, et al. 2017. "Membrane-depolarizing channel blockers induce selective glioma cell death by impairing nutrient transport and unfolded protein/ aminoacid responses" *Cancer Research* 77(7):1741-1752.
- Nishikawa Ryo. 2010. “Standard Therapy for Glioblastoma--a Review of Where We Are.” *Neurologia Medico-Chirurgica* 50 (9): 713–19.
- Noble, Mark, Chris Pröschel, and Margot Mayer-Pröschel. 2004. “Getting a GR(i)P on Oligodendrocyte Development.” *Developmental Biology* 265 (1): 33–52.
- Noda T, J Kim, W P Huang, M Baba, C Tokunaga, Y Ohsumi, and D J Klionsky. 2000. “Apg9p/Cvt7p Is an Integral Membrane Protein Required for Transport Vesicle Formation in the Cvt and Autophagy Pathways.” *The Journal of Cell Biology* 148 (3): 465–80.
- Nowycky M C, A P Fox, and R W Tsien. 1985. “Three Types of Neuronal Calcium Channel with Different Calcium Agonist Sensitivity.” *Nature* 316 (6027): 440–43.
- Ohgaki Hiroko, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, et al. 2004. “Genetic Pathways to Glioblastoma.” *Cancer Research* 64 (19): 6892.
- Ohgaki Hiroko, and Paul Kleihues. 2007. “Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma.” *The American Journal of Pathology* 170 (5). American Society for Investigative Pathology: 1445–53.
- Ohgaki H, Kleihues P.2013 "The definition of primary and secondary glioblastoma" *Clin Cancer Res* 19(4):764-72
- Ohsumi Yoshinori. 2014. “Historical Landmarks of Autophagy Research.” *Cell Research* 24 (1): 9–23.
- Ozpolat Bulent, and Doris M Benbrook. 2015. “Targeting Autophagy in Cancer Management - Strategies and Developments.” *Cancer Management and Research* 7: 291–99.
- Palumbo Silvia, Paolo Tini, Marzia Toscano, Giulia Allavena, Francesca Angeletti, Federico Manai, Clelia Miracco, Sergio Comincini, and Luigi Pirtoli. 2014. “Combined EGFR and Autophagy Modulation Impairs Cell Migration and Enhances Radiosensitivity in Human Glioblastoma Cells.” *Journal of Cellular Physiology* 229 (11): 1863–73.

Bibliografia

- Panda Prashanta Kumar, Subhadip Mukhopadhyay, Durgesh Nandini Das, Niharika Sinha, Prajna Paramita Naik, and Sujit K Bhutia. 2015. "Mechanism of Autophagic Regulation in Carcinogenesis and Cancer Therapeutics." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 39: 43-55.
- Pankiv Serhiy, Terje Høyvarde Clausen, Trond Lamark, Andreas Brech, Jack Ansgar Bruun, Heidi Outzen, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, and Terje Johansen. 2007. "p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by autophagy" *Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 24131–45.
- Panner Amith, Leanne L. Cribbs, Gina M. Zainelli, Thomas C. Origitano, Sanjay Singh, and Robert D. Wurster. 2005. "Variation of T-Type Calcium Channel Protein Expression Affects Cell Division of Cultured Tumor Cells." *Cell Calcium* 37 (2): 105–19.
- Parzych Katherine R., and Daniel J. Klionsky. 2014. "An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (3): 460–73.
- Patil C., and P. Walter. 2001. "Intracellular Signaling from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus: The Unfolded Protein Response in Yeast and Mammals." *Current Opinion in Cell Biology* 13 (3): 349–56.
- Perez-Reyes E. 2003 "Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels" *Physiol Rev.* 83(1):117-61.
- Petrungaro Carmelina, Katharina M. Zimmermann, Victoria Küttner, Manuel Fischer, Jörn Dengjel, Ivan Bogeski, and Jan Riemer. 2015. "The Ca²⁺-Dependent Release of the Mia40-Induced MICU1-MICU2 Dimer from MCU Regulates Mitochondrial Ca²⁺ Uptake." *Cell Metabolism* 22 (4): 721–33.
- Phan Nam, Chih-Yang Wang, Chien-Fu Chen, Zhengda Sun, Ming-Derg Lai, and Yen-Chang Lin. 2017. "Voltage-Gated Calcium Channels: Novel Targets for Cancer Therapy." *Oncology Letters*, 2059–74.
- Pinto Mauro Cunha Xavier, Alexandre Hiroaki Kihara, Vânia A M Goulart, Fernanda M P Tonelli, Katia N. Gomes, Henning Ulrich, and Rodrigo R. Resende. 2015. "Calcium Signaling and Cell Proliferation." *Cellular Signalling* 27 (11): 2139–49.
- Poillet-Perez Laura, Gilles Despouy, R??gis Delage-Mourroux, and Micha??l Boyer-Guittaut. 2015. "Interplay between ROS and Autophagy in Cancer Cells, from Tumor Initiation to Cancer Therapy." *Redox Biology* 4:184–92.
- Prevarskaya Natalia, Roman Skryma, and Yaroslav Shuba. 2013. "Targeting Ca²⁺ Transport in Cancer: Close Reality or Long Perspective?" *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17 (3): 225–41.
- Puissant Alexandre, Nina Fenouille, and Patrick Auberger. 2012. "When Autophagy Meets Cancer through p62/SQSTM1." *American Journal of Cancer Research* 2 (4): 397–413.
- Qiu Yu, Peng Li, and Chunyan Ji. 2015. "Cell Death Conversion under Hypoxic Condition in Tumor

- Development and Therapy.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10): 25536–51.
- Raffaello Anna, Cristina Mammucari, Gaia Gherardi, and Rosario Rizzuto. 2016. “Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes.” *Trends in Biochemical Sciences* 41 (12): 1035–49.
- Rashid Harun-Or, Raj Kumar Yadav, Hyung-Ryong Kim, and Han-Jung Chae. 2015. “ER Stress: Autophagy Induction, Inhibition and Selection.” *Autophagy* 11 (11): 1956–77.
- Ravikumar B., S. Sarkar, J. E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z. W. Green-Thompson, M. Jimenez-Sanchez, et al. 2010. “Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology.” *Physiological Reviews* 90 (4): 1383–1435.
- Ravikumar Brinda, Marie Futter, Luca Jahreiss, Viktor I Korolchuk, Maike Lichtenberg, Shouqing Luo, Dunecan C O Massey, et al. 2009. “Mammalian Macroautophagy at a Glance.” *Journal of Cell Science* 122 (11): 1707–11.
- Ricci-Vitiani L, R Pallini, L M Larocca, D G Lombardi, M Signore, F Pierconti, G Petrucci, N Montano, G Maira, and R De Maria. 2008. “Mesenchymal Differentiation of Glioblastoma Stem Cells.” *Cell Death and Differentiation* 15 (9): 1491–98.
- Richards, Rosalie, Michael D. Jenkinson, Brian J. Haylock, and Violaine See. 2016. “Cell Cycle Progression in Glioblastoma Cells Is Unaffected by Pathophysiological Levels of Hypoxia.” *PeerJ* 4: e1755.
- Rim Hong-kun, Sehyeon Cho, Dong-hyun Shin, Kyung-sook Chung, Young-wuk Cho, Jung-hye Choi, Jae Yeol Lee, and Kyung-tae Lee. 2014. “T-Type Ca²⁺ Channel Blocker, KYS05090 Induces Autophagy and Apoptosis in A549 Cells through Inhibiting Glucose Uptake,” *Molecules* 19(7):9864-75.
- Ringer, Sydney. 1883. “A Further Contribution Regarding the Influence of the Different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart.” *Journal of Physiology* Plate I: 29–42.
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. 1993 "Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria" *Science* 262(5134):744-7.
- Robin Adam M., Ian Lee, and Steven N. Kalkanis. 2017. “Reoperation for Recurrent Glioblastoma Multiforme.” *Neurosurgery Clinics of North America* 28 (3): 407–28.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O’Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. 2010 "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1" *Cancer Cell* 17(1):98-110.

Bibliografía

- Roos Alison, Zonghui Ding, Joseph C. Loftus, and Nhan L. Tran. 2017. "Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion." *Frontiers in Oncology* 7 (6): 120.
- Rosenfeld Myrna R., Xiaobu Ye, Jeffrey G. Supko, Serena Desideri, Stuart A. Grossman, Steven Brem, Tom Mikkelsen, et al. 2014. "A Phase I/II Trial of Hydroxychloroquine in Conjunction with Radiation Therapy and Concurrent and Adjuvant Temozolomide in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme." *Autophagy* 10 (8): 1359–68.
- Rosenfeldt Mathias T, and Kevin M Ryan. 2009. "The Role of Autophagy in Tumour Development and Cancer Therapy" 11 (12): 1–20.
- Sallán MC, A Visa, S Shaikh, M Nager, J Herreros, and C Cantí. 2017. "T-Type Ca²⁺ Channels: T for Targetable." *Cancer Research*.
- Sanai N, A Alvarez-Buylla, and M S Berger. 2005. "Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas." *N Engl J Med* 353 (8): 811–22.
- Sanchez A. M. J., R. B. Candau, A. Csibi, A. F. Pagano, A. Raibon, and H. Bernardi. 2012. "The Role of AMP-Activated Protein Kinase in the Coordination of Skeletal Muscle Turnover and Energy Homeostasis." *AJP: Cell Physiology* 303 (5): C475–85.
- Santoni G, Santoni M, Nabissi M. 2012 "Functional role of T-type calcium channels in tumour growth and progression: prospective in cancer therapy" *Br J Pharmacol* 166(4):1244-6.
- Saxton Robert A., and David M. Sabatini. 2017. "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell* 168 (6): 960–76.
- Schmitt R, J P Clozel, N Iberg, and F R Bühler. 1995. "Mibefradil Prevents Neointima Formation after Vascular Injury in Rats. Possible Role of the Blockade of the T-Type Voltage-Operated Calcium Channel." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (8): 1161–65.
- Schröder Martin, and Randal J. Kaufman. 2005. "ER Stress and the Unfolded Protein Response." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569 (1–2): 29–63.
- Settembre Carmine, Roberto Zoncu, Diego L Medina, Francesco Vetrini, Serkan Erdin, Serpil Uckac Erdin, Tuong Huynh, et al. 2012. "A Lysosome-to-Nucleus Signalling Mechanism Senses and Regulates the Lysosome via mTOR and TFEB." *The EMBO Journal* 31 (5): 1095–1108.
- Sharma Khushboo, Ngoc Le, Moureq Alotaibi, and David A. Gewirtz. 2014. "Cytotoxic Autophagy in Cancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (6): 10034–51.
- Shibata Yoko, Gia K. Voeltz, and Tom A. Rapoport. 2006. "Rough Sheets and Smooth Tubules." *Cell* 126 (3): 435–39.
- Silverthorn Dee Unglaub, William C. Ober, Claire W. Garrison, and Silvia Fernández Castelo. 2008. *Fisiología Humana : Un Enfoque Integrado*. Editorial Medica Panamericana.
- Singh Sheila K, Cynthia Hawkins, Ian D Clarke, Jeremy A Squire, Jane Bayani, Takuichiro Hide, R Mark Henkelman, Michael D Cusimano, and Peter B Dirks. 2004. "Identification of Human

- Brain Tumour Initiating Cells.” *Nature* 432 (11): 396–401.
- Stewart Teneale A., Kunsala T D S Yapa, and Gregory R. Monteith. 2015. “Altered Calcium Signaling in Cancer Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1848 (10 Pt B): 2502–11.
- Stockhammer Florian, Martin Misch, Hans Joachim Helms, Ulrike Lengler, Friedrich Prall, Andreas Von Deimling, and Christian Hartmann. 2012. “IDH1/2 Mutations in WHO Grade II Astrocytomas Associated with Localization and Seizure as the Initial Symptom.” *Seizure* 21 (3):194–97.
- Strobl J S, Z Melkounian, V A Peterson, and H Hylton. 1998. “The Cell Death Response to Gamma-Radiation in MCF-7 Cells Is Enhanced by a Neuroleptic Drug, Pimozide.” *Breast Cancer Research and Treatment* 51 (1): 83–95.
- Stupp Rogger. 2005. “Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.” *Cancer/Radiotherapie* 9 (3): 196–97.
- Sukumaran P., Y. Sun, M. Vyas, and B. B. Singh. 2015. “TRPC1-Mediated Ca²⁺ Entry Is Essential for the Regulation of Hypoxia and Nutrient Depletion-Dependent Autophagy.” *Cell Death and Disease* 6 (3):e1674-10.
- Sun Fang, Xia Xu, Xiaohong Wang, and Bei Zhang. 2016. “Regulation of Autophagy by Ca²⁺.” *Tumor Biology* 37 (12):15467–76.
- Szatkowski Cécilia, Jan B Parys, Halima Ouadid-Ahidouch, and Fabrice Matifat. 2010. “Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Ca²⁺ Signalling Is Involved in Estradiol-Induced Breast Cancer Epithelial Cell Growth.” *Molecular Cancer* 9 (1): 156.
- Szegezdi Eva, Susan E Logue, Adrienne M Gorman, and Afshin Samali. 2006. “Mediators of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis.” *EMBO Reports* 7 (9): 880–85.
- Taniguchi Koji, Shinichiro Yamachika, Feng He, and Michael Karin. 2016. “p62/SQSTM1- Dr. Jekyll and Mr. Hyde That Prevents Oxidative Stress but Promotes Liver Cancer.” *FEBS Lett* 590 (L): 205–25.
- Taylor James T, Luping Huang, Jonathan E Pottle, Kai Liu, Yali Yang, Xiangbin Zeng, Brian M Keyser, Krishna C Agrawal, J Bondo Hansen, and Ming Li. 2008. “Selective Blockade of T-Type Ca²⁺ Channels Suppresses Human Breast Cancer Cell Proliferation.” *Cancer Letters* 267 (1): 116–24.
- Taylor James T, Xiang-Bin Zeng, Jonathan E Pottle, Kevin Lee, Alun R Wang, Stephenie G Yi, Jennifer A S Scruggs, Suresh S Sikka, and Ming Li. 2008. “Calcium Signaling and T-Type Calcium Channels in Cancer Cell Cycling.” *World Journal of Gastroenterology* 14 (32): 4984–91.
- Thiery Jean Paul. 2002. “Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression.” *Nature Reviews. Cancer* 2 (6): 442–54.
- Tong Yanju, and Fuyong Song. 2015. “Intracellular Calcium Signaling Regulates Autophagy via Calcineurin- Mediated TFEB Dephosphorylation” 11 (7): 1192–95.

Bibliografia

- Urbanska Kaja, Justyna Sokolowska, Maciej Szmidt, and Pawel Sysa. 2014. "Glioblastoma Multiforme - An Overview." *Wspolczesna Onkologia* 18 (5): 307–12.
- Valerie Nicholas C K, Barbara Dziegielewska, Amol S Hosing, Ewa Augustin, Lloyd S Gray, David L Brautigan, James M Larner, and Jaroslaw Dziegielewski. 2013. "Inhibition of T-Type Calcium Channels Disrupts Akt Signaling and Promotes Apoptosis in Glioblastoma Cells." *Biochemical Pharmacology* 85 (7): 888–97.
- Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphaël M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. 2010. "Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells" *Cell Death Dis.* 16;1: e75.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. 2010. "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1" *Cancer Cell* 17(1):98-110.
- Vicencio J M, C Ortiz, A Criollo, A W E Jones, O Kepp, L Galluzzi, N Joza, et al. 2009. "The Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Regulates Autophagy through Its Interaction with Beclin 1." *Cell Death and Differentiation* 16 (7): 1006–17.
- Voeltz Gia K., Melissa M. Rolls, and Tom A. Rapoport. 2002. "Structural Organization of the Endoplasmic Reticulum." *EMBO Reports* 3 (10): 944–50.
- Wang Miao, and Randal J. Kaufman. 2016. "Protein Misfolding in the Endoplasmic Reticulum as a Conduit to Human Disease." *Nature* 529 (7586): 326–35.
- Weller Michael, Wolfgang Wick, Ken Aldape, Michael Brada, Mitchell Berger, Stefan M. Pfister, Ryo Nishikawa, et al. 2015. "Glioma." *Nature Reviews Disease Primers*, 07: 15017.
- Wesseling Pieter, Martin van den Bent, and Arie Perry. 2015. "Oligodendroglioma: Pathology, Molecular Mechanisms and Markers." *Acta Neuropathologica* 129 (6): 809–27.
- White E. 2012 "Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer". *Nat Rev Cancer* 26;12(6):401-10.
- White Eileen, and Robert S. DiPaola. 2009. "The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer." *Clinical Cancer Research* 15 (17): 5308–16.
- Williams G. S. B., L. Boyman, A. C. Chikando, R. J. Khairallah, and W. J. Lederer. 2013. "Mitochondrial Calcium Uptake." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (26): 10479–86.
- Wolosker Herman, Elena Dumin, Livia Balan, and Veronika N. Foltyn. 2008. "D-Amino Acids in the Brain: D-Serine in Neurotransmission and Neurodegeneration." *FEBS Journal* 275 (14):

- 3514–26.
- Wouters Bradley G., and Marianne Koritzinsky. 2008. “Hypoxia Signalling through mTOR and the Unfolded Protein Response in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 8 (11): 851–64.
- Xie Zhiping, and Daniel J. Klionsky. 2007. “Autophagosome Formation: Core Machinery and Adaptations.” *Nature Cell Biology* 9 (10): 1102–9.
- Xue Shaobai, M.Robert Nicoud, Jie Cui, and Arndt Jovin. 1994. “High Concentration of Calcium Ions in Golgi Apparatus.” *Cell Research*, 97–108.
- Liu Y, Shen Y, Sun T, Yang W. 2017. "Mechanisms regulating radiosensitivity of glioma stem cells" *Neoplasma* 64(5):655-665.
- Yadav Raj Kumar, Soo-Wan Chae, Hyung-Ryong Kim, and Han Jung Chae. 2014. “Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer.” *Journal of Cancer Prevention* 19 (2): 75–88.
- Yan Yuanliang, Zhijie Xu, Shuang Dai, Long Qian, Lunquan Sun, and Zhicheng Gong. 2016. “Targeting Autophagy to Sensitive Glioma to Temozolomide Treatment.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35 (1).
- Yang Liuqi, Caiyu Lin, Li Wang, Huijie Guo, and Xiujie Wang. 2012. “Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Glioblastoma Multiforme Progression and Therapeutic Implications.” *Experimental Cell Research* 318 (19): 2417–26.
- Yao Kevin C., Tadashi Komata, Yasuko Kondo, Takao Kanzawa, Seiji Kondo, and Isabelle M. Germano. 2003. “Molecular Response of Human Glioblastoma Multiforme Cells to Ionizing Radiation: Cell Cycle Arrest, Modulation of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, and Autophagy.” *Journal of Neurosurgery* 98 (2): 378–84.
- Yin Zhangyuan, Clarence Pascual, and Daniel Klionsky. 2016. “Autophagy: Machinery and Regulation.” *Microbial Cell* 3 (12): 588–96.
- Young Andrew R J, Masako Narita, Manuela Ferreira, Eileen White, Scott W Lowe, Andrew R J Young, Masako Narita, et al. 2009. “Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition
Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition,” 798–803.
- Yue Zhenyu, Shengkan Jin, Chingwen Yang, Arnold J Levine, and Nathaniel Heintz. 2003. “Beclin 1, an Autophagy Gene Essential for Early Embryonic Development, Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 15077–82.
- Zhang Ying, Nichola Cruickshanks, Fang Yuan, Baomin Wang, Mary Pahunski, Isela Gallagher, Alexander F Koepfel, et al. 2017. “Targetable T-Type Calcium Channels Drive Glioblastoma.” *Cancer Research* 45209.
- Zhang Yuan, Junhong Zhang, Dongsheng Jiang, Dong Zhang, Zhiyuan Qian, Chunfeng Liu, and Jin Tao. 2012. “Inhibition of T-Type Ca²⁺ Channels by Endostatin Attenuates Human Glioblastoma Cell Proliferation and Migration.” *British Journal of Pharmacology* 166 (4): 1247–60.

Bibliografia

- Zhineng J. Yang, Cheng E. Chee, Shengbing Huang, Zhineng J Yang, Cheng E Chee, Shengbing Huang, Frank a Sinicrope, and Author Manuscript. 2012. "The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications." *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (9): 1533–41.
- Zhu, Hu, Xinyu Cao, Francis Ali-Osman, Stephen Keir, and Hui We Lo. 2010. "EGFR and EGFRvIII Interact with PUMA to Inhibit Mitochondrial Translocalization of PUMA and PUMA-Mediated Apoptosis Independent of EGFR Kinase Activity." *Cancer Letters* 294 (1): 101–10.
- Zhuang Wenzhuo, Bingzong Li, Linmei Long, Liesong Chen, Qiang Huang, and Zhongqin Liang. 2011. "Induction of Autophagy Promotes Differentiation of Glioma-Initiating Cells and Their Radiosensitivity." *International Journal of Cancer* 129 (11): 2720–31.

ANNEX I